

Sous la direction de
Christophe Poncelet
Christophe Sifer

Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain



Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain

Springer

Paris

Berlin

Heidelberg

New York

Hong Kong

Londres

Milan

Tokyo

Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain

Sous la direction de

Christophe Poncelet et Christophe Sifer

Christophe Poncelet

Service de médecine de la reproduction
CHU Jean-Verdier, AP-HP
Avenue du 14-Juillet
93143 Bondy Cedex

Christophe Sifer

Service de biologie de la reproduction
CHU Jean-Verdier, AP-HP
Avenue du 14-Juillet
93143 Bondy Cedex

ISBN-13 : 978-2-8178-0060-8 Springer Paris Berlin Heidelberg New York

© Springer-Verlag France, Paris, 2011

Imprimé en France

Springer-Verlag France est membre du groupe Springer Science + Business Media



Cet ouvrage est soumis au copyright. Tous droits réservés, notamment la reproduction et la représentation, la traduction, la réimpression, l'exposé, la reproduction des illustrations et des tableaux, la transmission par voie d'enregistrement sonore ou visuel, la reproduction par microfilm ou tout autre moyen ainsi que la conservation des banques de données. La loi française sur le copyright du 9 septembre 1965 dans la version en vigueur n'autorise une reproduction intégrale ou partielle que dans certains cas, et en principe moyennant les paiements des droits. Toute représentation, reproduction, contrefaçon ou conservation dans une banque de données par quelque procédé que ce soit est sanctionnée par la loi pénale sur le copyright.

L'utilisation dans cet ouvrage de désignations, dénominations commerciales, marques de fabrique, etc., même sans spécification ne signifie pas que ces termes soient libres de la législation sur les marques de fabrique et la protection des marques et qu'ils puissent être utilisés par chacun.

La maison d'édition décline toute responsabilité quant à l'exactitude des indications de dosage et des modes d'emploi. Dans chaque cas il incombe à l'utilisateur de vérifier les informations données par comparaison à la littérature existante.

Maquette de couverture : Jean-François Montmarché

Mise en page : Nord-Compo – Villeneuve d'Ascq (59)

*Au Professeur Robert Edwards, prix Nobel de Médecine 2010,
sans qui cet ouvrage n'aurait pas vu le jour*

*« Les vraies conquêtes, les seules qui ne donnent aucun regret,
sont celles qu'on fait sur l'ignorance »*

Maximes de Guerre et Pensées, 119, Napoléon I^{er}

Sommaire

Liste des auteurs	xi
Préface	
R. Frydman	xxiii

I. Données fondamentales

1. Folliculogenesis and oogenesis <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> , in humans females <i>J.C. Sadeu and D. Nogueira</i>	3
2. Dialogue ovocyte-cumulus : concept et applications cliniques <i>S. Hamamah, V. Schabo, S. Assou, T. Anahory, H. Dechaud et J. de Vos</i>	25
3. Spermatogenèse - Cellules souches testiculaires - Reprotoxicité <i>H. Lucas, C. Grenet, G.A. de Boccard, R. Mieusset et P. Durand</i>	35
4. L'interaction gamétique au cours de la fécondation <i>J.-P. Wolf, V. Barraud-Lange, A. Ziyyat, J.-C. Pont, C. Serres, J. Auer et B. Lefèvre ..</i>	53
5. Histoire de la fécondation <i>in vitro</i> <i>J. Mandelbaum</i>	63
6. Nutrition et fertilité : aspects féminins <i>I. Cédric-Durnerin, C. Meynant, J.-N. Hugues, O. Boïko, S. Herberg et S. Czernichow</i>	73
Nutrition et fertilité : aspects masculins <i>N. Sermondade, C. Faure, S. Herberg, S. Czernichow et R. Lévy</i>	81
7. Physiologie péritonéale et fertilité <i>M. Canis, S. Matsuzaki, X. Tran, N. Bourdel, R. Botchorishvili, B. Rabischong, K. Jardon, J.-L. Pouly et G. Mage</i>	93

II. Épidémiologie et aspects médico-légaux

8. Épidémiologie de la fertilité masculine Évolution de la qualité du sperme au cours des dernières décennies <i>F. Eustache</i>	109
9. Épidémiologie de la fertilité féminine <i>J. Belaisch-Allart</i>	115
10. Épidémiologie de l'infertilité <i>J. de Mouzon</i>	123
11. Organisation et régulation de l'assistance médicale à la procréation en France par l'Agence de la biomédecine : rôles, missions et avenir <i>F. Merlet et F. Thépot</i>	131
12. Aspects médico-légaux comparés de l'AMP en Europe <i>A. Devaux</i>	141

III. Diagnostic et pronostic

13. Bilan initial d'un couple hypofécond <i>K. Bettahar-Lebugle</i>	153
14. Réceptivité endométriale <i>N. Lédée</i>	163

15.	Infertilités endocriniennes féminines en dehors du syndrome des ovaires polykystiques <i>N. Chabbert-Buffet</i>	171
16.	Syndrome des ovaires polykystiques <i>J.N. Hugues</i>	183
17.	Évaluation du statut folliculaire ovarien <i>M. Grynberg et R. Fanchin</i>	199
18.	Hystérosalpingographie <i>P. Madelenat, G. Schemoul, J. Juras et C. Yazbeck</i>	209
19.	Place de l'échographie 2D-3D dans le bilan de l'infertilité <i>J.-M. Levailant, F. Lamazou, B. Benoit et E. Faivre</i>	225
20.	Hystéroscopie <i>H. Fernandez</i>	249
21.	Malformations utérines et reproduction <i>O. Chanelles et C. Poncelet</i>	261
22.	Infertilité tubo-péritonéale <i>J.-L. Benifla</i>	267
23.	Exploration tubaire : tuboscopie et cathétérisme tubaire sélectif <i>H. Dechaud, J.-P. Rouanet, M. Viala Trentini et C. Dechanet</i>	281
24.	Fertiloscopie <i>A. Watrelot</i>	295
25.	Myomes et infertilité <i>A. Fauconnier, G. Legendre et B. Paillusson</i>	303
26.	Endométriose et infertilité <i>V. Gayet, D. De Ziegler, B. Borghèse, F.X. Aubriot et C. Chapron</i>	315
27.	Endométriose profonde et fertilité <i>E. Daraï, J. Seror, C. Coutant, R. Rouzier, M. Bazot et M. Ballester</i>	325
28.	Endométriose et fécondation <i>in vitro</i> <i>J.-L. Pouly, F. Brugnon, S. Matsuzaki, M. Canis, R. Peikrishvili, Z. Bouraoui, L. Dejou et L. Janny</i>	331
29.	The evaluation of semen and its use in ART <i>T.F. Kruger and D. Rossouw Franken</i>	343
30.	Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP <i>F. Boitrelle, P. Marchetti, V. Mitchell, B. Leroy-Martin et C. Marchetti</i>	349
31.	Génétique et infertilité masculine <i>F. Vialard, M. Albert, D. Molina Gomes, P. Clément, F. Ferfour, M. Bailly et J. Selva</i>	359
32.	Diagnostic et prise en charge de l'infertilité masculine <i>N. Thiounn</i>	371
33.	Diagnostic génétique préimplantatoire <i>M.-L. Camp, L. Hesters et N. Frydman</i>	377
34.	Analyse du premier globule polaire et diagnostic préconceptionnel : états des lieux <i>F. Vialard, D. Molina- Gomes, I. Hammoud, M. Bergère, R. Wainer et J. Selva</i>	389

IV. Techniques d'assistance médicale à la procréation

35.	Stimulation ovarienne, déclenchement de l'ovulation et soutien de la phase lutéale <i>C. Rongières, L. Moreau, E. Lamarca et P. Weber</i>	403

36. Insémination intra-utérine avec sperme du conjoint <i>R. Wainer</i>	423
37. Impacts morphologiques et moléculaires de la qualité ovocytaire en assistance médicale à la procréation <i>P. Clément</i>	433
38. L'ICSI, d'hier à aujourd'hui <i>H. Joris</i>	445
39. <i>Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)</i> <i>A. Hazout, S. Belloc, A.M. Junca, M. Dumont, M. Benkhalifa,</i> <i>Y. Ménézo et P. Cohen-Bacrie</i>	453
40. <i>In vitro</i> maturation of immature human oocytes for clinical application – Past, today and tomorrow <i>R.-C. Chian and J.-H. Lim</i>	461
41. Fécondation <i>in vitro</i> en cycle naturel <i>I. J. Kadoch</i>	473
42. Ponction ovarienne : indications, aspects techniques et complications <i>L. Dessolle</i>	485
43. Morphologie de l'embryon humain : évaluation et corrélation à son potentiel de développement <i>P. Boyer, G. Mercier et M. Boyer</i>	491
44. Évaluation non invasive de la viabilité de l'embryon humain <i>D. Royère, P. Feuerstein, V. Cadoret, V. Puard et F. Guérif</i>	507
45. Embryo metabolism and <i>in vitro</i> culture <i>D.K. Gardner</i>	511
46. Culture embryonnaire prolongée et éclosion assistée <i>Y. Ménézo, A. Hazout, A. Veiga, E.J. Servy, P. Cohen-Bacrie,</i> <i>J. Chouteau, A.M. Junca et M. Dumont</i>	521
47. Aspects cliniques du transfert embryonnaire <i>H. N. Sallam</i>	529
48. Aspects biologiques du transfert embryonnaire <i>C. Sifer</i>	543

V. Cryopréservation.....

49. Congélation du tissu ovarien avant chimiothérapie : un formidable espoir pour nos jeunes patientes cancéreuses <i>J. Donnez et M.-M. Dolmans</i>	551
50. Aspects biologiques de la cryoconservation ovarienne <i>C. Poirot</i>	557
51. Cryopréservation d'ovocytes et d'embryons par congélation lente ou vitrification dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation <i>P. Vanderzwalmen, F. Ectors, Y. Prapas, M. Zech, D. Jareño,</i> <i>B. Lejeune, S. Vanderzwalmen, B. Wirleitner, N. Zech et L. Grobet</i>	567
52. Procréation par don de gamètes et accueil d'embryon <i>J.-M. Kunstmann et D. Le Lannou</i>	587

VI. Autour de la fertilité, de l'infertilité et de l'AMP

53. Procréation médicalement assistée après cancer gynécologique <i>C. Uzan, S. Gouy, C. Lhommé, P. Pautier, P. Duvillard, C. Haie-Meder et P. Morice</i> ..	605

54. Implications des pathologies hématologiques sur l'assistance médicale à la procréation <i>J. Conard</i>	609
55. Implications des pathologies auto-immunes sur la fertilité et l'aide médicale à la procréation <i>O. Fain</i>	617
56. Implications psychologiques de l'infertilité <i>M. Lachowsky et D. Winaver</i>	623
57. Infertilité et AMP : implications éthiques <i>R. Frydman</i>	629
58. Cellules souches embryonnaires et cellules pluripotentes induites, aspects biologiques et applications <i>G. Tachdjian, O. Féraud, C. Bas, A. Magniez, N. Oudrhiri et A.L. Bennaceur-Griscelli</i>	633
59. Risque viral et prise en charge en assistance médicale à la procréation <i>O. Coll et V. Vernaeve</i>	643
60. Grossesses issues de l'AMP <i>J.-M. Antoine</i>	649
61. Enfants issus de l'AMP <i>M. Bonduelle</i>	653
62. Suivi des enfants de l'AMP : expérience d'un centre français <i>M. Boyer, L. Meddeb, V. Pauly et P. Boyer</i>	665
63. Un utérus en prêt : pour qui, pourquoi et comment ? <i>S. Epelboin</i>	677
 <i>Postface</i> <i>B. Pulman</i>	 691

Liste des auteurs

Martine Albert

Service de biologie de la reproduction
et cytogénétique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78105 Saint-Germain-en-Laye ;
EA 2493
Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Tal Anahory

Département de biologie de la reproduction
Pôle naissance et pathologies de la femme
Hôpital Arnaud de Villeneuve
191, avenue du Doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier

Jean-Marie Antoine

Service de gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75970 Paris Cedex 20

Said Assou

Inserm U847
Département de biologie de la reproduction
Pôle naissance et pathologies de la femme
Hôpital Arnaud de Villeneuve
191, avenue du Doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier

François-Xavier Aubriot

Service de gynécologie obstétrique II
et médecine de la reproduction
CHU Cochin
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Jana Auer

Service d'histologie embryologie à orientation
en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Marc Bailly

EA 2493
Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines
Service de gynécologie obstétrique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy Cedex

Virginie Barraud-Lange

Service d'histologie embryologie à orientation
en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Marcos Ballester

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Cécile Bas

Inserm U935
Université Paris 11
Plateforme des cellules souches pluripotentes
Hôpital Paul Brousse
7, rue Guy Moquet
94801 Villejuif

Marc Bazot

Service de radiologie
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Stéphanie Belloc

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Joëlle Belaisch-Allart

Service de gynécologie obstétrique
et reproduction humaine
Centre hospitalier des 4 Villes
Site de Sèvres
141, Grande Rue
92318 Sèvres Cedex

Jean-Louis Benifla

Service de gynécologie obstétrique
Pôle de périnatalité
Hôpital Armand Trousseau
26, avenue du Dr. Arnold-Netter
75012 Paris

Moncef Benkhalifa

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris et Neuilly-sur-Seine

Anne Lise Bennaceur-Griscelli

Inserm U935
Université Paris 11
Plateforme des cellules souches pluripotentes ;
Service d'hématologie
Hôpital Paul Brousse
2, avenue Paul-Vaillant-Couturier
94804 Villejuif

Bernard Benoit

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Princesse Grace
1, Avenue Pasteur, BP 489
MC 98012 Monaco Cedex

Marianne Bergère

Service de biologie de la reproduction
et cytogénétique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy Cedex

Karima Bettahar-Lebugle

Centre d'AMP-CMCO-SIHCUS
19, rue Louis-Pasteur
67300 Schiltigheim

Georges A. de Boccard

Cabinet d'Uro-Andrologie
12, chemin Beau Soleil
1206 Genève
Suisse

Oksana Boïko

Service de médecine de la reproduction
Hôpital Jean Verdier (APHP)
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy

Florence Boitrelle

Laboratoire spermiologie et de biologie
de la reproduction
Hôpital Albert Calmette
CHRU de Lille
Boulevard du Professeur Jules Leclercq
59037 Lille Cedex
CHIPS
78303 Poissy-Saint-Germain

Maryse Bonduelle

Centre de génétique médicale
Universitair Ziekenhuis Brussel
Laarbeeklaan, 01
B 1090 Brussel
Belgique

Zied Bouraoui

Unité de Fiv
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Nicolas Bourdel

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-FerrandB
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

Bruno Borghèse

Service de gynécologie obstétrique II
et médecine de la reproduction
CHU Cochin
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Revaz Botchorishvili

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-Ferrand
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

Marie Boyer

Service de médecine et biologie
de la reproduction (SMBR)
Hôpital Saint-Joseph
26, boulevard de Louvain
13385 Marseille Cedex 08

Pierre Boyer

Service de médecine et biologie
de la reproduction (SMBR)
Hôpital Saint-Joseph
26, boulevard de Louvain
13385 Marseille Cedex 08

Florence Brugnon

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Véronique Cadoret

Service de médecine et biologie
de la reproduction
Pôle de gynécologie obstétrique,
médecine fœtale et reproduction humaine
CHRU Bretonneau
2, boulevard Tonnelé
37044 Tours Cedex 1 ;
INRA-UMR 6175 Physiologie
de la Reproduction et des Comportements
37380 Nouzilly

Marie-Laure Camp

Service de biologie et génétique
de la reproduction
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Michel Canis

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, Place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand ;
Université Clermont 1
UER Médecine
28, place Henri-Dunant
63003 Clermont-Ferrand

Nathalie Chabbert-Buffet

MCU-PH
Endocrinologie
UPMC Université
Paris 06 ;
Service de gynécologie obstétrique
médecine de la reproduction
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Olivier Chanelles

Pôle Femme et Enfant
CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy ;
UFR SMBH Leonard de Vinci
Université Paris 13
Bobigny

Charles Chapron

Service de gynécologie obstétrique II
et médecine de la reproduction
CHU Cochin
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Ri-Cheng Chian

Department of Obstetrics and Gynecology
McGill University
687 Pine
Avenue West
Montreal, Quebec
Canada H3A 1A1

Jacques Chouteau

Clinilab
Place du Docteur-Girard
38000 Grenoble

Isabelle Cédric-Durnerin

Service de médecine de la reproduction
Hôpital Jean Verdier (APHP)
Université Paris XIII
Avenue du 14-juillet
93140 Bondy

Patrice Clément

Laboratoire Clément
8, avenue Henri-Barbusse
93150 Le Blanc Mesnil ;
17, avenue d'Eylau
75116 Paris

Paul Cohen-Bacrie

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Oriol Coll

Clínica Eugin
Entença 293 Baixos
Barcelona 08029
Espagne

Jacqueline Conard

Service d'hématologie biologique
Hôtel Dieu
1, Place du Parvis Notre Dame
75004 Paris

Charles Coutant

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Sébastien Czernichow

Département de santé publique
Hôpital Avicenne (AP-HP)
125, rue de Stalingrad
93009 Bobigny ;
Unité de recherche en épidémiologie
nutritionnelle,
UMR U557 Inserm ;
U1125 Inra ;
CNAM ;
Université Paris 13,
93017 Bobigny

Émile Daraï

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Clotilde Dechanet

Département de médecine et biologie
de la reproduction
CHU Arnaud de Villeneuve
Université Montpellier I
Faculté de Médecine de Montpellier
371, avenue du doyen G.-Giraud
34295 Montpellier Cedex 5

Hervé Dechaud

Département de médecine de la reproduction
Pôle naissance et pathologies de la femme
Hôpital Arnaud de Villeneuve
37, avenue du Doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier Cedex

Lydie Dejou

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Lionel Dessolle

Service de gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
CHU de Nantes
38, boulevard Jean Monnet
44093 Nantes Cedex 1

Aviva Devaux

Laboratoire de biologie de la reproduction
CHU Amiens
124, rue Camille-Desmoulins
80000 Amiens

Marie-Madeleine Dolmans

Service de gynécologie et d'andrologie
Cliniques universitaires Saint-Luc
Université Catholique de Louvain
Avenue Hippocrate, 10
1200 Bruxelles
Belgique

Jacques Donneze

Service de gynécologie et d'andrologie
Cliniques universitaires Saint-Luc
Université Catholique de Louvain
Avenue Hippocrate, 10
1200 Bruxelles
Belgique

Martine Dumont

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Philippe Durand

Institut de génomique fonctionnelle
de Lyon (IGFL)
46, allée d'Italie
69364 Lyon Cedex 07

Pierre Duvillard

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Fabien Ectors

FNRS, GIGA Transgenic Platform
Université de Liège
4000 Liège
Belgique

Sylvie Epelboin

Centre de médecine de la reproduction
Service de gynécologie et obstétrique
Hôpital Bichat-Claude Bernard
46, rue Henri-Huchard
75018 Paris

Florence Eustache

CECOS CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy

Olivier Fain

Service de médecine interne
Hôpital Jean Verdier (AP-HP)
Université Paris 13
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy

Erika Faivre

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Antoine Béchère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Renato Fanchin

Service gynécologie-obstétrique
médecine de la reproduction
Hôpital Antoine Béchère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Arnaud Fauconnier

Service de gynécologie obstétrique
CHI-Poissy/Saint-Germain-en-Laye
10, rue du Champs-Gaillard
78303 Poissy

Céline Faure

Service d'histologie-embryologie-cytogénétique
CECOS, CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy ;
Unité de recherche en épidémiologie
nutritionnelle
UMR U557 Inserm ;
U1125 Inra ;
CNAM ;
Université Paris 13
93017 Bobigny

Olivier Féraud

Inserm U935
Université Paris 11
Plateforme des cellules souches pluripotentes
Hôpital Paul Brousse
7, rue Guy Moquet
94801 Villejuif

Fatma Ferfour

Labo PMA
Service de biologie de la reproduction
et cytogénétique
CHI Poissy-Saint-Germain,
10, rue du Champ Gaillard
78300 Poissy

Hervé Fernandez

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Bicêtre
78, rue du Général-Leclerc
94270 Le Kremlin-Bicêtre

Prisca Feuerstein

INRA-UMR 6175
Physiologie de la Reproduction
et des Comportements
INRA – Centre de Tours
37380 Nouzilly

Daniel Rossouw Franken

Department of Obstetrics and Gynaecology
Stellenbosch University
PO Box 19063
Tygerberg, 7505
Cape Town
Afrique du Sud

Nelly Frydman

Unité de biologie et génétique
de la reproduction
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

René Frydman

Service de gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Vanessa Gayet

Service de gynécologie obstétrique II
et médecine de la reproduction
CHU Cochin
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

David K. Gardner

Department of Zoology
University of Melbourne
Victoria 3010
Australia

Sébastien Gouy

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Christophe Grenet

Institut de génomique fonctionnelle de Lyon (IGFL)
46, allée d'Italie
69364 Lyon Cedex 07

Luc Grobet

GIGA-Research
Université de Liège
Tour GIGA, B34
4000 Liège
Belgique

Michaël Grynberg

Service de gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Fabrice Guérif

Service de médecine et biologie
de la reproduction
Pôle de gynécologie obstétrique,
médecine fœtale et reproduction humaine
CHRU Bretonneau
2, boulevard Tonnelé
37044 Tours Cedex 1

Christine Haie-Meder

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Samir Hamamah

Division AMP-DPI
Département de médecine
et biologie de la reproduction
Hôpital Arnaud de Villeneuve
371, Avenue doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier Cedex 5

Ibrahim Hammoud

Service de biologie de la reproduction
et cytogénétique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy Cedex

André Hazout

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Serge Herchberg

Unité de recherche en épidémiologie
nutritionnelle, UMR U557 Inserm ;
U1125 Inra ; Cnam ; Université Paris 13,
CRNH Id
93017 Bobigny ;
Département de santé publique
Hôpital Avicenne (AP-HP)
125, rue de Stalingrad
93009 Bobigny

Laetitia Hesters

Service de biologie et génétique
de la reproduction
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Jean-Noël Hugues

Service de médecine de la reproduction
Hôpital Jean Verdier (APHP)
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy

Laurent Janny

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Kris Jardon

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-Ferrand
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

David Jareño

Centre hospitalier inter-régional Cavell
(CHIREC)
Hôpital Braine l'Alleud
Rue Wayez, 35
1420 Braine l'Alleud-Bruxelles
Belgique

Hubert Joris

Vitrolife Sweden AB
Bruxelles
Belgique

Anne-Marie Junca

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Jean Juras

Cabinet de radiologie
117, rue Cardinet
75017 Paris

Isaac Jacques Kadoch

Université de Montréal
Département d'obstétrique gynécologie
Hôpital Saint-Luc de CHUM
1058 rue Saint-Denis
Montréal (Québec)
H2X 3J4 Canada

Theunis Frans Kruger

Department of Obstetrics and Gynaecology
Stellenbosch University
PO Box 19063
Tygerberg, 7505
Cape Town
Afrique du Sud

Jean-Marie Kunstmann

CECOS du CHU – Cochin Saint-Vincent-de-Paul
Service d'histologie embryologie à orientation
en biologie de la reproduction
123, boulevard de Port-Royal
75679 Paris Cedex 14

Michèle Lachowsky

Hôpital Bichat
46, rue Henri-Huchard
75018 Paris ;
109, rue de l'Université
75007 Paris

Elisabeth Lamarca

Clinique du Diaconnat
14, boulevard Roosevelt
BP 2399
68067 Mulhouse Cedex

Frédérique Lamazou

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Antoine Bécère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

Nathalie Lédée

Service de gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
CHR la citadelle
Boulevard du 12^e de Ligne, 1
4000 Liège
Belgique ;
Inserm U-782 « cytokines
et relation materno-fœtale »
92140 Clamart

Brigitte Lefèvre

Service d'histologie embryologie
à orientation en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Guillaume Legendre

Service de gynécologie obstétrique
CHI-Poissy/Saint-Germain-en-Laye
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy

Bernard Lejeune

Centre hospitalier inter-régional Cavell
(CHIREC)
Hôpital Braine l'Alleud
Rue Wayez, 35
1420 Braine l'Alleud-Bruxelles
Belgique

Dominique Le Lannou

CECOS Centre Hospitalier
Universitaire Rennes
2, rue Henri-le-Guilloux
35033 Rennes Cedex 9

Brigitte Leroy-Martin

Laboratoire de biologie
de la reproduction-spermiologie
CHRU de Lille
Hôpital Jeanne de Flandre
Avenue Eugène-Avinée
59037 Lille Cedex ;
Laboratoire d'histologie
Faculté de Médecine
Université de Lille II

Jean-Marc Levailant

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Bicêtre
78, rue du Général-Leclerc
94270 Le Kremlin-Bicêtre

Rachel Lévy

Service d'histologie-embryologie-cytogénétique
CECOS
CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy ;
Unité de recherche en épidémiologie
nutritionnelle
UMR U557 Inserm
U1125 Inra ;
CNAM ;
Université Paris 13
93017 Bobigny

Catherine Lhommé

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Jin-Ho Lim

Maria Fertility Hospital
103-11 Shinseol-Dong
Dongdaemun-Gu
Seoul
Korea

Hervé Lucas

Laboratoire AMP74/AB-Biologie
Hôpital de Bonneville
64, avenue de Genève
74130 Bonneville

Patrick Madelenat

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Bichat-Claude-Bernard
46, rue Henri-Huchard
75018 Paris

Gérard Mage

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-Ferrand
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

Aurélie Magniez

Inserm U935
Université Paris 11
Plateforme des cellules souches pluripotentes
Hôpital Paul Brousse
7, rue Guy Moquet
94801 Villejuif

Jacqueline Mandelbaum

Service d'histologie, biologie
de la reproduction/CECOS
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Carole Marchetti

Laboratoire de biologie
de la reproduction-spermiologie
Hôpital Jeanne de Flandre
CHRU de Lille
Avenue Eugène-Avinée
59037 Lille Cedex

Philippe Marchetti

Centre de bio-pathologie
CHRU de Lille
Boulevard du Professeur Jules Leclercq
Faculté de Médecine
Université de Lille II
Inserm U837
59037 Lille Cedex

Sachiko Matsuzaki

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Line Meddeb

Service de médecine et biologie
de la reproduction (SMBR)
Hôpital Saint-Joseph
26 boulevard de Louvain
13385 Marseille Cedex 08

Yves Ménézo

Unité AMP EYLAU-Unilabs
55, rue Saint-Didier
75116 Paris

Gilles Mercier

Laboratoire de biologie de la reproduction
Hôpital Saint-Joseph
26, boulevard de Louvain
13285 Marseille Cedex 08

Françoise Merlet

Agence de BioMédecine,
1, avenue de Stade de France
93212 La Plaine Saint-Denis Cedex

Céline Meynant

Service de médecine de la reproduction
Hôpital Jean Verdier (APHP)
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy

Roger Mieusset

Centre de stérilité masculine
EA 36 94 Recherches en fertilité humaine
Hôpital Paule de Viguier
330, avenue Grande-Bretagne
TSA 70034
31059 Toulouse Cedex 9

Valérie Mitchell

Laboratoire de biologie de la reproduction-
spermiologie
CHRU de Lille
Hôpital Jeanne de Flandre
Avenue Eugène-Avinée
59037 Lille Cedex

Denise Molina Gomes

Labo PMA
Service de biologie de la reproduction et cyto-
génétique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78300 Poissy

Laurence Moreau

Centre d'AMP SIHCUS CMCO
19, rue Louis-Pasteur
67300 Schiltigheim

Philippe Morice

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Jacques de Mouzon

Inserm, Service de gynécologie
et de médecine de la reproduction
Hôpital Cochin
27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75679 Paris Cedex 14

Daniela Nogueira

Laboratoire de biologie de la reproduction
IFREARES Clinique Saint-Jean Languedoc
20, route de Revel
31400 Toulouse

Noufissa Oudrhiri

Service d'hématologie
Hôpital Paul Brousse
2, avenue Paul-Vaillant-Couturier
94804 Villejuif

Bénédicte Paillusson

Service de gynécologie obstétrique
CHI-Poissy/Saint-Germain-en-Laye
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy

Vanessa Pauly

Service du Pr Thirion
Santé publique et informatique médicale
Hôpital Sainte-Marguerite
270, boulevard de Sainte-Marguerite
13009 Marseille

Patricia Pautier

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Russudan Peikrishvili

Unité de FIV
Pôle gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Christophe Poncelet

Pôle Femme et Enfant
CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy
UFR SMBH Leonard de Vinci,
Université Paris 13, Bobigny

Jean-Christophe Pont

Service d'histologie embryologie
à orientation en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
123, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Jean-Luc Pouly

Unité de FIV
Pôle de gynécologie obstétrique et reproduction
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63003 Clermont-Ferrand

Catherine Poirot

UF de biologie de la reproduction
Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière
Université Paris VI, Pierre et Marie Curie
83, boulevard de l'Hôpital
75013 Paris

Yannis Prapas

Iakentro IVF Centre,
Agiou Vasileiou 4
Thessaloniki 54250
Grèce

Vincent Puard

INRA-UMR 6175 Physiologie
de la Reproduction et des Comportements
INRA – Centre de Tours
37380 Nouzilly

Bertrand Pulman

UFR Santé, Médecine
Biologie humaine de l'Université Paris 13
74, rue Marcel-Cachin
93017 Bobigny Cedex

Benoît Rabischong

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-Ferrand
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

Catherine Rongièrès

Centre d'AMP SIHCUS CMCO
19, rue Louis-Pasteur
67300 Schiltigheim

Jean-Pierre Rouanet

CMC Beausoleil
119, avenue de Lodève
34070 Montpellier

Roman Rouzier

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Dominique Royère

Service de médecine et biologie
de la reproduction
Pôle de gynécologie obstétrique,
médecine fœtale et reproduction humaine
UMR 6175 Cnrs/Inra/Haras/
Université de Tours
« Physiologie de la reproduction
et des comportements »
Centre Olympe de Gouges
CHRU de Tours
Boulevard Tonnellé
37044 Tours Cedex

Jean Clair Sadeu

Department of Obstetrics and Gynecology
Reproductive Biology Division
McMaster University
1200 Main Street West
Hamilton, Ontario
L8N 3Z5
Canada

Hassan N. Sallam

Département de l'obstétrique
et de la gynécologie
Université d'Alexandrie ;
Centre régional Suzanne Moubarak
pour la Santé et le Développement
de la Femme
Rue Abdel Hamid Badawy
21653 Alexandrie
Égypte

Virginie Schabo

Service de biologie de la reproduction
CHU de Bordeaux
33000 Bordeaux

Gilles Schemoul

Centre d'imagerie de la femme
6, place Pierre Sépard
94130 Nogent-sur-Marne

Jacqueline Selva

Labo PMA
Service de biologie de la reproduction
et cytogénétique
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78300 Poissy

Nathalie Sermondade

Service d'histologie-embryologie-cytogénétique
CECOS
CHU Jean Verdier
Avenue du 14-Juillet
93140 Bondy ;
Unité de recherche en épidémiologie
nutritionnelle,
UMR U557 Inserm ;
U1125 Inra ;
CNAM ;
Université Paris 13,
93017 Bobigny

Jérémy Seror

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 Paris

Catherine Serres

Service d'histologie embryologie
à orientation en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
213, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Edouard J. Servy

The Servy Institute
812 Chaffe avenue
Augusta, Georgia 30940
États-Unis

Christophe Sifer

Service d'histologie-embryologie-cytogénétique
Centre hospitalier universitaire Jean Verdier
Avenue du 14-juillet
93143 Bondy

Gérard Tachdjian

Service de biologie et génétique
de la reproduction
Hôpital Antoine Béchère
157, rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart

François Thépot

Agence de BioMédecine
1, avenue de Stade de France
93212 La Plaine Saint-Denis Cedex

Nicolas Thiounn

Service d'urologie
Hôpital européen Georges Pompidou
20, rue Leblanc
75015 Paris

Xavier Tran

Service gynécologie obstétrique
et médecine de la reproduction
Polyclinique
CHU Clermont-Ferrand
Boulevard Léon-Malfreyt
63058 Clermont-Ferrand Cedex 1

Catherine Uzan

Institut Gustave Roussy
39, rue Camille-Desmoulins
94805 Villejuif

Pierre Vanderzwalm

Centre hospitalier inter-régional Cavell
(CHIREC)
Hôpital Braine l'Alleud
Rue Wayez, 35
1420 Braine l'Alleud-Bruxelles
Belgique

Sabine Vanderzwalm

Centre hospitalier inter-régional Cavell
(CHIREC)
Hôpital Braine l'Alleud
Rue Wayez, 35
1420 Braine l'Alleud-Bruxelles
Belgique

Anna Veiga

Institut Dexeus
Sabino de Arana 5-19
08028 Barcelone
Espagne

Valérie Vernaeve

Clínica Eugin
Entença 293 Baixos
Barcelona 08029
Espagne

Muriel Viala Trentini

CMC Beausoleil
119, avenue de Lodève
34070 Montpellier

François Vialard

Laboratoire d'histologie, embryologie,
biologie de la reproduction,
cytogénétique et génétique médicale
EA 2493
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy cedex

John de Vos

Inserm U847,
Service d'hématologie
Pôle biologie pathologies
Hôpital Saint-Éloi
IRB
80, avenue Augustin Fliche
34295 Montpellier Cedex 5

Robert Wainer

Service de médecine de la reproduction
Université Versailles
Saint-Quentin en Yvelines
CHI Poissy-Saint-Germain
10, rue du Champ Gaillard
78303 Poissy Cedex

Antoine Watrelot

Centre de recherche et d'étude de la stérilité (CRES)
Hôpital privé Natecia
22, avenue Rockefeller
69008 Lyon

Philippe Weber

Clinique du Diaconnat
14, boulevard Roosevelt
BP 2399
68067 Mulhouse Cedex

Diane Winaver

Service de gynécologie psychosomatique
Hôpital Bichat
46, rue Henri-Huchard
75018 Paris

Barbara Wirleitner

IVF Centers Prof. Zech-Bregenz
Römeistr. 2
6900 Bregenz
Autriche

Jean-Philippe Wolf

Service d'histologie embryologie à orientation
en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
123, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Chadi Yazbeck

Service de gynécologie obstétrique
Hôpital Bichat Claude Bernard
46, rue Henri-Huchard
75018 Paris

Mathias Zech

IVF Centers Prof. Zech-Bregenz
Römeistr. 2
6900 Bregenz
Autriche

Nicolas Zech

IVF Centers Prof. Zech-Bregenz
Römeistr. 2
6900 Bregenz
Autriche

Dominique De Ziegler

Service de gynécologie obstétrique II
et médecine de la reproduction
CHU Cochin Port-Royal
123, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Ahmed Ziyat

Service d'histologie embryologie à orientation
en biologie de la reproduction
Hôpital Cochin – Université Paris Descartes
123, boulevard Port-Royal
75014 Paris

Préface

L'aide médicale à la procréation (AMP) a conquis ces dernières années une place dans la panoplie des propositions médicales pour répondre au désir d'enfant.

Ce ne fut pas simple dans le contenu, car il faut bien dire que la maîtrise de la reproduction est quelque chose qui reste encore difficile et nous connaissons l'étendue de notre ignorance plus que l'efficacité de nos actions, que cela soit en médecine et plus particulièrement en procréation médicalement assistée et en psychologie ; ni dans la forme ni dans le fond car faut-il considérer la stérilité comme une maladie ? C'est une réponse positive qui a été faite par les pays riches qui ont appliqué à la lettre la définition proposée par l'OMS et dans laquelle la satisfaction des besoins primaires, comme celui du désir d'enfant, doit être favorisée.

C'est le cas dans nos pays « développés », au sein desquels il faut distinguer la France qui a, d'emblée, proposé ce traitement de façon solidaire, c'est-à-dire remboursé par la Sécurité sociale. Dans de nombreux pays, y compris européens, cet accès aux soins est modulé par les revenus et les possibilités financières des couples. Dans les pays en voie de développement, c'est encore pire. Or, et ceci est peut-être nouveau, il y a une prise de conscience que le traitement de l'infertilité est nécessaire même dans les pays à forte natalité. L'échelle collective ne remplace pas l'échelle individuelle. La souffrance d'une femme, qui ne peut être mère, est sans doute multipliée dans ces pays où s'associent un rejet social et un isolement confinant à la dépression voire au suicide.

Il est donc nécessairement indispensable de mettre en place dans tous les pays du monde la possibilité d'une prise en charge médicalisée de la fertilité. Celle-ci pourra s'accompagner d'une prise en charge plus globale de la sécurité de la grossesse, du bon déroulement fœtal et néonatal, de l'influence des maladies infectieuses sur l'état de santé de la mère et de l'enfant et de l'importance de l'environnement de la cellule familiale.

Un couple se déplace pour résoudre son problème d'infertilité, nous devons profiter de ce mouvement vers la médecine pour diffuser plus largement ses bons aspects de prévention et de consolidation de l'être humain.

Depuis trente ans, après l'installation de l'époque moderne du traitement de la fertilité, les progrès sont incessants. Il est probable que, dans le futur, la congélation des ovocytes modifiera complètement la proposition de fécondation *in vitro* et évitera en partie les congélations embryonnaires. Il est également probable que les connaissances génétiques, par des méthodes non invasives, permettront de mieux connaître la potentialité de chaque ovocyte, chaque spermatozoïde et de chaque embryon, que l'approche non invasive du développement embryonnaire sera une façon de déceler sans risque un certain nombre de malformations et, soyons-en convaincus, que l'étendue du champ des possibles est quelque chose de vertigineux.

Il est nécessaire, parallèlement à ces avancées techniques, de redéfinir ce qu'est le progrès pour l'homme et ne pas se contenter de répondre à la question du comment mais revenir aux fondamentaux, à savoir du pourquoi. Jusqu'où pouvons-nous proposer des techniques de procréation assistée ? Dans quelles mesures n'entraînent-elles pas une perte de la dignité de l'homme, soit parce qu'il s'agirait d'utiliser d'autres humains à ses propres fins (commerce des corps), soit parce que la sélection génétique serait à l'ordre du jour, sans fondement médical ?

C'est donc un véritable challenge pour tous les acteurs et les lecteurs de cet ouvrage que de s'imprégner en même temps des finesses techniques, qui régissent le maintien de la vie, que d'échanger, diffuser et s'intégrer au sein de la société dans des règles de bonnes conduites qui permettent que la notion de progrès thérapeutique prenne tout son sens en évitant les dérives et les utilisations purement mercantiles de ce pouvoir médical.

Professeur René Frydman

I Données fondamentales

J.C. Sadeu and D. Nogueira

Folliculogenesis and oogenesis *in vivo* and *in vitro*, in humans females

Introduction

Folliculogenesis in humans is a long-lasting process and its study is of great interest in the field of human reproduction. The exact factors and physiological mechanisms underlying initiation of follicular growth, selection and growth of follicles, and final follicular maturation is not fully understood. Elucidating the cascade of events involved in those developmental processes will help in preventing, diagnosing, treating female reproductive disorders, preserving and restoring female fertility, and achieving pregnancy. There is considerable ongoing research on the regulation of early-stage folliculogenesis, and recent findings suggest that female laboratory mice produce new oocytes throughout their reproductive lifespan (1). Although this observation challenges the current belief that new follicles are not generated in mammalian ovaries after birth, there is no direct evidence that new oocytes are ever produced in the human adult ovaries. At birth, the human ovary contains the complete number of oocytes that the female will ever have during her reproductive lifespan. The goal of this chapter is to provide the current views regarding the fundamental understanding of folliculogenesis, which is applied in both basic and clinical frameworks with which to better understand ovarian function. We will focus primarily on data pertinent to physiological events in human ovarian folliculogenesis, including the molecular and cellular mechanisms whereby follicular development is regulated with an emphasis on knowledge derived from knockout laboratory animal models.

Physiology of follicular development in humans

Human ovaries are enclosed in a tough fibrous capsule, the tunica albuginea (Fig. 1A), and consist of two major compartments: the outer cortex compartment

and the inner medullar compartment (Fig. 1B). The cortex compartment contains all the primordial follicles and remains of ruptured follicles embedded in vascular fibrous tissue. The blood and lymphatic vessels get access to the ovary through the inner medullar compartment. In humans, precursor cell populations that form primordial follicles are established during embryonic development. Precursors of gametes known as primordial germ cells (PGC) migrate from the yolk sac to the genital ridge/primordial gonad where they become oogonia by the seventh week of gestation. PGC proliferation occurs during migration and continues in the genital ridge (oogonia proliferation). At 5 weeks of gestational age, an estimated number of 7×10^2 to 8×10^2 GC are present in females. Oogonia are transformed into oocytes once they stop dividing and begin to undergo meiosis, which starts at around 11-12 weeks of gestation (2). During the meiotic process, oocytes progress through the different stages of meiosis: leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene (dictyate) (3) characterized by distinctive feature of the nucleus. Primary oocytes are those arrested at the dictyate stage of meiosis I (4). The total number of GC reach a maximum of 6×10^6 to 7×10^6 at 20 weeks of gestational age with two-third being primary oocytes. Follicular formation starts around the fourth month of fetal life, and between the sixth and the ninth month of gestation all the primordial follicles (oocytes) are formed. The number of oocytes in the ovaries at birth is determined by the duration and rate of oogonial proliferation as well as the extent of atresia. At birth, the total number of GC has been estimated at about 1×10^6 to 2×10^6 , of which around 6×10^5 to 7×10^5 represent primordial follicles. By puberty, there are only about 3×10^5 to 4×10^5 follicles that remain, with 95% of them representing the primordial follicle pool (2). Until they are activated to grow, follicles can remain at the primordial stage for several decades and they constitute the non-growing follicle pool (Fig. 1C). Both left and right ovaries are considered to have similar numbers of non-growing follicles (5). The process of growth and development

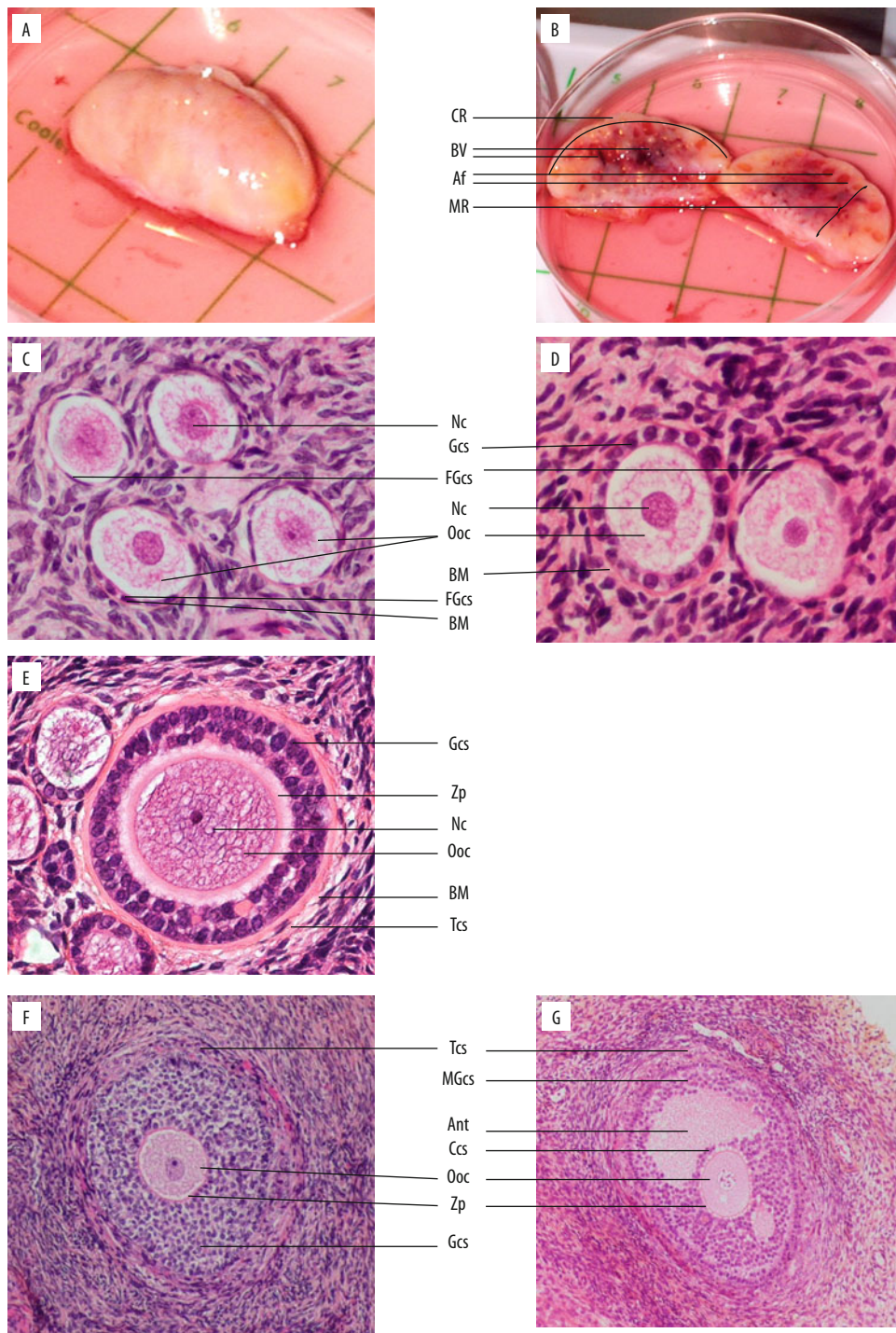


Fig. 1 – Overview of whole human ovary of a sexually mature female measuring about 4.2 cm in length and approximately 2.1 cm in width and 1.3 cm thick (A). Longitudinal section of the ovary (B) showing two distinct morphological organizations into a cortical region (CR) containing early-growing follicles and a medullary region that contains many blood vessels (BV), and pre-antral and antral follicles (Af). Histological sections of the cortical and medullary region (C-G) show follicles at different stages of development. Primordial follicles or the resting follicular pool is located in the ovarian cortex (C). The growing follicles include the following four stages: primary (D), secondary (E), tertiary (F), and antral (G). Flatnened granulosa cells (FGcs) form a single layer around the oocyte (Ooc) in primordial follicles (C) and differentiate into cuboidal cells to form a single layer of granulosa cells (Gcs) in the primary follicle (D). Granulosa cells proliferate to form two layers around the oocyte (Ooc) in the secondary follicle (E), multi-layered in the large pre-antral follicle (F) and multi-layered mural granulosa (MGcs) and cumulus cells (Ccs) surrounding the oocyte in the antral follicle (G). Af, semi-sectioned antral follicle; Ant, antrum/antral cavity; BM, basal membrane/basal lamina; BV, blood vessels; C, ovarian cortex; Ccs, cumulus cells; CR, cortical region; FGcs, flatnened granulosa cells; Gcs, granulosa cells; MGcs, mural granulosa; MR, medullary region; Nu, nucleus; Ooc, oocyte; Tcs, theca cells; Zp, zona pellucida. Original magnification $\times 200$ (C-E); $\times 100$ (F and G).

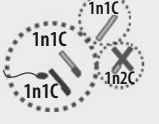
in the ovary of a primordial follicle containing an immature oocyte into a pre-ovulatory follicle containing a mature oocyte is known as folliculogenesis. Folliculogenesis in humans can be divided into two distinct phases: (i) gonadotropin-independent (pre-antral stages) and (ii) gonadotropin-dependent (antral stages). Each phase contains distinct follicle classes that are under the influence of locally produced (autocrine and paracrine) factors, hypothalamo-pituitary hormones and systemic growth factors. The first phase occurs over a period of about 300 days during which there is continuing recruitment and growth of non-growing follicles into primary follicles (initial follicle growth) followed by progressive growth of primary follicles into secondary (early follicle growth) and then large follicles (pre-antral follicle growth). The second phase that lasts for about 50 days and includes the growth of pre-antral follicles into early antral follicles is characterized by the appearance of small fluid-filled cavities that aggregate to form the antrum. Further accumulation of fluid in the antrum along with follicle growth leads to the development of recruitable follicles from which is selected the dominant follicle for growth into the pre-ovulatory follicle (6). In general, only one dominant follicle is selected for ovulation in women whereas the rest of recruited follicles undergo atresia. Therefore, it is estimated that only about 4×10^2 of the primordial follicles ever develop into ovulation during the entire women reproductive life. Throughout growth from the primordial to the pre-ovulatory stage, the follicle contains a diploid primary oocyte. The oocyte resumes meiosis upon the ovulatory gonadotropin (LH) surge, occurring at the end of the pre-ovulatory stage. The physiological relevance of this growth process is the expression and accumulation of gene programs required for fertilization and early cleavage. In general, growth and development of a non-growing follicle into a pre-ovulatory follicle occurs as the result of the following successive events: (i) initiation/activation of primordial follicle growth; (ii) early follicle growth; (iii) pre-antral follicle growth; and (iv) antral follicle growth and maturation of the pre-ovulatory follicle (Table 1).

Initiation of follicle growth (initial recruitment)

Entry of primordial follicles into the growing phase is known as initial recruitment and occurs continuously throughout reproductive life beginning during fetal development. It is considered to be regulated by the counterbalance of stimulatory and inhibitory hormones and/or growth factors of local and/or systemic origins. The general concept is that decline in primordial and/or primary follicle number is mainly caused by follicles leaving the non-growing pool to enter the growing pool. Consequently, initial recruitment has been studied by monitoring

changes in the number of primordial and/or primary follicles remaining in the ovary at any given time. Evidence from morphometric studies led to the suggestion that differentiation of granulosa cells from flattened to cuboidal represents one mechanism by which initiation of follicle growth occurs. However, a fundamental question that remained not fully answered is what are the factors triggering the initiation of follicle growth. This has been difficult to resolve in part because the primordial-to-primary follicle transition is a long-lasting process thus leading to difficulties in investigating the onset of follicle activation *per se*. Groups of follicles gradually and successively leave the follicle pool to enter the growing phase of folliculogenesis during fetal development and do not stop entering this phase until menopause. Three types of non-growing follicles have been distinguished on the basis of morphological features (7): (i) primordial, (ii) intermediary; and (iii) small primary follicles. These follicles have been shown to differ in diameters because of granulosa cell number and size but not oocyte and nuclear mean diameters. On the basis of these morphological features, the transition from primordial-to-small primary follicles has been considered a very slow maturation rather than a growing process (7). Nevertheless, Hirshfield (8) showed that small primary follicles were growing follicles. Upon entering the growing phase, primordial follicles pass through distinct stages of development and differentiation that are reflected in morphological changes and endocrine responsiveness. Taking this into consideration, to understand initial recruitment, it is necessary to understand the structure-function relationships of non-growing follicles. Morphologically, primordial follicles ($\sim 35 \mu\text{m}$ in diameter) consist of small primary oocytes ($\sim 32 \mu\text{m}$ in diameter), surrounded by a single layer of flattened or squamous (pre)granulosa cells and a basal lamina (Fig. 1C). These follicles do not contain any blood vessels (9) and are characterized by relative transcriptional and translational quiescence. Intermediary follicles ($\sim 38 \mu\text{m}$ in diameter) have an oocyte ($\sim 32 \mu\text{m}$ in diameter) surrounded by a mixture of flattened and cuboidal granulosa cells, whereas small primary follicles ($\sim 46 \mu\text{m}$ in diameter) consist of an oocyte ($\sim 33 \mu\text{m}$ in diameter) surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells (5). A mathematical model of follicular dynamics predicts that every day about 37 primordial follicles begin to grow in a 25-year-old woman. As the age increases, the population of non-growing follicles progressively decreases, leading to a reserve that is less than 10^3 follicles at the menopause occurring at the median age of 51 years (10). The decline in fertility begins generally in the fourth decade of life where a significant change in ovarian follicular dynamics occurs. The rate of primordial follicle exhaustion increases two- to threefold from

Table I – Stages of folliculogenesis respective to the stages of oogenesis in humans and mice.

Germ cell and follicle stages	Time span or period of existence	Cell cycle phase of germ cells	DNA status
Oogonia	Humans: fetus Mice: fetus, newborn	Mitosis	
		Interphase: G1, S (DNA replication), G2 Meiosis I: Prophase I: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene	
Primordial follicle (primary oocyte)	Humans: fetus, newborn to adult Mice: newborn to adult	G2/Prophase I* Arrest at diplotene (GV stage oocyte)	
Primary follicle (primary oocyte)	Humans: fetus, newborn to adult Mice: pre-puberty to adult	G2/Prophase I Diplotene (GV stage oocyte)	
Secondary follicle (primary oocyte)	Humans: fetus, newborn to adult Mice: pre-puberty to adult	G2/Prophase I Diplotene (GV stage oocyte)	
Tertiary follicle-early antral (primary oocyte)	Humans: fetus, newborn to adult Mice: prepuberty to dult	G2/Prophase I Diplotene (GV stage oocyte)	
Tertiary follicle-late antral (Graafian) (primary oocyte)	Humans: puberty (menarche) to adult Mice: puberty to adult	G2/Prophase I Diplotene (GV stage oocyte)	
Graafian follicle (pre-ovulatory oocyte)	Humans: puberty to adult Mice: puberty to adult	G2/Prophase I (GV stage oocyte)	
⇒ LH Surge			
Graafian follicle (pre-ovulatory oocyte)	Humans: puberty to adult Mice: puberty to adult	Diakinesis (fully chromosome condensation) (GV⇒GVBD⇒MI stage oocyte)	
Ovulatory follicle (secondary oocyte)	Humans: puberty to adult Mice: puberty to adult	Extrusion of the first polar body and oocyte arrest at metaphase of meiosis II (MII)	
		After fertilization, meiosis II in oocytes ends with the extrusion of the second polar body	

GV, germinal vesicle stage; GVBD, germinal vesicle breakdown; MI, metaphase I; MII, metaphase II.

*The oocyte is arrested at prophase of meiosis I, but the chromosomes have a structure characteristic of G2 of cell cycle.

around 37 years of age onwards till menopause is observed. This period is characterized by an elevated serum gonadotropin level. The mechanism(s) underlying the accelerated rate of follicular depletion remains unclear (11). This process has been attributed both to an absence of mature follicles that might negatively impact on initial recruitment through secretion of inhibitory factors and to intrinsic differences in follicle quality in the follicular pool reserve in perimenopausal women (12). It is also suggested that follicle depletion may be the result of increasing serum gonadotropin levels. Nev-

ertheless, changes in gonadotropin secretion could certainly also be due to diminishing inhibitory influence caused by lower number of growing follicles.

Intrafollicular and intraovarian regulators of initial recruitment

The actions of gonadotropins on primordial follicle recruitment remain debatable. Data from naturally occurring and induced deficiency of gonadotropins secretion have been contradictory. As studies showed, initial recruitment of follicles is arrested in anencephalic human fetus (13) but not

in hypophysectomized monkey fetus (14). Normal and spontaneous activation of primordial follicles occurred in follicle-stimulating hormone (FSH) β knockout mice (15) as well as in mice lacking FSH receptor (16), leading to the conclusion that primordial follicle recruitment is gonadotropin independent. However, a different conclusion is made in other studies. For instance, in hypophysectomized mice decreased initial recruitment of follicles was demonstrated (17). Likewise, in transgenic mice overexpressing a long-acting luteinizing hormone (LH), accelerated depletion of the non-growing follicle pool was shown (18). Furthermore, studies in female rhesus monkeys showed that LH-releasing hormone agonists (LHRHa) can significantly reduce the rate of primordial follicle depletion caused by a cytotoxic cancer therapy (19). Similarly, preliminary studies in humans showed that parallel administration of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist along with alkylating agents significantly decreased the incidence of premature ovarian failure (POF) caused by cancer therapies (20). These data indeed suggest that gonadotropins may be involved in primordial follicle recruitment. But what has been demonstrated is that primordial follicles do not have functional gonadotropins (FSH and LH) receptors (21, 22). Taking this into consideration, it is clear that any actions of gonadotropins on primordial follicles would likely involve indirect paths.

Because an increase in mean oocyte diameter is usually not observed until development of the primary follicle, it has been suggested that the oocyte may play a passive role in primordial follicle recruitment (23). However, what we note today are increasing evidences that primordial follicle recruitment is regulated by autocrine and/or paracrine signaling involving growth factors from not only the (pre)granulosa and the stromal interstitial cells, but also the oocyte. This knowledge has been derived mainly from animal models. Factors controlling primordial follicle recruitment include retinoblastoma (Rb) protein (24) and myc oncogene (25). Their expressions in the oocyte are associated with inhibition of granulosa cell proliferation (26) in non-growing and growing follicles.

Furthermore, several lines of evidence point to the role of anti-Müllerian hormone (AMH) as another regulator of primordial follicle activation. AMH inhibits primordial follicle recruitment into the growing phase of early folliculogenesis and is secreted by granulosa cells of growing follicles. The knockout mouse model homozygous for AMH showed an early depletion of the primordial follicle pool (27). AMH also appeared to modulate growing follicle sensitivity to FSH (28). AMH mRNA expression is shown to be regulated by the oocyte,

in which the action depends upon the stage of follicular development (29).

Targeted deletion of the Nobox gene showed the disruption of the primordial-to-primary follicle transition in mice (30). Similarly, deletion of Forkhead box L2 (FOXL2) resulted in a blockage of the follicles at the primordial and primary stages (31). Foxl2 is a transcription factor preferentially expressed in the pre-granulosa cells of mouse primordial follicles. *In vitro* follicle culture experiments have described actions of fibroblast growth factor (FGF)2 (32), FGF7 (33) and leukemia inhibitory factor (LIF) (34) in primordial-to-primary follicle transition. FGF2 is localized to the oocyte of primordial and growing follicles as well as in the granulosa cells (35), whereas FGF7 mRNA is detected in thecal cells and its receptors are expressed in the granulosa cells (36). As for LIF protein, FGF was shown in the granulosa cells of primordial and primary follicles in the mouse ovary (37). Although there are no data on FGF7-knockout mice fertility, FGF2 and LIF knockout mice are fertile, indicating that *in vitro* effects might not be relevant *in vivo*. However, in *in vivo* conditions deficiency of one growth factor could be compensated by other growth factors. Other factors implicated in initiating follicular growth include epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), and transforming growth factor (TGF) as well as factors that stimulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) production including vaso-active intestinal peptides (VIP), pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), and neurotrophins such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neutrophin-4 (38). The rate at which non-growing follicles are stimulated to grow is reported to be directly proportional to the number of follicles remaining in the non-growing pool (7). Thus, initial recruitment appears to be influenced by factors such as age, nutrition, cancer treatments, drugs, tobacco, and environmental contaminants. Genes that are critical in the primordial-to-primary follicle transition as well as the mechanisms involved in that process are illustrated in the review paper of Choi and Rajkovic (39).

Early follicle growth

Primary follicle (~46 μ m) development is characterized by the differentiation of spindle-shaped (pre)granulosa cells of primordial follicles (~35 μ m) into cuboidal-shaped granulosa cells (Fig. 1D). The major functional event in the primary follicle is expression of FSH receptor in granulosa cells (21). In the oocyte, there is genomic activation, followed by gene transcription (4). Ribosomal mRNAs are

synthesized and accumulate for production of proteins necessary for later stages of oocyte maturation. However, there is no consensus on the contribution of FSH in primary follicle growth. A study showed that high levels of plasma FSH accelerated primary follicle development (40). In the reverse, mouse knockout models for GnRH as well as FSH demonstrated that ovarian follicles have the capability to grow into the early antral stage (41, 42), suggesting a gonadotropin-independent pre-antral developmental period. Therefore, FSH positively influences the growth of primary follicles but is not obligatory for normal primary follicle growth. Oocyte growth during folliculogenesis was shown to be regulated by kit ligand (KL) and its receptor c-kit. Mice with mutations at the white spotting (W) or/and steel locus (Sl) showed a severe or mild defect in early follicular development (43, 44). The W and Sl locus encode c-kit (45) and KL (44), which are expressed, respectively, in the oocyte as well as theca cells and the granulosa cells. Neonatal mice treated with neutralizing antibodies against the c-kit receptor showed disrupted initial follicle recruitment, primary follicle growth, and antrum formation in large follicles (46). The clinical significance of c-kit is, however, not demonstrated because c-kit mutation in humans does not seem to affect female fertility (47). Therefore, the role of c-kit and KL in human ovarian function remains to be established. During the primordial-to-primary transition, the oocyte synthesizes the glycoprotein polymer zona pellucida (ZP) that forms a layer around the oocyte; genes encoding ZP-1, ZP-2, and ZP-3 are transcribed and translated, thus contributing to oocyte growth and maturation (48). ZP-3 has a particular significance in oocyte fertilization because it is the sperm-binding molecule indispensable for initiating the acrosome reaction in capacitated sperm. Other factors that have been implicated in primary follicle development include growth differentiation factor-9 (GDF-9) and bone morphogenic protein-15 (BMP-15/GDF-9B) (49, 50). Gene knockout technology revealed that these oocyte-derived factors as well as BMP-6 play key roles. They are obligatory for normal folliculogenesis and female fertility, and the clinical relevance is demonstrated by GDF-9 and BMP-15 expression in oocytes during early folliculogenesis in humans (51). Like most other members of the TGF- β superfamily, these factors act via membrane-bound serine threonine kinase receptors and are synthesized as prepropeptides, which must first be processed to the mature disulfide-linked dimers (52). The mature proteins then act via association mechanisms and complex phosphorylation cascades. Both GDF-9 and BMP-15 exert their biological effects by binding to the BMP receptors II (BMPRII). However, their downstream actions are mediated dif-

ferently. BMP-15 action is mediated by the BMP receptor 1B (BMPRIIB) and the Smad 1/5/8 proteins (53), whereas GDF-9 action is mediated by the TGF- β type-I receptor (also named ALK-5) and the Smad 2/3 (54). GDF-9 and BMP-15 principally control the primary-to-secondary follicle transition as will be described in the following section. Another important functional event in normal primary follicle development is establishment of specialized cell contact systems via adherents and gap junctions (7). Adherent junctions are association of filamentous dense proteins on the intercellular sides of the plasma membrane. They are essential to maintaining communication within the avascular granulosa cell layer.

Pre-antral follicle growth

The progression of a primary follicle into a secondary follicle (0.12-0.2 mm) is marked by the acquisition of at least two layers of granulosa cells and the recruitment of ovarian stroma (theca) cells aligned parallel next to the basal lamina (Fig. 1E). This transition involves oocyte-derived factors because evidence shows that targeted deletion of the GDF-9 gene in mice (55) or naturally occurring point mutations of the BMP-15 gene in sheep (56) causes an arrest in follicular development at the primary stage, thus compromising fertility. Likewise, folliculogenesis is blocked at the stage of primary follicle in Cx43-deficient mice (57). Cx43 is the major gap junction protein expressed in the granulosa cells for communication between themselves. Similarly, connexin Cx57 might also play a role in early folliculogenesis because Cx57 mRNA expression was demonstrated in post-natal mouse ovaries (58). The physiological significance of the gap junctions is permitting the diffusion of ions, metabolites, and potential signaling molecules such as cAMP and calcium (59). Granulosa cells of secondary follicles express FSH, oestrogen, androgen, and IGF-1 receptors (7, 21). As the secondary follicle increases in diameter, the stromal tissue differentiated into two theca layers: the inner theca interna and the outer theca externa (60). The theca interna, in secondary follicles, is composed of fibroblast-precursor cells containing LH and IGF-1 receptors as well as a network of blood vessels that contains one or two arterioles that terminate in a wreath-like fashion of capillaries adjacent to the basal lamina of the granulosa cells (61, 62). The physiological significance of these capillary vessels is delivery of nutrients and gonadotropins to, and collection of waste as well as synthesized factors from, the developing follicle. The theca externa is composed of undifferentiated theca cells (63). Upon completion of pre-antral fol-

llicle growth (Fig. 1F), the follicle contains a grown oocyte surrounded by a layer of ZP, layers (about nine) of granulosa cells expressing FSH, estrogen and androgen receptors, a basal lamina, a theca interna expressing LH receptors, a theca externa, and vascular as well as lymphatic circulatory networks. The physiological significance of LH receptor expression is the production of estradiol via the two gonadotropin-two cell theory (60). Activation of the LH receptors in theca cells by LH leads to production of androstenedione, which crosses the basal lamina into granulosa cells, where activation of the FSH receptors by FSH leads to production of P450 aromatase, which metabolizes androstenedione to estrogens (E_2). The plasma level of E_2 is the usual diagnostic marker for monitoring the physiological responses of endogenous or exogenous control ovarian hyperstimulation protocols in assisted conception gonadotropins in women.

Antral follicle growth

Antral follicle development is marked by the formation of a fluid-filled cavity within multi-layered granulosa cells (Fig. 1G), and is characterized by a phase of early antral follicle growth, follicle (cycle) recruitment, selection, and maturation of the dominant (pre-ovulatory) follicle. The pathways involved in the process of antrum formation are not fully understood. The factors described in rodents as possible signals involved are FSH (64), LH (65), activin (66), and KL (67); and in bovines, EGF (68). During the period of early antral follicle growth there is formation of small antral cavities (0.04 mm in diameter), which eventually aggregate to form a single large antral cavity. In humans, it takes approximately 25 days for pre-antral (0.12-0.2 mm in diameter) follicles to develop into early antral follicles (0.2-0.4 mm in diameter). The major physiological significance of antral cavity formation is to sustain follicular growth and development. It provides a unique intrafollicular microenvironment where essential nutrients and growth regulators derived from blood and follicular cells, such as gonadotropins, protein-bound and free sex steroids, proteins, proteoglycans, and electrolytes, are released. In that respect, follicular fluid has been used to determine not only biochemical predictors of oocyte quality in human assisted reproductive technologies (ART) (69) but also toxic chemicals that can affect ovarian function (70).

Antral cavity formation is characterized by differentiation of granulosa cells into four distinct subtypes: corona radiata that surrounds the zona pellucida, membrana that is interior to the basal lamina, periantral that is adjacent to the antrum, and cumulus oophorus that connects the membrana and corona radiata granulosa cells together (Fig. 1G). Each of

these cell types is known to respond differently to FSH actions, while follicular growth and development is associated with granulosa cell and theca cell differentiations. Increase in antral follicle size is resulting primarily from antral cavity formation. Over a period of approximately 70 days (two menstrual cycles), there is a 15-fold increase in follicle sizes, from 0.12-0.2 mm (pre-antral follicle) to 2-5 mm (recruitable follicle) in diameter.

Cyclic recruitment of antral follicles

It is suggested that once follicles reach the size of 5 mm in diameter, they become and remain dependent on cyclic FSH changes for continued growth and development into ovulation (7). Erickson and Shimasazi (50) suggested that growth factor-dependent signaling also play an important role in FSH-dependent further follicle growth. Cyclic recruitment and selection of the dominant follicle followed by maturation and ovulation of a pre-ovulatory follicle are critical orderly events occurring during the phase of antral follicle growth. Cyclic recruitment is a physiological process whereby a small cohort of antral follicles (2-5 mm) is rescued from atresia by the gonadotropin action. It is suggested that the ovaries of healthy young women could contain four to six healthy antral follicles measuring 0.9-5 mm in diameter, and that FSH must increase by 10-30% above basal levels to rescue (recruitment) a cohort of up to 15 follicles, measuring 2-5 mm in diameter, from atresia (71). Thus, circulating levels of FSH are associated with the number and quality of recruited follicles and are well applied in clinical practice as a diagnostic biomarker of ovarian function. Furthermore, high doses of recombinant FSH or human menopausal gonadotropin (hMG) are utilized in different stimulation protocols in ART for increasing the number of pre-ovulatory follicles that can be stimulated to mature in women. Given that FSH increase precedes follicle recruitment, it is considered that FSH receptor signaling plays a fundamental role in the mechanism of FSH actions on follicle recruitment. As demonstrated, in absence of FSH there is no follicle recruitment and selection, and consequently no ovulation (72). Meanwhile, increasing FSH levels promotes follicular fluid formation, granulosa cell proliferation, E_2 synthesis, induction of FSH and LH receptor expression in the granulosa cells, and of non-steroidal growth factors such as IGF-1, FGF, TGF- β , activin, and the aromatase enzyme complex (7). The induction of high levels of LH receptor expression does not occur until the follicle reaches the pre-ovulatory stage, and likewise, the aromatase enzyme complex is fully functional

only when the follicle exceeds the size of 10 mm (7). The largest follicles present at the beginning of the follicular phase contain the highest number of FSH receptors, which then provide them with a low FSH threshold (73). In that regard, largest but not smaller follicles can survive and respond to lower FSH levels for continued growth. The physiological importance of this functional difference is that the follicle selected for growth into a pre-ovulatory follicle is the one whose granulosa cells are most responsive to lower FSH levels. The selection of the dominant (pre-ovulatory) follicle occurs at the start of the follicular phase (day 5-7 of the menstrual cycle) where the largest healthy follicle is selected from the cohort of follicles between 5.5 and 8.2 mm in diameter (74). After the selection process, the non-selected follicles of the cohort inevitably undergo atresia.

Follicle dominance

The dominant follicle is characterized by its larger diameter, continued granulosa cells proliferation, presence of FSH and LH in the follicular fluid (74), and increased production of E_2 and inhibin. The mechanisms underlying the selection of a single dominant follicle are not fully elucidated. However, there is a general agreement that the induction of aromatase by FSH results in the rise in peripheral levels of E_2 , which in turn, along with inhibin, suppress FSH secretion such that plasma concentrations of FSH fall below the threshold, which is necessary to stimulate the development of less mature follicles. Furthermore, the concurrent induction of LH receptors on granulosa cells by FSH is thought to provide the dominant follicle with an additional source of gonadotropic support that enables its continued growth in the presence of FSH concentrations, which are insufficient to support the development of other follicles (75). The clinical relevance of E_2 in dominant follicle selection is demonstrated in stimulation protocols in ART where anti-estrogen clomiphene is used to block the biological actions of estrogen, thereby causing an increase of gonadotropin secretion levels and then maturation of more than one pre-ovulatory follicle (76).

Ovulation

Maturation and ovulation of the pre-ovulatory follicle occur during the final period of antral follicle growth. The dominant follicle destined to ovulate becomes a pre-ovulatory follicle (20 mm) through continued granulosa cell proliferation, theca cell

vascularization and hypertrophy, and further accumulation of follicular fluid in the antral cavity until the ovulatory LH surge. There is a noticeable increase in LH production along with mural granulosa cell expression of LH receptors. Approximately 10 days after selection, the diameter of the dominant follicle had considerably increased from 8 to 20 mm. As the pre-ovulatory follicle matures, it increasingly synthesizes E_2 , which correlates with an increase in aromatase expression in granulosa cells. The onset of the LH surge induces terminal differentiation of granulosa cells and their expression of luteal-specific genes (77). There are noticeably decreased levels of intrafollicular E_2 and androstenedione with increased levels of progesterone and 17- α -hydroxyprogesterone (78). Upon reaching 20 mm in diameter, the pre-ovulatory follicle is considered mature and will be triggered to ovulate when stimulated by the LH surge; if LH surge fails to occur then the follicle simply degenerates. The mid-menstrual cycle gonadotropin LH surge suppresses the action of oocyte maturation inhibitors, allowing the diploid primary oocyte to be arrested in the dictyate stage of prophase I to resume meiosis and proceed to metaphase II (79). An LH threshold must be reached and maintained for 14 to 27 h for complete oocyte maturation to occur (80). A detailed description of the physiological events underlying oocyte maturation can be found in this book. At ovulation, the oocyte is then a haploid cell arrested in metaphase II and measures approximately 120 μ m in diameter. The process of ovulation takes approximately 36-38 h in humans and the LH surge is terminated by negative feedback of progesterone and 17 β -hydroxyprogesterone on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis (7). Following the onset of LH surge, there is a series of events that lead to the rupture of the pre-ovulatory follicle (81). The LH action induces the suppression of granulosa cell mitosis stimulating granulosa cell luteinization, stimulates a decrease in estrogen and androgen levels in follicular fluid, and induces the expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) or cyclooxygenase (COX-2) and progesterone receptors (PR) in the granulosa cells.

Various proteases are synthesized to modify the extracellular matrix integrity, a process controlled by PR and PGS-2. Other physiological mechanisms involved in the degradation of the extracellular matrix include the dissociation by the PR and PGS-2 of fibroblasts and collagen of the theca externa and tunica albuginea on the apex of the follicle as well as the production of interleukin-1 and chemokines. Vascular endothelium growth factor (VEGF) that is responsible for initiation of angiogenesis also plays a very important role. The ovarian surface epithelium and the collagen within the follicle wall are

therefore degraded by the various proteases (metalloproteinases) activated by PR and PGS-2, leading to ovulation. A recent study showed that mice lacking the genes encoding extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) proteins were unable to ovulate despite exposure to LH. Moreover, the granulosa cells did not differentiate into luteal cells and produce progesterone. ERK1 and ERK2 are therefore the latest identified signaling molecules essential for ovulation (82).

Corpus luteum formation

Following ovulation, the remnant of the ovarian follicle reorganizes to form the corpus luteum (CL). This process is called luteinization and involves varying cell-matrix interactions. It has been shown that cell-cell adhesion strongly correlates with maturation and integration of CL (83). Although the mechanisms underlying luteinization remain not fully characterized, there is no doubt as to the central role of LH in its initiation and maintenance of CL function. Under the influence of LH, there are both hypertrophic enlargement and hyperplastic increase in the number of luteinized theca and granulosa cells lining the empty follicular cavity. Furthermore, VEGF and its receptors Flt-1, which are expressed on luteinizing granulosa cells, as well as ERK1 and ERK2 (82) are also thought to be involved in CL development. As shown by Senger *et al.* (84), the suppression of VEGF leads to almost complete suppression of CL formation. The CL is a temporary endocrine gland, which mainly secretes progesterone but also E_2 . Serum progesterone levels increase as CL grows and develops, and are used in clinical practice as one of the diagnostic biomarkers of ongoing pregnancy. The function of progesterone is to induce the necessary changes needed for endometrial receptivity and anticipation of embryo implantation. Progesterone promotes mammary gland development, increases uterine gland secretion, and inhibits uterine motility to promote implantation and sustain pregnancy. High levels of progesterone decrease LH pulse frequency and cause turnover of non-ovulatory dominant follicles. After its functional span, the CL spontaneously regresses, to be replaced (unless pregnancy occurs) by an avascular scar referred as the 'corpus albicans'. The process of CL regression is known as luteolysis and involves prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (85) and apoptosis (86). In a non-fertile cycle, CL regression occurs during the late luteal phase of the menstrual cycle. This causes a decrease in progesterone, E_2 , and inhibin A, which allows an increase in FSH levels approximately 12 days from the preceding mid-cycle LH surge, leading to a new

cyclic recruitment of a small cohort (four to six) of follicles (2- to 5-mm diameter) into the follicular phase of the following menstrual cycle.

Atresia

The vast majority of growing follicles are lost via atresia, which is mediated by a highly organized type of cell death called apoptosis or programmed cell death (87). More than 99% of follicles within human ovaries at the time of birth never reach ovulation. This is considered an essential physiological phenomenon in maintaining ovarian homeostasis. The consequence of this ongoing follicle loss is eventually menopause whereas a premature excessive loss of follicles frequently results in diminished reproductive potential or infertility. Although apoptosis has been described in the non-growing human follicles (88) just as Bcl-2 and/or Bax expression has been demonstrated in primordial follicles (89), there is no common consensus as to whether follicular atresia also occurs in the non-growing follicle pool. The rate of atresia is thought to be cyclic-independent in the smallest growing follicles (0.12-2 mm). It is estimated at 30% and 35% in pre-antral (0.12-0.2 mm) and early antral follicles (0.3-0.4 mm), respectively, and at 15% and 16% in 0.5- to 0.9- and 1- to 2-mm follicles, respectively. On the contrary, in largest growing follicles (2-10 mm) atresia occurs in a cyclic-dependent manner and is strongly correlated with FSH levels. The highest incidence of atresia is observed during the mid-luteal cycle where about 73% and 100% of 2- to 5- and 6- to 10-mm follicles, respectively, are atretic (7). The correlation between follicular atresia and the biochemical composition of follicular fluid for the following metabolites: 3β -HSD, glucose-6-phosphate dehydrogenase, acid phosphate, aminopeptidase, lactate dehydrogenase, and the presence of lipid droplets, has suggested that metabolic changes in atretic follicles would be reflected in the follicular fluid and therefore affect both the oocyte and the granulosa cells. Oxidative stress (reactive oxidative species) as well as various hormones, genes, and pathways are involved in the mechanisms underlying follicular atresia, and include apoptosis-regulating factors such as gonadotropins, high androgen/estrogen ratio, Bcl-2, Bax, p53, TGF- β , FGF, EGF, and GATA-4; reviewed in Tilly *et al.* (90).

Oocyte development

The human GV-stage oocyte, the largest cell in a woman's body, grows from a diameter of $\approx 35 \mu\text{m}$ up

to a variable final oocyte diameter of 110-120 μm . Primary oocytes within primordial follicles are in a latent growth phase with the nucleus resting at the dictyate-prophase stage of meiosis I. However, these oocytes undergo continuous nuclear and cytoplasmic changes with RNA polymerase activity, uptake of amino acids and ribonucleosides, and renewing of macromolecules and organelles to sustain its life span that may take up to a few decades. The growth of the oocyte mainly takes place into the pre-antral stage, but in humans the final diameter is only obtained in the antral stage (7). The ability of mammalian oocytes to undergo meiosis is acquired during their growth phase; it is related to a species-specific size of the oocyte (mice: 70-80 μm (91); bovine: 100-110 μm (92); man: 90-120 μm (93)) and does not necessarily correlate with the maximal oocyte diameter.

When follicles leave their resting pool, primary oocytes are arrested at the prophase I stage and are maintained at this stage during the whole period of follicle growth up to the peri-ovulatory antral stage. During this period, however, there is a significant increase in oocyte volume and intense cytoplasmic modifications. Growing oocytes undergo gradual synthesis and storage of RNA and proteins that are sequentially required for oocyte growth and to sustain oocyte maturation and early embryonic formation. The rate of RNA synthesis in growing oocytes occurs concomitantly with its expansion in volume and is two- to threefold higher than that in non-growing or fully grown oocytes (94, 95). The nucleolus is very active in transcription and contains well-defined fibrillar and granular structures (non-surrounded nucleolus, NSN) (96). During this period of growth, there is augmented proliferation of a number of cytoplasmic organelles (Golgi complexes, mitochondria, endoplasmic reticulum) followed by their translocation regulated by a framework of microtubules (97). These organelles are involved in the formation of the zona pellucida in oocytes enclosed in secondary follicles. At this follicular stage, gap junctions have developed between oocyte and granulosa cells, and the first clusters of cortical granules produced by Golgi complexes appear in the cytoplasm.

The production of a viable oocyte in a non-atretic pre-ovulatory follicle is dependent on the influences of gonadotrophin action on follicular development, granulosa cell differentiation, and oocyte-granulosa cells interactions, which are intimately associated and interdependent. As occurs in mammalian species in general, as the size of follicles increases, the oocyte develops cellular processes that are critical for later maturation and are involved in developmental success before and after activation of the zygotic genome. These ooplasmic changes include the buildup and

storage of transcripts (98, 99), synthesis and accumulation of proteins (100), and post-translational modifications such as phosphorylation (101). Some of these proteins are checkpoint molecules such as maturation-promoting factor (MPF) and protein kinase *mos*, which are involved in meiotic progression and cell cycle control (101). Other important intra-cytoplasmic modifications are microtubular and microfilament rearrangements, which participate in the migration of organelles during oocyte development. Later, these microtubules and microfilaments participate in the formation and migration of the metaphase spindle during maturation and are a crucial factor for the actual division of the embryonic cells. Ultrastructural changes such as the dispersion of elongated mitochondria and the migration of cortical granules to the oocyte surface take place, which are the ultrastructural modifications occurring throughout the later stages of folliculogenesis before the LH peak (102). Biochemical modifications take place prior to ovulation such as the increase in the content of glutathione (GSH), which protects the cell against oxidative stress (103). After fertilization, GSH participates in sperm decondensation in parallel with oocyte activation and in the transformation of the fertilizing sperm head into the male pronucleus (104).

A specific nuclear modification is the progressive condensation of chromatin that undergoes the transition from NSN to a surrounded nucleolus (SN) (96, 105). At the end of the oocyte growth phase, the rate of RNA synthesis falls distinctly, but a significant level of synthesis continues until it ceases at the breakdown of the germinal vesicle. Within an egg, RNA stores are used immediately following fertilization to initiate the assembly of the embryo. At this stage in time, the nucleus constitutes an SN configuration, as has been shown in oocytes from rodents and large mammalian animal species, except goat and equine oocytes, and in humans (106, 107). In human and mouse oocytes, SN configuration positively correlates with global transcription cessation *in vivo* and *in vitro*, imprinting of maternal alleles, acquisition of meiotic, and embryonic developmental competence (96, 107, 108).

Acquisition of nuclear competence

Nuclear competence in human oocytes is gradually acquired throughout folliculogenesis. Meiotic arrest is sustained by different mechanisms related to the stage of development of the follicle that encloses the oocyte. Growing human oocytes enclosed in primary, secondary, and early antral follicles are arrested at prophase I and are germinal

vesicle breakdown (GVBD)-incompetent. Oocytes enclosed in follicles that have not yet reached a species-specific minimal diameter are incapable of undergoing GVBD. Up to this point, cell cycle regulatory molecules that are essential for meiosis progression have not yet been synthesized by the oocytes in sufficient quantities and/or these molecules are not yet correctly positioned within the oocyte (109). The GVBD-competent oocytes enclosed in antral follicles are then arrested at prophase I. Several natural factors originating in ovarian somatic cells and follicle fluid such as nucleotides, sex steroids, proto-oncogene c-kit ligand, and oocyte maturation inhibitor(s) (OMI) are involved in the inhibition of spontaneous resumption of meiosis. Although OMI have not yet been fully characterized, the certainty of their involvement in the regulation of meiosis is based on the fact that: oocytes removed from their follicles undergo meiotic maturation spontaneously, whereas follicle-enclosed ova remain immature until stimulated; co-culture of oocytes isolated from their follicles with follicular granulosa cells, theca cells, and follicular fluid inhibits spontaneous maturation; the inhibition of oocyte maturation can be overridden by the addition of LH (110). Furthermore, concentrations of OMI decrease with increasing follicle diameter (111). In antral and pre-ovulatory follicular stages, importantly functioning as an inhibitory factor is the oocyte interaction with the surrounding follicle fluid caused by the presence of the purine hypoxanthine and its interaction with surrounding somatic cells, maintaining and sustaining the oocyte with appropriate levels of cAMP (112). Evidence that intra-oocyte cAMP hydrolysis is responsible for the occurrence of meiosis resumption in human oocytes can be found in the fact that inhibitors of the cAMP degrading phosphodiesterase (PDE) isoenzymes block spontaneous maturation *in vitro* (113-115).

Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation

Nuclear maturation of the oocyte comprises nuclear modifications that take place during the resumption of meiosis to metaphase II. Upon LH surge, prophase I GV-stage oocytes undergo GVBD, or dissolution of the nuclear membrane, followed by condensation of chromatin in bivalents that align at the equator of the first meiotic spindle. Subsequently, bivalents separate during anaphase/telophase transition and half of the chromosomes are extruded by cytokinesis forming the polar body (PB). This separation is completed with the formation of the metaphase-II plate (prophase II stage is absent), and at this stage, the oocyte awaits the

moment of sperm penetration to finalize the second meiotic process (Table I). Oocytes are arrested in the second meiotic division when ovulated (one chromosome, 1n containing two sets of DNA, 2C). The second meiosis in females is not completed until after fertilization, and in fact, an oocyte becomes a "truly haploid cell" (1n1C) only after fertilization because the second DNA set is expelled in a second PB when the sperm cell enters the egg carrying another DNA set (1n1C), thus forming a 2n2C cell (i.e., zygote). Resumption of meiosis involves several signal transduction pathways. The best-known action mediated by cAMP is the activation of PKA (116). Downstream of PKA deactivation, MPF, mitogen-activating protein kinase (MAPK), and other cyclin-dependent kinases (cdks) function simultaneously and interact as crucial regulators in the oocyte meiotic cell cycle (101). The rate of synthesis and control of activation of these factors are species-dependent.

Cytoplasmic maturation of the oocyte is defined as all the alterations in the ooplasm that are essential for fertilization and optimal pre-implantation embryonic development. Oocytes undergo "capacitation" before the resumption of meiosis, which is the ability of the oocyte to reach the cytoplasmic aspects of maturation including the accumulation of proteins and short poly-A tails mRNAs to be used during maturation and at the first stages of embryo development (117).

Oocyte-granulosa cell interactions during follicle development

Communication between the oocyte and its somatic cells counterparts is essential for successful development of both follicular compartments. Oocyte-granulosa cell coupling become much more intense after initiation of follicle growth. The cells of the granulosa and theca support the oocyte by providing essential nutrients, growth factors, and hormones for the oocyte-deficient processes (118-120). Currently, it has become evident from animal studies that the oocyte itself plays an active and primordial role in regulating the rate of follicle growth through mainly paracrine but also juxtacrine signals (119). Oocytes coordinate follicular development by synthesizing and releasing factors that regulate granulosa cell proliferation, function, survival and differentiation, the recruitment of theca cells, and the secretion of extra cellular matrix components (120, 121). Oocytes are essential for the initial organization of primordial follicles, and promote the primary to secondary follicle transition (119, 122, 123) and the pre-antral to antral follicle transition (124, 125). Oocytes control granulosa cell proliferation and differen-

tiation before LH surge (120, 126), cumulus cell metabolism, particularly glycolysis and cholesterol biosynthesis (127), cumulus expansion, and ovulation after the LH surge (128). GDF-9 and BMP-15 are key oocyte-derived paracrine factors that have been described to be involved in the above-mentioned steps.

***In vitro* folliculogenesis**

Validation

Over the past few years, advances in the diagnosis and treatment of childhood, adolescent, and adult cancer have greatly enhanced the life expectancy of cancer patients. With current treatment regimens, which include aggressive chemotherapy, radiotherapy, and bone marrow (BMT) or stem cell transplantation (SCT), cure rates for some malignancies can exceed 90%. However, the use of alkylating agents of chemotherapy as well as radiotherapy often causes a POF, rendering the patient infertile. This has resulted in a growing number of cancer survivors facing infertility problems and consequently an increased interest in the effects of chemo- and radiotherapy on ovarian function as well as on the development of fertility preservation methods.

Besides being a consequence of oncological treatments, POF may also occur in women with genetic and autoimmune diseases as well as following recurrent ovarian diseases or bilateral oophorectomy. Ovarian tissue cryopreservation with transplantation or culture provides a promising method for restoring fertility in these patients.

Cryopreservation of ovarian tissue with transplantation has been successful in restoring fertility in humans (129-133). However, there are concerns about ovarian tissue transplantation because grafted tissue could potentially harbor malignant cells, thereby causing relapse of the disease (134). Although many types of cancer never metastasize to the ovaries, leukemia and neuroblastomas are thought to be of a high risk along with breast cancer, which is of a moderate risk (135). Cryopreservation of ovarian tissue with transplantation may therefore not be safe for a significant number of cured cancer patients. Consequently, cryopreservation of ovarian tissue with subsequent *in vitro* growth of oocytes appears to be the safest possible option for overcoming potential risks of malignant cell transmission through ovarian transplants. Unlike ovarian tissue, which may harbor cancer cells, fully matured oocytes are free from any contamination.

Experiences from *in vitro* follicular growth

The ovarian cortical tissue is mainly populated with primordial follicles, which are the major source of immature oocytes for *in vitro* folliculogenesis. Ovarian cortical tissues used for research are obtained occasionally from consenting patients including patients undergoing sterilizing hysterectomy or oophorectomy, and infertile women undergoing laparotomic or laparoscopic surgery, as well as through ovarian biopsies collected during caesarean section. Fetal ovaries (from second or third trimester aborted fetuses) and ovarian tissue from pre-pubertal girls provide the optimal samples with the largest number of primordial follicles per volume unit (136-138). The large ovary size in humans and larger animals does not allow them to be cultured as an entire organ because the nutrients are not able to diffuse through the different structures of the ovary. Difficulties in gas exchange and accumulation of waste metabolites usually leads to necrosis. For these reasons, follicles from larger mammals are often cultured within thin pieces of ovarian cortex (139-141). Culture of ovarian cortex has the advantage of preserving the structural integrity of the tissue, which includes the physical interaction between the follicles and surrounding interstitial tissue.

Follicular culture strategies

Refinements and adjustments in culture procedures have resulted in an improvement in the production of mouse embryos capable of developing to full-term offspring (142-144). Unfortunately, the progress in follicle culture in humans and larger animal species is slow. Basically, three major approaches in follicle culture techniques can be distinguished: culture of ovarian cortical tissue (humans and larger animals), culture of entire ovaries (rodents), and culture of isolated follicles (humans, larger animals, and rodents) (Table 2).

Culture of ovarian cortical tissue

Fragments of ovarian tissue or biopsies are usually cut into thin small pieces of cortex measuring $\sim 1 \times 1 \text{ mm}^2$ area and 0.1-1 mm thickness (138-141, 145). Such a small size is preferred because it offers an increased surface area to volume ratio, allowing better contact with media and gas exchange (146). Several basal culture media have been used to grow human follicles either within ovarian cortical tissue or as isolated follicle units (Tables 3 and 4), and include balanced salt solution (BSS), Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), or adoptive immunotherapy media-V

Table II – Comparison between cortical fragments or whole ovary and isolated follicle culture techniques.

	Cortical fragment or whole ovary culture	Isolated follicle culture
Technically	Easy	Difficult
Cellular interactions	Preserved	Distorted
Monitoring during culture	Impossible	Possible
Culture of empty pieces	Possible	Identifiable follicles
Effect of stroma	Preserved	Removed
Low follicle number	Not suitable	Suitable

Table III – Summary of studies on *in vitro* culture of human ovarian tissue.

References	Basal medium	Supplements	Periods of culture (days)	Outcomes
Zhang <i>et al.</i> (136)	Waymouth	FBS, FSH, I	25 + 40	MII oocytes
Hovatta <i>et al.</i> (139)	α MEM/EBSS	Serum, FSH, LH	21	Follicle survival and growth
Wright <i>et al.</i> (147)	α MEM/EBSS/Waymouth	Serum/HSA-ITS, FSH	10	Follicle growth
Hovatta <i>et al.</i> (148)	EBSS	Serum, FSH	28	Follicle survival and growth
Louhio <i>et al.</i> (149)	EBSS	Serum, FSH, I, IGF	14	Follicle growth
Rahimi <i>et al.</i> (140)	DMEM	FBS, FSH	45	Decrease in apoptosis
Hreinsson <i>et al.</i> (150)	α MEM	Serum/HSA, ITS, FSH, cGMP, GDF-9	7	Follicle survival and growth
Otala <i>et al.</i> (141)	EBSS	Serum, FSH, NAC	21	Inhibition of apoptosis
Isachenko <i>et al.</i> (151)	DMEM	FCS, β -mercaptoethanol, FSH	21	Follicle survival and steroid production
Biron <i>et al.</i> (137)	Serum-free medium	FBS, FSH	28	Follicle survival
Otala <i>et al.</i> (152)	Ham's F10	FSH, I, HSA, T, DHT, E	1	Follicle survival, androgen receptor expression
Scott <i>et al.</i> (146)	α MEM	HSA, FSH, ITS	14	Follicle survival and growth
Zhang <i>et al.</i> (153)	α MEM	Serum, cAMP	21	Follicle survival and growth
Schmidt <i>et al.</i> (154)	α MEM	HSA, EGF, ITS, FSH, LH, AMH	28	Stimulation of follicle growth initiation
Sadeu <i>et al.</i> (138)	Serum-free medium	None	63	Follicle survival and growth
Carlsson <i>et al.</i> (155)	EBSS	Serum/HSA, FSH, KL	14	Follicle survival
Carlsson <i>et al.</i> (156)	α MEM	HSA, FSH, ITS, cGMP, AMH	7	Inhibition of follicle growth initiation
Isachenko <i>et al.</i> (145)	IMDM	FCS, EGF, FSH	14 or 42	Follicle morphology
Isachenko <i>et al.</i> (157)	AIM-V	None	14	Follicle survival and steroid production
Morimoto <i>et al.</i> (158)	α MEM	FCS, FSH, HCG	15	Follicle growth and steroid production
Sadeu and Smitz (159)	Serum-free medium	None	28	Follicle growth and GDF-9/AMH expression
Isachenko <i>et al.</i> (160)	AIM-V	HSA	16	Follicle survival and steroid production
Telfer <i>et al.</i> (161)	Mc Coy 5a	BSA, ITS, Activin A	4	Secondary follicle development

AMH, anti-Mullerian hormone; BMP, bone morphogenetic protein; bFGF, basic fibroblast growth factor; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; DHT, dihydrotestosterone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EBSS, Earle's balanced salt solution; IMDM, Iscove's modified Dulbecco's medium; EGF, epidermal growth factor; E, 17-oestradiol; FBS, fetal bovine serum; FCS, fetal calf serum; FSH, follicle-stimulating hormone; GDF-9, growth differentiation factor 9; HSA, human serum albumin; ITS, insulin, transferrin, selenium; IGF, insulin-like growth factor; KL, kit ligand; KGF, keratinocyte growth factor; LIF, leukemia inhibitory factor; LH, luteinizing hormone; MEM, minimum essential medium; NAC, *N*-acetyl cysteine; PDGF, platelet-derived growth factor; T, testosterone; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Table IV – Summary of studies on culture of isolated follicles in humans.

	Follicular stages	Isolation technique	Basal medium	Supplements	Period of culture (days)	Outcomes
Roy and Treacy (162)	Pre-antral	Enzymatic	DMEM	BSA, ITS, FSH	5	Antral follicle development
Abir <i>et al.</i> (163)	Pre-antral and early antral	Mechanical	α MEM	Serum, FSH/LH	28	Antral follicle development
Roy and Terada (164)	Pre-antral	Enzymatic	DMEM	BSA, ITS, FSH/LH/IGHI/EGF/TGF β 1	1	Glucose metabolic capacity
Abir <i>et al.</i> (165)	Primary and secondary	Enzymatic	EBSS	FBS, FSH	1	Secondary follicle development
Abir <i>et al.</i> (166)	Pre-antral	Enzymatic	EBSS	FBS/serum + FSH	1	Follicle survival and growth
Telfer <i>et al.</i> (161)	Secondary	Mechanical	Mc Coy 5a	BSA, ITS, activin A	6	Antral follicle development
Xu <i>et al.</i> (167)	Secondary	Enzymatic	α MEM	SPS, BF, ITS, FSH	30	Antral follicle development

NCSU, North Carolina State University medium; TGF β , transforming growth factor β ; BF, bovine fetuin; SPS, sodium polyanethol sulfonate.

(AIM-V) (139, 145), minimum essential medium alpha (aMEM) or D-minimum essential medium (D-MEM) (147, 162-164), and Waymouth's medium (136). Insulin, transferrin, and selenium (ITS) alone or in combination with human serum albumin (HSA) and/or serum have been the major components added to the media as supplements with the aim of supporting metabolic and hormonal activities *in vitro*. The culture containers have been varied, from simple test tubes to plastic culture dishes (136, 138). Well plates have been combined with either uncoated (139, 163) or coated tissue culture inserts (136, 137, 139, 146, 150). The extracellular matrix (ECM) compounds utilized to coat the inserts have included collagen I (165, 166), a mixture of laminin, collagen IV and proteoglycans (139), and collagen I and collagen III (136). Additionally, agar (162), collagen gels (168), and alginate-extracellular matrix gels (167, 169-173) have also been used to grow isolated follicles. These supporting components help in preserving the three-dimensional structure of the follicles and the cohesion of follicle cells *in vitro*, thereby approximating the *in vivo* conditions, which are desirable to maintain physiological control mechanisms during culture.

Culture of isolated follicles

Culture of isolated follicles has been confined to the study of primary and secondary follicles. These follicles have been isolated from humans (Table 4) (148, 161-163, 171), goat (174), sheep (175-177), bovine (68, 178-181), pigs (182-184), and rodents' ovaries (142-144, 185-189), and grown in culture to various stages of folliculogenesis.

Activation of primordial follicles cultured within tissue slices

Knowledge on the effects of growth factors on the activation of resting primordial follicles into the growth phase and subsequent development has been obtained mainly from animal models (Fig. 2). Several culture media used to grow human follicles *in vitro* have been supplemented with these growth factors to assess their potential physiological significance in regulating the earliest stages of follicular development in humans. The concentrations selected for use in the different media are usually chosen based on the 'à la volonté' principle. That is, the dose-response effects of a growth factor on follicles are measured after culture, and the results are used to select the concentration at which an optimal response is observed. All existing protocols for the culture of human follicles have used tissues from either adult (139, 152, 159) or fetal (136-138) ovaries. The development of follicle culture systems for larger mammals has been attempted in several species including goat (190), sheep (191), bovine (192, 193), and baboon (194). Data from follicle culture studies in humans (150) and rodents (188, 195) showed that recombinant GDF-9 enhances the development and growth of early-stage follicles. This *in vitro* observation suggested that GDF-9 might have supportive effects in human ovarian follicles. The beneficial effects of several components added to culture media on the activation and/or regulation of the processes of early folliculogenesis *in vitro* have been reported in several studies. Supplementing the medium with FSH (147), insulin, IGF-I and -II (149), secondary messengers such as 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-br-cGMP) (146), and cAMP

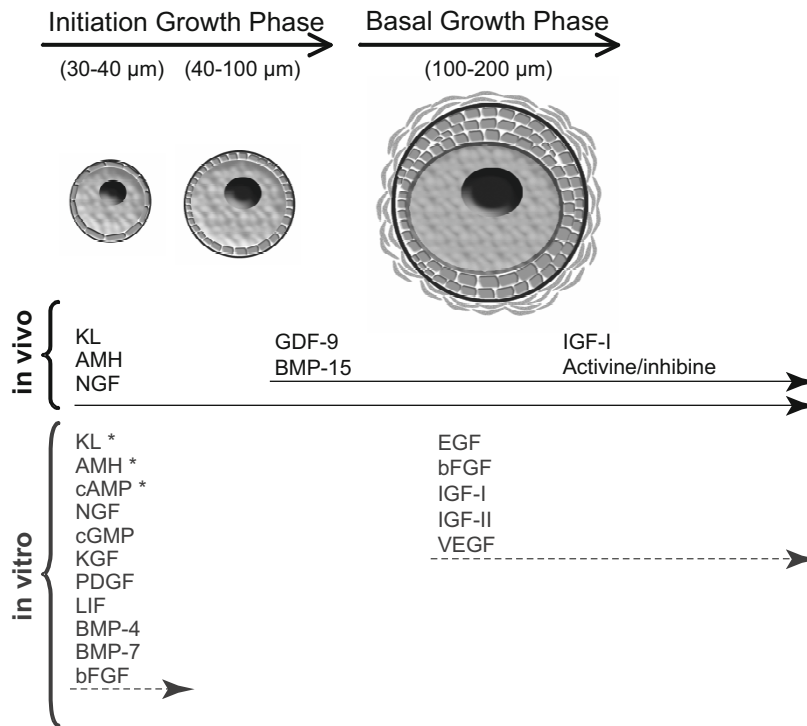


Fig. 2 – Schematic diagram representing factors playing a role in the mechanisms regulating follicular growth and development at the earliest stages of folliculogenesis. The *in vivo* and *in vitro* studies are derived mostly from animal studies. *Factors described to be expressed in human follicles. AMH, anti-mullerian hormone; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; EGF, epidermal growth factor; GDF-9, growth differentiation factor; IGF-I, insulin-like growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; KL, kit ligand; LIF, leukemia inhibitory factor; NGF, nerve growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor [modified from Sadeu *et al.* (204)].

(153) has positive effects on the development of human early-stage follicles (Tables 3 and 4). It was shown that AMH inhibits the early development of human (156) and mouse (196) follicles *in vitro*. Paradoxically, in another study, the presence of AMH in culture increased the development of human follicles (154). The former findings so far have obscured the latest report. The addition of KL to the culture supported the survival of human follicles (155) and stimulated the development of rat (197) and mouse (198) follicles from primordial to primary stage. Keratinocyte growth factors (KGF) (33), LIF (34), bone morphogenetic protein (BMP)-4 (199), BMP-7 (200), and basic FGF (bFGF) (32, 197) were also shown to enhance the primordial to primary follicle transition in neonatal rat ovary organ cultures, whereas stromal-derived factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 (201) inhibited that transition. The development of goat primordial follicles was stimulated by FSH and EGF in cultures of goat ovarian tissue (190).

culture period and makes it possible to relate specific developmental characteristics with subsequent oocyte developmental competence. Attempts to grow isolated human follicles *in vitro* have resulted in follicle development into different stages of folliculogenesis (148, 162, 163). The mouse is the only animal model in which healthy offsprings have been obtained after culture of isolated pre-antral follicles (143, 185, 186). *In vitro* culture of isolated follicles has been carried out for larger mammals including goat (174), sheep (175-177), bovine (68, 178-181), and pig (182-184). EGF and bFGF were shown to sustain the survival of oocytes during culture of isolated goat pre-antral follicles, whereas IGF-I not only supported follicle survival but also stimulated follicle growth (174). Insulin, FSH, IGF-I, EGF, IGF-II, and VEGF were shown to stimulate follicle growth in bovine pre-antral follicle culture (68, 181, 202). EGF and IGF-I increased granulosa cell proliferation and decreased apoptosis in culture of porcine pre-antral follicles.

Early-stage follicle growth *in vitro*

Culture of isolated follicles permits each individual follicle to be studied continuously throughout the

Evaluation of follicular culture

Evaluation of follicle growth *in vitro* can be performed by assessment of follicle/oocyte morphol-

ogy, granulosa cell/oocyte viability, and diameter. Assessment of the timely correct expression of growth-supporting factors and/or their receptors provides references concerning follicle functionality. Follicle stage-specific factors such as GDF-9 and AMH are well known to be involved in the regulation and initiation of the processes of early folliculogenesis *in vivo*. From that point of view, GDF-9 and AMH could be used as functional markers during follicle culture (159). The immunohistochemical analysis of these growth factors could reveal whether their biochemical expression in oocytes and/or granulosa cells in cultured follicles was preserved by applied *in vitro* conditions.

A functional approach to evaluation of *in vitro* cultured follicles can also be achieved via molecular biology techniques. Gene regulation is the basis for cellular differentiation, cell growth, and morphogenesis, and the amount of gene expression has been used to determine the function of the cells. Quantitative real-time PCR can be integrated in the evaluation of cultured follicles. This approach is more appropriated for isolated follicles (203, 204).

The conditioned media collected at each time point of culture can provide information as to the degree of somatic cell differentiation *in vitro*. Several secretion products can be measured to evaluate follicle growth during culture. For instance, absence or low estrogen (E2) production could be related to either absence or incomplete aromatization in granulosa cells or to the non-functionality of the theca compartment. The differential analysis can be made by adding androgen (androstenedione) to the culture medium. A normal granulosa cell differentiation pattern is accompanied by the expression of LH receptors toward the end of follicular development. The exponential production of progesterone upon an HCG trigger certifies a normal granulosa cell differentiation pattern.

Conclusions

Follicular and oocyte growth and development results from a complex interplay of factors, and the best knowledge, to date, indicates that physiologic processes underlying women's reproductive function still need extensive continued exploration.

The application of genomic technologies such as microarrays, gene knockout technologies, and follicle culture systems as well as continued progress in stem cell biology will allow discovering other molecules that play important roles in ovarian function. These advances will lead to a better understanding of women's folliculogenesis and will help

in the development of both efficacious treatment for related pathologic conditions and methodologies for better preservation of women's fertility.

References

1. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, *et al.* (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 29:303-315
2. Baker TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158:417-433
3. Franchi LL, Baker TG (1973) In: Hafez ESS, Evens TN (eds) *Human reproduction, conception and contraception*, Harper & Row, Hagerstown, Maryland, pp 53-83
4. Bachvarova R (1985) Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. In: Browder L (ed) *Developmental biology: a comprehensive synthesis*. Plenum, New York, pp 453-524
5. Gougeon A, Chainy GB (1987) Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* 81:433-442
6. Gougeon A (1986) Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Hum Reprod* 1:81-87
7. Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:121-155
8. Hirshfield AN (1989) Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41:309-316
9. Reynolds SRM (1950) The vasculature of the ovary and ovarian function. *Recent Progr Horm Res* 5:65
10. Faddy MJ, Gosden RG (1995) A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. *Hum Reprod* 10:770-775
11. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF (1987) Follicular depletion during the menopausal transition: Evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1231-1237
12. Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, *et al.* (1977) Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 51:237-263
13. Baker TG, Scrimgeour JB (1980) Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil* 60:193-199
14. Gulyas BJ, Hodgen GD, Tullner WW, Ross GT (1977) Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with particular emphasis on oogenesis. *Biol Reprod* 16:216-227
15. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15:201-204
16. Diedrich K, Felberbaum R (1998) New approaches to ovarian stimulation. *Hum Reprod* 3:1-13
17. Wang XN, Greenwald GS (1993) Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reprod* 48:585-594
18. Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, *et al.* (1997) Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* 57:1233-1237
19. Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R (1995) Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 52:365-372

20. Blumenfeld Z, Shapiro D, Shteinberg M, *et al.* (2000) Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. *Lupus* 9:401-405
21. Oktay K, Briggs D, Gosden RG (1997) Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3748-3751
22. O'Shaughnessy PJ, McLelland D, McBride MW (1997) Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels during development the neonatal mouse ovary. *Biol Reprod* 57:602-608
23. Tsafiri A (1997) Follicular development: impact on oocyte quality. In: Fauser BCJM (ed) FSH action and intraovarian regulation. Parthenon Press, New York, pp 83-105
24. Bukovský A, Caudle MR, Keenan JA, *et al.* (1995) Quantitative evaluation of the cell cycle-related retinoblastoma protein and localization of Thy-1 differentiation protein and macrophages during follicular development and atresia, and in human corpora lutea. *Biol Reprod* 52:776-792
25. Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, *et al.* (1994) Stage-limited expression of rat oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* 41:83-92
26. Picton H, Briggs D, Gosden R (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145:27-37
27. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, *et al.* (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140:5789-5796
28. Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, *et al.* (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142:4891-4899
29. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM (2004) Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol* 266:201-208
30. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, *et al.* (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305:1157-1159
31. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, *et al.* (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13:1171-1181
32. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK (2001) Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 175:123-130
33. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK (2005) Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 73:967-973
34. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK (2002) Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188:65-73
35. Van Wezel IL, Umapathysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ (1995) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 115:133-140
36. Koji T, Chedid M, Rubin JS, *et al.* (1994) Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: Keratinocyte growth factor as a progestomedin. *J Cell Biol* 125:393-401
37. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK (2001) Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 175:123-130
38. Chabbert-Buffet N, Bouchard P (2001) The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol Int* 18:893-919
39. Choi Y, Rajkovic A (2006) Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci* 63:579-590
40. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163:53-60
41. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, *et al.* (1977) Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269:338-334
42. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, *et al.* (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141:1795-1803
43. Kuroda H, Terada N, Nakayama H, *et al.* (1988) Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Slt mice. *Dev Biol* 126:71-79
44. Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P (1993) The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157:100-109.
45. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM *et al.* (1988) The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335:88-89
46. Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, *et al.* (1997) Stepwise requirement of *c-kit* tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development *Dev Biol* 184:122-137
47. Ezoe K, Holmes SA, Ho L, Bennett CP, *et al.* (1995) Novel mutations and deletions of the *KIT* (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am J Hum Genet* 56:58-66
48. Wassarman PM, Liu C, Litscher ES (1996) Constructing the mammalian egg zona pellucida: Some new pieces of an old puzzle. *J Cell Sci* 109:2001-2004
49. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM (2000) Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 159:1-5
50. Erickson GF, Shimasaki S (2001) The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76:943-949
51. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, *et al.* (1999) Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Met* 84:2744-2750
52. Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, *et al.* (1998) A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 78:135-140
53. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S (2003) Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278:304-310
54. Mazerbourg S, Klein C, Roh J, *et al.* (2004) Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol* 18:653-665
55. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, *et al.* (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535
56. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, *et al.* (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP476 15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25:279-283
57. Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM, *et al.* (1999) Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263-1270
58. Kidder GM, Mhawi AA (2002) Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123:613-620

59. Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27
60. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C (1985) The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6:371-399
61. Basset D (1943) The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am J Anat* 73:252-292
62. Channing C, Kammerman S (1973) Characteristics of gonadotropin receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation. *Endocrinology* 92:531-540
63. Fauser B, Van Heusden A (1997) Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 18:71-106
64. Hartshorne GM (1997) In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 2:94-104
65. Cortvrindt R, Hu Y, Smits J (1998) Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiating factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulated hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 13:1292-1303
66. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, *et al.* (2001) Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod* 65:967-977
67. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J (2000) Roles of kit and kit ligand in ovarian function. *Rev Reprod* 5:143-152
68. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, *et al.* (2000) Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* 62:1322-1328
69. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, *et al.* (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 7:40
70. Neal MS, Zhu J, Foster WG (2008) Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reprod Toxicol* 25:100-106
71. Brown J (1978) Pituitary control of ovarian function - concepts derived from gonadotropin therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 18:47-54
72. Zeleznik AJ, Hutchison JS, Schuler HM (1985) Interference with the gonadotropin-suppressing actions of estradiol in macaques overrides the selection of a single preovulatory follicle. *Endocrinology* 117:991-999
73. Hillier S (1994) Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 9:188-191
74. Gougeon A, Lefèvre B (1983) Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 69:497-502
75. Zeleznik AJ (2004) The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol* 2:31
76. Boostanfar R, Jain JK, Mishell DR, Jr, Paulson RJ (2001) A prospective randomized trial comparing clomiphene citrate with tamoxifen citrate for ovulation. *Fertil Steril* 75:1024-1026
77. Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15: 725-751
78. Zeleznik AJ, Hillier SG (1984) The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle. *Clin Obstet Gynecol* 27:927-940
79. Hodgen G (1989) Neuroendocrinology of the normal menstrual cycle. *J Reprod Med* 34:68-75
80. Zeleinski-Wooten M, Hutchison J, Chandrasekhar Y, *et al.* (1992) Administration of human luteinizing hormone (hLH) to macaques after follicular development: Further titration of LH surge requirements for ovulatory changes in primate follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 75:502-507
81. Richards JS, Russell DL, Robker RL, *et al.* (1998) Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol* 145:47-54
82. Fan HY, Liu Z, Shimada M, *et al.* (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324: 938-941
83. Mohri H (1996) Fibronectin and integrins interactions. *J Invest Med* 44:429-441
84. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, *et al.* (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13612-13617
85. Schramm W, Bovaird L, Glew ME, *et al.* (1983) Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F2 alpha. *Prostaglandins* 3:347-364
86. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, *et al.* (2002) Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 194:191-200
87. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A (1994) Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15:707-724
88. Gougeon A (1984) Caractères qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. *Contr Fertil Secul* 12:527-535
89. Lee J, Park HJ, Choi HS, *et al.* (1999) Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology* 140:818-826
90. Tilly JL, Pru JK, Rueda BR (2004) Apoptosis in ovarian development, function, and failure. In: Leung PCK, Adashi EY, Eds. *The ovary*, 2nd edn, pp 321-352
91. Wassarman PM, Josefowicz WJ (1978) Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J Morphol* 156:209-235
92. Fair T, Hyttel P, Greve T (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42:437-442
93. Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE (1995) The relationship between size and maturation in-vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* 63:404-406
94. Schultz GA, Gifford DJ, Mahadevan MM *et al.* (1988) Protein synthetic patterns in immature and mature human oocytes. In: Jones, Jr, HW, Schrader C (eds) *In-vitro fertilization and other assisted reproduction*. Ann NY Acad Sci 541:237-247
95. Bachvarova RF (1985) Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol* 1:453-524
96. Parfenov V, Potchukalina G, Dudina L, *et al.* (1989) Human antral follicles: oocyte nucleolus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res* 22:219-231
97. Albertini DF (1992) Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutat Res* 296:57-68 (Review)
98. Hunter AG, Moor RM (1987) Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in-vitro. *J Dairy Sci* 70:1646-1651
99. Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruij TA (1991) Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in-vivo. *Mol Reprod Dev* 29:271-275
100. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, *et al.* (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-1263
101. Wickramasinghe D, Albertini DF (1993) Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Curr Top Dev Biol* 28:125-153

102. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32
103. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, *et al.* (1996) Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45:451-457
104. Sutovsky P, Schatten G (1997) Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 56:1503-1512
105. Mattson BA, Albertini DF (1990) Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 25:374-383
106. Bellone M, Zuccotti M, Redi C, Garagna S (2009) The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes. *Reproduction* 138:639-643
107. De La Fuente R (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* 292:1-12
108. Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, *et al.* (2003) Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 64:458-470
109. Albertini DF, Carabatsos MJ (1998) Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med* 76:795-799
110. Tsafirri A, Pomerantz, SH. Oocyte maturation inhibitor (1986). *Clin Endocrinol Metab* 15:157-170
111. van de Wiel DF, Bar-Ami S, Tsafirri A, de Jong FH (1983) Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 68:247-252
112. Conti M, Andersen CB, Richard F, *et al.* (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 22:153-159 (Review)
113. Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, *et al.* (2003) Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in-vitro*. *Biol Reprod* 69:1042-1052
114. Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, *et al.* (2006) Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod* 74:177-184
115. Vanhoutte L, Nogueira D, Dumortier F, De Sutter P (2009) Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: Three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod* 24:1946-1959
116. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461-480
117. Eichenlaub-Ritter U, Peschke M (2002) Expression *in vivo* and *in-vitro* growing and maturing oocytes: Focus on regulation of expression at the translational level. *Hum Reprod Update* 8:21-41
118. Brower PT, Schultz RM. (1982) Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol* 90:144-153
119. Eppig JJ (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838 (Review)
120. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14:159-177
121. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, *et al.* (2005) Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118:5257-5268
122. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002) The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2890-2894
123. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, *et al.* (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25: 279-283
124. Latham KE, Wigglesworth K, McMenamin M, Eppig JJ (2004) Stage-dependent effects of oocytes and growth differentiation factor 9 on mouse granulosa cell development: Advance programming and subsequent control of the transition from preantral secondary follicles to early antral tertiary follicles. *Biol Reprod* 70: 1253-1262
125. Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, *et al.* (2006) Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biol Reprod*; 75:734-740
126. Otsuka F, Moore RK, Wang X, *et al.* (2005) Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology* 146:3362-3367
127. Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, *et al.* (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135:111-121
128. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, *et al.* (2007) Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol Reprod* 76:848-857
129. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, *et al.* (2004) Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364:1405-1410
130. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, *et al.* (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353:318-321
131. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, *et al.* (2007) Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 12:1437-1442
132. Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, *et al.* (2008) A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: Ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 23:1531-1537
133. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, *et al.* (2008) Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue *Hum Reprod* 23:2266-2272
134. Shaw JM, Bowles J, Koopman P, *et al.* (1996) Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipient. *Hum Reprod* 11:1668-1673
135. Sonmezer M, Oktay K (2004) Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 10:251-266
136. Zhang J, Liu J, Xu KP, *et al.* (1995) Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J Assist Reprod Genet* 12:361-368
137. Biron-Shental T, Fisch B, Van Den Hurk R, *et al.* (2004) Survival of frozen-thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture. *Fertil Steril* 81:716-719
138. Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, *et al.* (2006) Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril* 85:1130-1141
139. Hovatta O, Sylve R, Abir R, *et al.* (1997) Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 12:1032-1036
140. Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, *et al.* (2001) Measurement of apoptosis in long-term cultures of human ovarian tissue. *Reproduction* 122:657-663

141. Ojala M, Erkkila K, Tuuri T, *et al.* (2002) Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Mol Hum Reprod* 8:228-236
142. Eppig JJ, O'Brien MJ (1996) Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54:197-207
143. Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem A (1996) In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 11:2656-2666
144. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ (2003) A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 68:1682-1686
145. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, *et al.* (2006) Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 13:228-234
146. Scott JE, Carlsson IB, Bavister BD, Hovatta O (2004) Human ovarian tissue cultures: Extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reprod Biomed Online* 9:287-293
147. Wright CS, Hovatta O, Margara R, *et al.* (1999) Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod* 14:1555-1562.
148. Hovatta O, Wright C, Krausz T, *et al.* (1999) Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 14:2519-2524.
149. Louhio H, Hovatta O, Sjöberg J, Tuuri T (2000) The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod* 6:694-698.
150. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, *et al.* (2002) Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 87:316-321
151. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F (2003) Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108:186-193
152. Ojala M, Makinen S, Tuuri T, *et al.* (2004) Effects of testosterone, dihydrotestosterone, and 17 β -estradiol on human ovarian tissue survival in culture. *Fertil Steril* 82 (Suppl. 3):1077-1085
153. Zhang P, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Hreinsson J, Telfer EE, *et al.* (2004) In vitro effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *J Assist Reprod Genet* 21:301-306
154. Schmidt KL, Kryger-Bagesen N, Byskov AG, Andersen CY (2005) Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 234:87-93
155. Carlsson IB, Laitinen MP, Scott JE, *et al.* (2006) Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction* 131:641-649
156. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, *et al.* (2006) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 21:2223-2227
157. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, *et al.* (2007) Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 55:261-268
158. Morimoto Y, Oku Y, Sonoda M, *et al.* (2007) High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues in vitro. *Hum Reprod* 22:3170-3177
159. Sadeu JC, Smitz J (2008) Growth differentiation factor-9 (GDF-9) and anti-müllerian hormone (AMH) expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 17:537-548
160. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, *et al.* (2008) Cryo-preservation of human ovarian tissue: Effect of spontaneous and initiated ice formation. *Reprod Biomed Online* 16:336-345
161. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ (2008) A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 23:1151-1158
162. Roy SK, Treacy BJ (1993) Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 59:783-790
163. Abir R, Franks S, Mobberley MA, *et al.* (1997) Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 68:682-688
164. Roy SK, Terada DM (1999) Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: in vitro modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor β 1. *Biol Reprod* 60:763-768
165. Abir R, Roizman P, Fisch B, *et al.* (1999) Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod* 14:1299-301
166. Abir R, Fisch B, Nitke S, *et al.* (2001) Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertil Steril* 75:141-146
167. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, *et al.* (2009) In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod* 24:2531-2540
168. Telfer E, Torrance C, Gosden RG (1990) Morphological study of cultured preantral ovarian follicles of mice after transplantation under the kidney capsule. *J Reprod Fertil* 89:565-571
169. Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK (2003) Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Eng* 9:1013-1021
170. Heise M, Koepsel R, Russell AJ, McGee EA (2005) Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology. *Reprod Biol Endocrinol* 3:47
171. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK (2006) Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 12:2739-2746
172. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD (2007) Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* 28:4439-4448
173. Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, Shea LD (2006) The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials* 27:714-723
174. Zhou H, Zhang Y (2005) Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest Anim Endocrinol* 28:235-242
175. Newton H, Picton H, Gosden RG (1999) In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil* 115:141-150
176. Cecconi S, Capacchietti G, Russo V, *et al.* (2004) In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol Reprod* 70:12-17
177. Muruvi W, Picton HM, Rodway RG, Joyce IM (2005) In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology* 64:1357-1370
178. Hulshof SC, Figueiredo JR, Beckers JF, *et al.* (1994) Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Q* 16:78-80
179. van den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, *et al.* (1998) Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update* 4:833-841
180. Katska L, Rynska B (1998) The isolation and in vitro culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology* 50:213-222

181. Itoh T, Kacchi M, Abe H, *et al.* (2002) Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod* 67:1099-1105
182. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, *et al.* (1994) In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* 100:333-339
183. Wu J, Emery BR, Carrell DT (2001) In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod* 64:375-381
184. Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, *et al.* (2002) Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod* 67:1197-1203
185. Eppig JJ, Schroeder AC (1989) Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 41:268-276
186. Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG (1994) Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum Reprod* 9:527-532
187. Roy SK, Greenwald GS (1996) Methods of separation and in-vitro culture of pre-antral follicles from mammalian ovaries. *Hum Reprod Update* 2:236-245
188. Hayashi M, McGee EA, Min G, *et al.* (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140:1236-1244
189. Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, Smitz J (2004) A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol Reprod* 71:1730-1738
190. Silva JR, van den Hurk R, Costa SH, *et al.* (2004) Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 81:273-286
191. Mery L, Lefevre A, Benchaib M, *et al.* (2006) Follicular growth in vitro: detection of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) during in vitro culture of ovine cortical slices. *Mol Reprod Dev* 74:767-774
192. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, *et al.* (1996) Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 55:942-948
193. Braw-Tal R, Yossefi S (1997) Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 109:165-171
194. Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, *et al.* (1997) Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum Reprod* 12:1993-2001
195. Nilsson EE, Skinner MK (2002) Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 67:1018-1024
196. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, *et al.* (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143: 1076-1084
197. Nilsson EE, Skinner MK (2004) Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 214:19-25
198. Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK (2006) KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 75:421-433
199. Nilsson EE, Skinner MK (2003) Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 69:1265-1272
200. Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, *et al.* (2004) Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 69:159-163
201. Holt JE, Jackson A, Roman SD, *et al.* (2006) CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary follicle transition in the neonatal mouse ovary. *Dev Biol* 293:449-460
202. Yang MY, Fortune JE (2007) Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol Reprod Dev* 74:1095-1104
203. Sadeu JC, Adriaenssens T, Smitz J (2008) Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and anti-Müllerian hormone (AMH) in cultured mouse primary follicles. *Reproduction* 136:195-203
204. Sadeu JC, Mazoyer C, Smitz J (2008) Human follicle culture in vitro. In: Rizk B, Garcia-Velasco JA, Sallam HN, Makrigiannakis A (eds) *Infertility and assisted reproduction* TnQ Books and Journals Pvt Ltd, Cambridge, Chapter 3, pp 25-37

S. Hamamah, V. Schabo,
S. Assou, T. Anahory,
H. Dechaud et J. de Vos

Dialogue ovocyte-cumulus : concept et applications cliniques

Introduction

Plus de trente ans après la naissance de Louise Brown, les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) telles que la fécondation *in vitro* (FIV) ou plus récemment l'injection d'un spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI) sont de plus en plus proposées à des couples ayant des difficultés à concevoir spontanément. Des problèmes majeurs émergent de ces techniques : le taux élevé de grossesses multiples et un faible taux de succès en termes d'enfant né par cycle initié. Cela explique en partie le remplacement de plusieurs embryons dans la cavité utérine. Actuellement, la diminution du nombre d'embryons à transférer est devenue un impératif, voire une obligation réglementaire dans certains pays.

L'idéal serait d'obtenir un ovocyte donnant un embryon et donnant une naissance vivante. Mais, c'est loin d'être le cas. D'une part, à cause des conditions de culture des embryons *in vitro* qui ne sont pas optimales. D'autre part, du fait de l'absence d'approche non invasive capable d'identifier l'embryon compétent.

Depuis quelques années et dans un souci d'amélioration des conditions de culture *in vitro*, un intérêt grandissant est apparu pour les cellules entourant l'ovocyte, ce sont les cellules du cumulus (CCs). Que sait-on des relations existantes entre l'ovocyte et les CCs ?

Dès les premiers stades de développement folliculaire, une collaboration étroite s'installe entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Mais c'est à partir du stade tertiaire que les relations se resserrent entre l'ovocyte et les CCs, lors de la différenciation des cellules folliculaires en deux types, les cellules de la granulosa murale qui tapissent le follicule et les CCs qui sont directement au contact de l'ovocyte. En effet, les CCs vont créer un espace clos autour de l'ovocyte à l'intérieur duquel les liens et la communication vont se renforcer et où chacun va évoluer en relation avec l'autre. Il s'agit du complexe cumulo-ovocytaire.

Le complexe cumulo-ovocytaire est composé de milliers de cellules, qui sont séparées les unes des autres par une matrice extracellulaire. Cette matrice, composée d'acide hyaluronique, est solidifiée par certaines protéines qui la lient dont celle codée par le gène *Versican*. Ce gène est stimulé par le TSG-6, la pentraxine 3 ou l'inhibiteur de la trypsine inter- α (1).

Au sein du complexe cumulo-ovocytaire, le dialogue se fait par l'intermédiaire de deux mécanismes : (i) les jonctions communicantes : les CCs envoient des prolongements cytoplasmiques au travers de la zone pellucide jusqu'à l'oolemme, à l'extrémité desquels se trouvent des jonctions communicantes et (ii) les signaux paracrines, de l'ovocyte vers les CCs et des CCs vers l'ovocyte (2). Cet axe de communication bidirectionnelle est indispensable pour l'ovogenèse et la folliculogenèse. C'est au travers de cette étroite collaboration que se font la croissance et la maturation de l'ovocyte au sein du follicule ovarien. Au moment de l'ovulation, les prolongements cytoplasmiques commencent à se retirer de l'ovocyte. En effet, quand l'ovocyte reprend sa méiose et passe en métaphase I, une disparition des jonctions communicantes est observée entre les CCs et l'ovocyte mais pas entre les CCs elles-mêmes (3).

In vivo, malgré la perte des contacts physiques, la collaboration ne s'arrête pas au moment de l'ovulation, puisque c'est le complexe cumulo-ovocytaire et non l'ovocyte seul qui est capté par l'unfidibulum tubaire puis transporté. En effet, chez le hamster, le cumulus permet l'adhésion du complexe aux cellules de l'épithélium tubaire et est indispensable pour la captation et donc le transport de l'ovocyte dans la trompe (4).

La fécondation a lieu dans l'ampoule tubaire. Les CCs ne sont pas indispensables à la fécondation, mais dans de nombreuses espèces, leur présence améliore les taux de fécondation par la sélection de spermatozoïdes fécondants. En effet, *in vivo*, les CCs persistent autour de l'ovocyte plusieurs heures voire plusieurs jours après la fécondation selon les espèces (5).

Le dialogue ovocyte-cumulus : un nouveau concept qui fait son chemin

La croissance et le développement des cellules folliculaires et de l'ovocyte dans le follicule ovarien se font de manière fortement coordonnée et dépendante. Dès les premiers stades de développement folliculaire, une communication bidirectionnelle se met en place, cette communication entre l'ovocyte et les cellules folliculaires est essentielle pour leur croissance et leur développement respectifs. Au stade folliculaire tertiaire, lorsque les cellules folliculaires se différencient, l'ovocyte et les CCs forment le complexe cumulo-ovocyttaire. Au sein de ce complexe, les liens et la communication se renforcent.

Deux types de communications ont été particulièrement étudiés (fig. 1) :

- les jonctions communicantes ;
- les signaux paracrines.

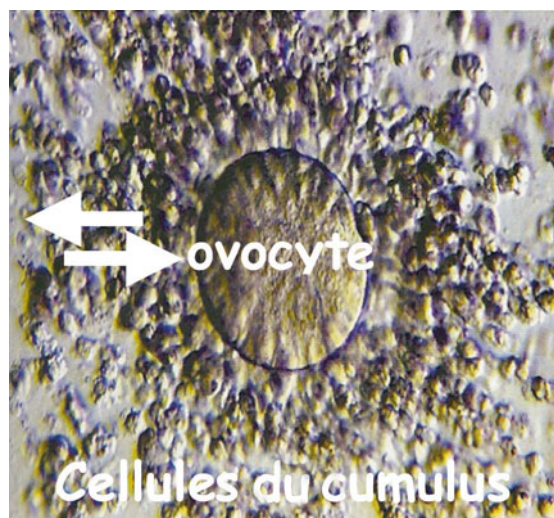


Fig. 1 – Communication entre l'ovocyte et les CCs.

Jonctions communicantes

La zone pellucide qui apparaît au stade de follicule secondaire agit comme une barrière. Elle interdit la pénétration de certaines substances, comme des protéines et des polysaccharides, du fait de leur haut poids moléculaire. Les CCs hautement spécialisées envoient des prolongements cytoplasmiques à travers la zone pellucide jusqu'à l'oolemme. Ces prolongements possèdent à leurs extrémités un complexe jonctionnel comprenant des desmosomes et des jonctions communicantes.

Ce 1^{er} mode de communication par l'intermédiaire des jonctions communicantes est essentiel pour le développement folliculaire et la fertilité (6). Grâce aux jonctions communicantes, l'ovocyte est physi-

quement et métaboliquement couplé aux cellules folliculaires, pendant une grande partie de la folliculogénèse. En effet, ces jonctions permettent le passage de molécules de bas poids moléculaire, de moins de 1 000 daltons (ions, métabolites et acides aminés, AMPc, etc.) entre l'ovocyte et les CCs et entre les CCs elles-mêmes (7). Par ce passage, les cellules de la granulosa assurent un rôle nutritionnel, essentiel à la viabilité et à la croissance ovocytaire. Une véritable régulation en boucle apparaît. L'ovocyte a une faible capacité d'absorption des acides aminés et des ribonucléosides (8). Les CCs vont les absorber et les lui transmettre grâce aux jonctions communicantes. L'ovocyte a la capacité de contrôler leur absorption (9). De plus, l'ovocyte facilite son propre développement en contrôlant le métabolisme des CCs. Ces cellules vont métaboliser certaines molécules, avant leur passage dans l'ovocyte, afin qu'il puisse les utiliser. En effet, l'ovocyte qui est incapable d'utiliser le glucose comme substrat, va contrôler la glycolyse dans les CCs. Les CCs vont transformer le glucose en pyruvate avant de le transporter au travers des jonctions (10).

De même, l'ovocyte a une faible capacité d'incorporation de la cystine. Les CCs vont donc absorber la cystine puis la transformer. Et c'est, sous sa forme métabolisée, la cystéine, qui est transmise à l'ovocyte par l'intermédiaire des jonctions. La cystéine est utilisée par l'ovocyte pour la synthèse de glutathion. Le glutathion, en plus d'être indispensable à la décondensation spermatique et la formation du pronucléus (8), est un important agent protecteur des cellules contre les radicaux libres (11).

Les jonctions communicantes sont formées de protéines de la famille des connexines. Les connexines s'assemblent en hexamère pour former un connexon et deux connexons s'assemblent pour former une jonction communicante. Deux connexons identiques forment une jonction homotypique. À l'inverse, deux connexons différents forment une jonction hétérotypique.

Signaux paracrines

Le second moyen de communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa implique des signaux paracrines. L'ovocyte va sécréter des facteurs agissant sur des récepteurs situés sur les CCs et, inversement, les CCs vont sécréter des facteurs agissant sur des récepteurs ovocytaires.

L'ovocyte est le régulateur principal des fonctions des cellules folliculaires. Il joue un rôle capital dans la régulation de l'ovogénèse, de l'ovulation et de la fécondation (12). Ces dernières années, une attention particulière est apparue pour ces facteurs, constituant la base de l'axe de communication existant entre l'ovocyte et les cellules folliculaires, et

ayant un rôle clé dans la régulation du développement des cellules folliculaires et de l'ovocyte.

Facteurs exprimés par l'ovocyte

L'ovocyte exprime un certain nombre de facteurs dont le rôle est de réguler la croissance folliculaire, la prolifération et la différenciation des CCs.

Récepteur kit

Le gène *c-kit* code pour un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase, kit. Chez la souris, ce récepteur est exprimé par les ovocytes à tous les stades de développement folliculaire.

Fig α

Fig α est un gène exprimé par l'ovocyte. Il régule la production de facteurs essentiels à l'architecture du follicule primaire comme les molécules d'adhésion. Ces molécules permettent la cohésion entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent.

Facteurs GDF-9 et BMP-15 (GDF-9B)

Les facteurs GDF-9 et BMP-15, membres de la famille des TGF β , sont exprimés tout au long de la croissance ovocytaire, de façon spécifique dans l'ovaire chez plusieurs espèces dont l'humain (8). Ces facteurs sont indispensables à la folliculogénèse précoce et ont un rôle clé dans la différenciation des cellules de la granulosa. Chez la brebis, les deux facteurs sont nécessaires. En effet, la mutation homozygote de GDF-9 ou de BMP-15 entraîne une stérilité par blocage de la folliculogénèse au stade primaire. Paradoxalement, la mutation hétérozygote de BMP-15 entraîne une augmentation de la fertilité (13).

Chez la souris, GDF-9 joue également un rôle essentiel. En effet, les souris invalidées pour le gène de GDF-9 sont stériles. En revanche, BMP-15 a un rôle moindre, puisque sa mutation n'entraîne pas de stérilité mais une hypofertilité par diminution de la croissance folliculaire (14, 15). Chez la femme, la mutation hétérozygote de BMP-15 entraîne une insuffisance ovarienne précoce (16). Indépendamment de leur rôle sur la croissance folliculaire précoce, ces facteurs ont un rôle pendant la période périovulatoire (14) et ils assurent :

- la prolifération des cellules de la granulosa ;
- la différenciation des cellules de la granulosa, en cellules de la granulosa murale et en CCs, par modification du profil génomique et protéomique de ces cellules ;
- la mise en place et le maintien d'une matrice extracellulaire ; c'est le phénomène de mucification ; GDF-9, est nécessaire et suffisant pour l'expansion du cumulus, mais pas BMP-15 (2) ;
- la protection des CCs contre l'apoptose, par BMP-15 : GDF-9 n'intervient pas dans ce phénomène (17) ;

- un rôle au moment de l'ovulation : GDF-9 va augmenter l'expression dans les CCs du gène codant pour la cyclo-oxygénase 2 et pour l'acide hyaluronique synthase 2. Ces deux facteurs ont un rôle à la fois complémentaire et antagoniste sur certaines étapes. En effet, GDF-9 réprime l'expression de Kit-ligand dans les CCs alors que BMP-15 la stimule. La production de Kit-ligand stimule l'expression de kit, son récepteur qui en retour va réprimer l'expression de BMP-15. Il existe donc une boucle de régulation entre BMP-15 et le système kit-KL.

L'ovocyte et les CCs s'influencent mutuellement pour assurer la coordination et le bon déroulement de la folliculogénèse.

Facteurs exprimés par les cellules du cumulus

En retour des facteurs exprimés par l'ovocyte, les cellules folliculaires qui l'entourent expriment également des facteurs. Ceux-ci sont impliqués dans la croissance folliculaire, la réponse aux gonadotrophines, le métabolisme, la croissance et la maturation ovocytaire et l'ovulation.

Kit-ligand (KL)

Les cellules de la granulosa expriment le gène *scf* qui code pour kit-ligand. Kit-ligand avec ces deux isoformes KL-1 et KL-2 agirait sur la croissance et la maturation ovocytaire de manière paracrine (8). Kit, le récepteur des protéines kit-ligand, est exprimé par les ovocytes à tous les stades de développement folliculaire chez la souris.

L'interaction kit/kit-ligand a plusieurs effets :

- un effet anti-apoptotique sur les cellules germinales au stade primordial ;
- l'initiation de la croissance du pool de follicules primordiaux. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-kit chez la souris, bloque le passage des follicules primordiaux en follicules primaires ;
- la prolifération des cellules de la granulosa et la différenciation des cellules de la thèque ;
- la formation de l'antrum.

Récepteurs à la LH et à la progestérone

Les CCs acquièrent des récepteurs à la LH et à la progestérone à leur surface suite à l'activation des récepteurs à la FSH lors de la maturation finale (14, 15, 18). L'activation des récepteurs à la LH est suivie d'une augmentation du calcium cytosolique. Ce calcium provient des CCs et du milieu extracellulaire via les jonctions communicantes.

Cyclo-oxygénase 2

La prostaglandine E₂ (PGE₂) est synthétisée par la cyclo-oxygénase 2. L'expression de *cox2* dans les CCs, est induite par GDF-9 et par les gonadotrophines au moment de l'ovulation. Les souris invalidées pour le gène *cox 2* présentent des troubles

de l'ovulation. En effet, dans les CCs, la prostaglandine E_2 agirait sur le récepteur des PGE_2 et 4 pour induire la rupture la paroi folliculaire, l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte (19).

Acide hyaluronique synthase 2

L'acide hyaluronique synthase 2 est l'enzyme nécessaire pour la synthèse de l'acide hyaluronique, composant majeur de la matrice. L'expression de Has-2 dans les CCs est augmentée par l'action synergique de la FSH et de facteurs ovocytaires comme GDF-9. GDF-9 facilite donc l'expansion du cumulus par l'induction de cette enzyme.

Gremline 1

Gremline 1 est un gène exprimé par les CCs qui favoriserait la lutéinisation des cellules de la granulosa murale et l'expansion des CCs. Son expression est induite par GDF-9. McKenzie et al. ont montré que l'expression de gremline 1 peut être reliée à la fécondation et au développement (20).

Pentraxine 3

Pentraxine 3 est un gène dont l'expression est également régulée par GDF-9. Chez la souris, l'invalidation du gène de la pentraxine 3 perturbe la formation du cumulus et diminue les taux de fécondation (14).

Cellules du cumulus : acteur déterminant dans le développement folliculaire précoce et tardif

La formation de l'antrum, au stade de follicule tertiaire, permet la différenciation des cellules de la granulosa en deux types cellulaires anatomiquement et fonctionnellement distincts.

- Les cellules de la granulosa murale qui forment un épithélium stratifié tapissant la cavité remplie de liquide folliculaire.
- Les CCs, en relation étroite avec l'ovocyte qu'elles entourent. Malgré leur origine commune, les CCs se comportent très différemment des cellules de la granulosa murale. En effet, les CCs se distinguent par :
 - une haute prolifération ;
 - une forte production de HSP (*heat shock protein*) et de protéines de la famille des inhibines ;
 - une faible capacité stéroïdogénique ;
 - une faible expression des récepteurs de la LH ;
 - une capacité à sécréter l'acide hyaluronique constituant la matrice extracellulaire, qui est le siège des phénomènes de mucification-expansion.

Les CCs doivent subvenir aux besoins de l'ovocyte et doivent faciliter l'ovulation et la fécondation. À l'inverse, les cellules de la granulosa murale, qui se

différencient par la suite en cellules lutéales sont principalement impliquées dans la stéroïdogénèse. Des études ont montré que, dans un complexe cumulo-ovocyttaire dont l'ovocyte a été retiré, les cellules folliculaires acquièrent un phénotype de cellules de la granulosa murale. L'ajout de facteurs solubles ovocytaires restaure le phénotype d'un complexe cumulo-ovocyttaire intact. L'ovocyte, par la sécrétion de substances paracrines, inhibe activement la différenciation FSH-induite et la lutéinisation des cellules de la granulosa et permet la différenciation des CCs et leur maintien (2).

Ces différences fonctionnelles sont expliquées par la présence d'un gradient de concentration en facteurs ovocytaires. Les signaux paracrines dans le follicule antral sont impliqués dans la différenciation des cellules les plus proches de l'ovocyte et dans le maintien de cette différenciation, afin de créer un microenvironnement hautement spécialisé autour de l'ovocyte.

Applications cliniques

En AMP, les taux de grossesse et de naissance vivante provenant d'une FIV/ICSI restent faibles. En pratique, deux cycles de FIV sur trois n'aboutissent à rien (21) et plus de huit embryons transférés sur dix ne s'implantent pas (22). L'évaluation subjective des paramètres morphologiques reste le premier critère de sélection d'embryons en programmes de FIV et ICSI. Cependant, de tels critères ne prédisent pas la compétence d'un embryon. Plusieurs études ont montré que la combinaison de plusieurs critères morphologiques permet une meilleure sélection embryonnaire (23-25). Ces critères morphologiques incluent la présence d'un clivage précoce (25-27 heures après insémination), le nombre et l'homogénéité des blastomères à j2 et j3, le pourcentage de fragmentation et la présence de noyaux multiples aux stades quatre ou huit cellules (26). Cependant, une étude récente a montré que la sélection des ovocytes à inséminer ne modifiait pas le pronostic d'une AMP lorsque tous les embryons obtenus vivants étaient transférés, indépendamment de leur qualité (25).

Il est à signaler que plus de 50 % des bébés issus de FIV sont issus de grossesses multiples (27) et que les accouchements précoces résultant d'une grossesse multiple causée par une AMP coûtent environ 890 millions de dollars au système de soins des États-Unis (28). Il y a donc nécessité d'identifier des embryons viables présentant un fort potentiel d'implantation afin d'augmenter les taux de succès de FIV, réduire le nombre d'embryons à transférer, réduire les taux de grossesse multiple et le taux de fausses couches précoces. Récemment, plusieurs

biomarqueurs de la sélection embryonnaire ont été rapportés (29, 30). Certaines études ont essayé d'identifier une signature moléculaire qui peut être détectée par une évaluation non invasive du milieu de culture (31-35).

L'étude du génome de CCs de McKenzie *et al.* a apporté des connaissances capitales sur les fonctions génétiques et cellulaires durant la période de développement embryonnaire (20). Également, Feuerstein *et al.* (2007) ont rapporté que l'expression de plusieurs gènes dans les CCs, comme la cyclo-oxygénase 2 (COX2), était indicative de la qualité de l'ovocyte et de l'embryon (36). D'autres gènes tels que Gremlin 1 (GREM1), Hyaluronic Acid Synthase 2 (HAS2), STeroidogenic Acute Regulatory protein (STAR), Stearoyl-Co-enzyme A Desaturase 1 et 5 (SCD1 et 5), Amphiregulin (AREG) et PenTraxin 3 (PTW3) ont également été corrélés positivement à la qualité embryonnaire (37). Plus récemment, l'expression de Glutathione Peroxidase 3 (GPX3), Chemokine receptor 4 (CXCR4), Cyclin D2 (CCDN2) et Catenin delta 1 (CTNND1) dans les CCs humaines a été décrite comme inversement corrélée à la qualité embryonnaire, basée sur le taux de clivage précoce au cours du développement embryonnaire (38). Cependant, malgré le fait que le clivage précoce soit considéré comme un marqueur fiable du pronostic de grossesse (39-41), le profil d'expression des gènes des CCs n'a pas été étudié en regard du pronostic de grossesse.

Profil d'expression des gènes des cellules du cumulus selon le pronostic implantatoire de l'embryon

Afin d'identifier le profil d'expression des gènes des CCs qui sont corrélés au devenir de l'embryon, nous avons étudié les niveaux d'expression de gènes dans les groupes suivants : CCs provenant d'ovocytes non fécondés, CCs provenant d'ovocytes ayant donné un embryon avec fragmentation excessive (grade 3-4) et CCs provenant d'embryons avec une faible fragmentation (grade 1-2). Les échantillons provenant des cellules de la granulosa murale (CG) ont servi comme contrôle. En effet, les CG sont des cellules qui ressemblent beaucoup aux CCs, à l'inverse des autres tissus de l'adulte. L'utilisation de ce contrôle a permis de diminuer le nombre de gènes à comparer entre les groupes et a facilité l'identification des variations faibles pouvant être impliquées dans la relation CCs-ovocyte. Une analyse à l'aide du logiciel SAM (Significance Analysis of Microarrays) a montré que 2 605 gènes étaient surexprimés dans le groupe des ovocytes non fécondés, 2739 dans le groupe des embryons de grade 3-4 et 2482 dans le groupe grade 1-2 avec un pourcentage d'erreur FDR (False Discovery Rate) < 5 %. À l'inverse, 4 270, 4 349 et 4 483 gènes étaient sous-

exprimés respectivement. Ces listes de gènes ont été croisées afin de déterminer leur chevauchement. Alors que 449 sur- et 890 sous-expressions de gènes sont communes aux trois groupes, chaque catégorie décrit un profil spécifique d'expression de gènes. De façon intéressante, 860 gènes up régulés, incluant notamment Galanin et Gap Junction A5 (GJA5), et 1 416 gènes sous-régulés, incluant HLA-G et EGR1, étaient spécifiquement modulés dans les CCs associées avec une bonne qualité embryonnaire. Il faut noter que bien que le groupe grade 1-2 a affiché un profil d'expression des gènes puissant, ce groupe était hétérogène en regard du pronostic de grossesse et incluait des échantillons de CCs associés avec des embryons aboutissant à une grossesse, mais aussi des échantillons de CCs associés avec des embryons qui n'aboutissaient pas à des grossesses.

Profil d'expression des gènes des cellules du cumulus en accord avec le pronostic de grossesse

Les échantillons de CCs ont été comparés en regard du devenir évolutif de la grossesse. Une analyse SAM a délimité une liste « lié au pronostic de grossesse » pour 630 gènes qui varient de manière significative (FDR < 5 %) entre les deux groupes de patientes (grossesse versus absence de grossesse). Des *principal component analysis* (PCA) et la classification hiérarchique de clusters ont confirmé cette liste des 630 gènes : ils permettent une ségrégation de la majorité des échantillons de CCs selon le pronostic de grossesse des embryons concernés. Il est à noter que les gènes de la liste « lié au pronostic de grossesse » étaient essentiellement surexprimés dans les CCs associés à un bon devenir. La signature de l'expression « lié au pronostic de grossesse » est particulièrement marquée dans le sous-groupe de dix échantillons de CCs provenant d'ovocytes dont les embryons de bonne qualité (grade 1-2) ont abouti à une grossesse.

Gènes candidats exprimés dans les cellules du cumulus pour identifier les embryons à fort potentiel implantatoire

Les gènes identifiés par l'analyse SAM des CCs en regard du pronostic de grossesse peuvent être considérés comme biomarqueurs du potentiel embryonnaire. Les analyses des CCs pourraient ainsi différencier les ovocytes qui produisent des embryons aboutissant à une grossesse de tous les autres ovocytes. Parmi les 34 embryons de bonne qualité (grade 1-2), 18 embryons ont été testés dans le bras grossesse et 16 embryons dans les bras non-grossesse.

Les gènes représentatifs de la liste « évolution de grossesse » ont été sélectionnés et une qRT-PCR a été utilisée pour confirmer l'expression de deux gènes surexprimés (BCL2L11 et PCK1) et un gène sous-exprimé (NFIB) entre les CCs provenant d'embryons de grade 1-2 avec grossesse. Les niveaux moyens de transcrits, lors de qRT-PCR, sont de $1,1 \pm 0,9$ vs $0,4 \pm 0,3$ (grossesse vs pas de grossesse) pour BCL2L11 ($p = 0,25$, NS), $11,6 \pm 8,8$ vs $4,0 \pm 2,5$ pour PCK1 ($p = 0,22$, NS) et $0,4 \pm 0,3$ vs $0,9 \pm 0,4$ pour NFIB ($p = 0,16$, NS).

Conclusions et perspectives

Dans beaucoup d'espèces de mammifères, incluant l'espèce humaine, les CCs restent autour de l'ovocyte au moment de la fécondation dans l'oviducte et persistent jusqu'au stade d'implantation embryonnaire. Le remodelage de la matrice extracellulaire au sein et à proximité des CCs joue probablement un rôle clé dans ces deux étapes. À cet égard, nous avons identifié des gènes prometteurs pour le développement embryonnaire et le pronostic de grossesse : BCL2L11, PCK1 et NFIB.

Des études récentes ont suggéré l'utilisation de méthodes non invasives pour évaluer la viabilité de l'ovocyte et de l'embryon en analysant le liquide folliculaire humain ou le milieu de culture (31-35). Cependant, un inconvénient technique majeur est la nécessité de mesurer le nombre de métabolites et chacune de leur concentration. Par conséquent, quelques études ont été conduites pour étudier les CCs et CG afin d'identifier des biomarqueurs de la qualité et la compétence ovocytaire (37, 42) ou pour le développement précoce de l'embryon (20, 38). Dans ce rapport, nous avons présenté une étude rétrospective qui est la première à étudier le profil d'expression des gènes des CCs en corrélation avec la qualité embryonnaire et le pronostic de grossesse.

Les travaux de notre équipe démontrent que le profil d'expression des gènes des CCs qui entourent l'ovocyte est corrélé aux différents devenir (15). Cela permet une expression spécifique de la signature du développement embryonnaire vers la grossesse. De manière intéressante, les gènes des échantillons de CCs du groupe « grossesse obtenue » sont surexprimés de manière prédominante, incluant BCL2L11 et PCK1, impliqués respectivement dans les phénomènes d'apoptose et de néoglucogenèse. Certains gènes ont été néanmoins observés comme sous-régulés dans les CCs associées avec un bon pronostic, tel que le facteur de transcription NFIB. Afin de trouver un éventuel impact du traitement hormonal, nous avons comparé les profils d'expression des gènes des CCs

après (i) stimulation par agonistes de la GnRH avec FSH recombinante ou hMG ou (ii) stimulation par antagonistes avec FSH recombinante ou hMG. Il y a eu 16 gènes modulés de manière significative ($FDR < 5\%$).

Les cellules anormales sont habituellement éliminées par apoptose, un programme de mort cellulaire, qui est un processus physiologique embryonnaire (30, 43). Certaines protéases impliquées dans l'apoptose ont été caractérisées, principalement des caspases (qui sont des molécules effectrices clés de l'apoptose). Il existe deux voies essentielles de l'activation des caspases : la voie extrinsèque qui est médiée par l'activation des récepteurs de mort cellulaire, et la voie intrinsèque qui est activée dans des conditions de stress cellulaire ou de lésions d'ADN. Les protéines de la famille BCL2, qui incluent des membres pro- et anti-apoptotiques, sont des régulateurs critiques de la voie intrinsèque. La balance entre les membres pro- et anti-apoptotiques est un facteur déterminant du contrôle de la survie ou de la mort cellulaire. Une incidence forte de l'apoptose des CCs a été corrélée à une mauvaise qualité ovocytaire et de faibles taux de grossesse (44). Récemment, six gènes sur exprimés pro-apoptiques et deux gènes sous exprimés anti-apoptiques ont été rapportés dans des CCs provenant d'ovocytes qui n'aboutissaient pas à un clivage précoce (38).

Une récente étude de notre équipe relate une différence significative dans l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie apoptotique, incluant un membre de la famille BCL2, BCL2L11, aussi connu sous le nom de BIM, appartenant aux protéines « BH3-only », un sous-groupe pro-apoptotique de la famille BCL2 qui ne contient qu'une seule région homologue à BCL2 (BH3) (15). Cette protéine induit l'apoptose en inhibant les membres anti-apoptotiques tels que BCL2 et/ou en activant directement les protéines pro-apoptiques BAX et BAK. De manière intéressante, l'expression du gène BCL2L11 est surexprimée dans les CCs associées à une grossesse obtenue. Ces résultats suggèrent que BCL2L11, qui pourrait participer à l'apoptose des CCs, est induite durant le développement ovocytaire. Un haut niveau de BCL2L11 pourrait signifier un processus physiologique et donc un biomarqueur pour un développement embryonnaire optimal.

Récemment, il a été démontré, sur le modèle de la souris, que le support nutritionnel des CCs est essentiel pour la croissance et le développement des ovocytes de souris (45, 46). La mise en évidence de l'existence d'un « dialogue » entre les voies métaboliques des CCs et l'ovocyte a été documentée. Ces voies métaboliques incluent la glycolyse et la biosynthèse de cholestérol (45, 46). De manière intéressante, dans notre étude, nous

avons observé une surexpression des ARNm des PCK1 des CCs provenant d'ovocytes qui produisent des embryons aboutissant à une grossesse. Ce gène est le point de régulation de la néoglucogenèse et catalyse la formation de phospho-enol pyruvate en oxalo-acétate. De manière intéressante, la majorité des gènes impliqués dans le réseau autour de PCK1 sont également surexprimés.

Nuclear factor I (NFI) consiste en une famille de quatre gènes qui présentent chacun des isoformes obtenus par épissage alternatif (NFIA, NFIB, NFIC et NFIX). Les protéines NFI jouent un rôle important dans l'expression de gènes de manière tissu spécifique au cours de l'embryogenèse des mammifères (47). De manière intéressante, l'expression du gène NFIB est sous-exprimée (confirmé par qRT-PCR) dans les CCs associées à une grossesse.

D'autres gènes ont révélé des expressions significativement différentes entre les CCs selon le pronostic de grossesse. Parmi eux, des facteurs additionnels impliqués dans l'apoptose, tels que BCL10, un gène anti-apoptotique, ont été trouvés surexprimés dans le groupe des grossesses. La protéine codée par ce gène contient un domaine de recrutement de caspase (CARD) et a été montrée inductrice d'apoptose et activatrice de NF κ B. BCL10 est reporté pour interagir avec les autres protéines contenant des domaines CARD, qui sont considérées comme sur régulatrices dans la signalisation NF κ B. De plus, l'expression des gènes CRADD et IKBKG/FIP3/NEMO est également surexprimée dans les CCs provenant d'ovocytes qui produisent des embryons aboutissant à une grossesse. Les protéines codées par les gènes CRADD et NEMO sont respectivement une protéine contenant un domaine de mort (CARD/DD) et une sous-unité régulatrice d'IKK (IKK α B kinase). La signalisation IKK passe par une activation de NF κ B, un facteur de transcription impliqué dans la protection contre l'apoptose (48). De plus, le gène TNFSF13 appartient au groupe des gènes surexprimés et associés avec BCL2L. Nous avons identifié précédemment TNFSF13 comme fortement produit par les CCs (14). La protéine codée par ce gène est un membre de la famille des ligands à *tumor necrosis factor* (TNF). Initialement, cette protéine et son récepteur (TNFRSF17) ont été décrits pour leur implication importante dans le développement des cellules B (49). Les études *in vitro* suggèrent que cette protéine pourrait être capable d'atténuer l'apoptose et augmenter l'activation de NF κ B.

En conclusion, nous avons trouvé des différences d'expression de gènes des CCs humaines provenant des ovocytes, en fonction de leur pronostic de grossesse, de patientes répertoriées comme présentant une infertilité d'origine masculine. Cette analyse est un nouveau concept et fournit de nouveaux biomarqueurs candidats à l'évaluation du poten-

tiel embryonnaire du développement de grossesse, tels que BCL2L11, PCK1 et NFIB. La relation entre l'apoptose des CCs et la capacité de l'ovocyte à se développer méritent d'être approfondies. Avant une utilisation en routine, une large cohorte de CCs doit être analysée en utilisant des microarrays, validée par qRT-PCR. Nos résultats suggèrent que l'analyse des CCs qui entourent l'ovocyte peut se révéler être une approche non invasive de la sélection embryonnaire. Nous pouvons imaginer la possibilité de recueillir des CCs immédiatement après recueil des ovocytes, analyser les CCs par des tests génomiques (G-Test) pour évaluer le potentiel de chaque embryon et sélectionner les embryons candidats à un transfert utérin basé sur les résultats de ce G-Test (fig. 2). La validation de ces biomarqueurs tels que BCL2L11, PCK1 et NFIB, pourrait réduire le taux de transfert de deux embryons et privilégier les stratégies de transfert mono-embryonnaire.

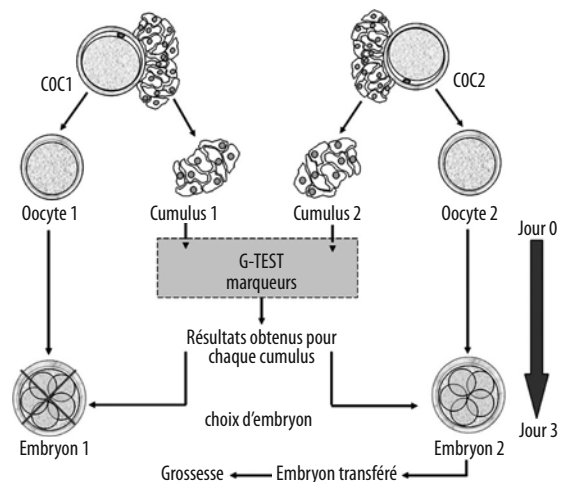


Fig. 2 – Algorithme décisionnel du G-test pour identifier le ou les embryons à fort potentiel implantatoire par l'étude génomique des CCs.

Remerciements

Les auteurs remercient très sincèrement les laboratoires Vitrolife, Ferring France et Shering-Plough France pour leur contribution financière partielle dans l'élaboration de ce travail.

Références

- Salustri, A (2000) Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *Int J Dev Biol* 44: 591-7
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14: 159-77
- Suzuki H, Jeong BS, Yang X (2000) Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 63: 723-9

4. Talbot P, Riveles K (2005). Smoking and reproduction: the oviduct as a target of cigarette smoke. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 52
5. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I *et al.* (2002) Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim* 37: 144-51
6. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385: 525-9
7. Herlands RM, Schultz RM (1984). Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool* 229: 317-25
8. Senbon S, Hirao Y, Miyano T (2003) Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev* 49: 259-69
9. Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK (2005) Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod* 73: 351-7
10. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ (2005) Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol* 279: 20-30
11. Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-7
12. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83: 431-46
13. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM *et al.* (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25: 279-83
14. Assou S, Anahory T, Pantescio V *et al.* (2006) The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 21: 1705-19
15. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K *et al.* (2008). A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells. *Mol Hum Reprod* 12: 711-9
16. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75: 106-11
17. Hussein TS, Froiland DA, Amato F *et al.* (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118: 5257-68
18. Gasca S, Pellestor F, Assou S *et al.* (2007) Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 14: 175-83
19. Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK (2006) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E (2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 281: 37117-29
20. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA *et al.* (2004) Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19: 2869-74
21. Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine (2004) Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 81: 1207-20
22. Kovalevsky G, Patrizio P (2005) High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 84: 325-30
23. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 15: 2394-403
24. Balaban B, Urman B (2006) Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 12: 608-5
25. La Sala GB, Nicoli A, Villani MT *et al.* (2009) The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction. *Fertil Steril* 91: 96-100
26. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M (2002) Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 17: 407-12
27. Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, Tasca RJ (2007) Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol* 109: 967-77
28. Bromer JG, Seli E (2008) Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20: 234-41
29. Pearson H (2006) Safer embryo tests could boost IVF pregnancy rates. *Nature* 444: 12-3
30. Haouzi D, De Vos J, Loup V *et al.* (2008) Oocyte and embryo quality: do the apoptotic markers have a place in the preimplantation genetic diagnostic? *Gynecol Obstet Fertil* 36: 730-42
31. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76: 1175-80
32. Brison DR, Houghton FD, Falconer D *et al.* (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19: 2319-24
33. Sakkas D, Gardner DK (2005) Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17: 283-8
34. Seli E, Sakkas D, Scott R *et al.* (2007) Noninvasive metabolic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88: 1350-7
35. Zhu XM, Zhu YM, Xu CM *et al.* (2008) Autologous mature follicular fluid: its role in in vitro maturation of human cumulus-removed oocytes. *Fertil Steril* 90: 1094-102
36. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R *et al.* (2007) Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 22: 3069-77
37. Zhang X, Jafari N, Barnes RB *et al.* (2005) Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 83 (Suppl. 1): 1169-79
38. Van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC *et al.* (2008) Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 14: 157-68
39. Lundin K, Bergh C, Hardarson T (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 16: 2652-7
40. Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 19: 2103-8
41. Yang WJ, Hwu YM, Lee RK *et al.* (2007) Early cleavage does not predict treatment outcome following the use of GnRH antagonists in women older than 35. *Fertil Steril* 88: 1573-8
42. Hamel M, Dufort I, Robert C *et al.* (2008) Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 23: 1118-27

43. Haouzi D, Hamamah S (2009) Pertinence of Apoptosis Markers for the Improvement of In Vitro Fertilization (IVF). *Curr Med Chem* 16: 1905-16
44. Lee KS, Joo BS, Na YJ *et al.* (2001) Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 18: 490-8
45. Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ *et al.* (2007) Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134: 2593-603
46. Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K *et al.* (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135: 111-21
47. Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG *et al.* (2005) The transcription factor gene *Nfib* is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol* 25: 685-98
48. Courtois G, Smahi A (2006) NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Death Differ* 13: 843-51
49. Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA *et al.* (2002) APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 109: 1587-98

H. Lucas, C. Grenet,
G.A. de Boccard,
R. Miousset et P. Durand

Spermatogenèse – Cellules souches testiculaires – Reprotoxicité

Introduction

La spermatogenèse (ou gamétogenèse mâle) est un processus complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose, qui, à partir des cellules germinales souches diploïdes, les spermatogonies, aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes hautement spécialisées, et à leur libération dans la lumière des tubules (ou tubes) séminifères. Les spermatozoïdes vont ensuite acquérir leur mobilité et finiront leur maturation durant leur transit dans les voies génitales mâles. Chez l'homme, la spermatogenèse débute à la puberté et est ensuite continue durant toute la vie. Elle s'effectue dans les gonades mâles (testicules) au sein de l'épithélium des tubes séminifères. Cet épithélium est constitué des cellules de la lignée germinale, spermatogonies, spermatocytes et spermatides, associées étroitement aux cellules de Sertoli qui leurs servent de support physique et nourricier. Ce n'est qu'après libération de la spermatide dans la lumière du tubule que la cellule prend le nom de spermatozoïde. Chaque jour, l'homme produit, en moyenne 200 millions de spermatozoïdes (ou gamètes mâles). Dans ce chapitre, nous décrirons l'anatomie du testicule, sa fonction, la composition cellulaire du tissu testiculaire et les cycles de l'épithélium séminifère, ainsi que les régulations, hormonale, paracrine et autocrine des fonctions testiculaires. La régulation génétique de la spermatogenèse, quant à elle, sera abordée dans le chapitre consacré aux causes génétiques de l'infertilité. Enfin, nous décrirons des aspects très actuels, tels que le rôle des cellules souches testiculaires, ou encore l'avancée des connaissances sur l'étude de la toxicité testiculaire.

Organisation fonctionnelle des testicules humains (1)

Dans l'espèce humaine, les testicules sont des organes pairs, ovoïdes (5 x 3 x 2,5 cm), qui pèsent en

moyenne 40 g, ce qui représente 1/1 500^e du poids du corps. Ils assurent deux fonctions, la fonction exocrine (gamétogenèse mâle) et une fonction endocrine. Cette fonction endocrine des testicules est principalement assurée par les cellules de Leydig groupées dans les compartiments intertubulaires. Les testicules sont de véritables glandes interstitielles qui sécrètent les hormones mâles, les androgènes, telle la testostérone.

Chaque testicule est recouvert de deux tuniques. La tunique superficielle, la vaginale, s'est individualisée du péritoine lors de la migration des gonades et est formée de deux feuillets : la lame pariétale et la lame viscérale de la vaginale. La tunique profonde, l'albuginée, est une capsule fibreuse du testicule. Sa partie interne est néanmoins riche en vaisseaux sanguins. L'albuginée est constituée de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses qui se contractent spontanément et rythmiquement toutes les quatorze minutes chez l'homme. Ces contractions contribuent à propulser les spermatozoïdes et le fluide testiculaire hors des tubes séminifères vers le *rete testis*, les canaux efférents puis le canal épидидymaire.

Ce fluide a une composition singulière, il contient beaucoup de magnésium et de phosphore et environ dix fois plus de potassium que le sang. Il contient très peu de protéines en comparaison avec le sang et le liquide interstitiel (25 fois moins de transferrine), à une exception près, l'ABP (*androgen binding protein*) qui y est fortement représentée. Au niveau du *rete testis*, la composition du fluide a déjà évolué et renferme quelques peptides et protéines spécifiques telles l'inhibine et l'hormone anti-müllérienne (AMH).

De l'albuginée, partent des cloisons ou *septa* qui se rassemblent au niveau du corps de Highmore et délimitent ainsi environ trois cent lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubes séminifères. Les tubes séminifères sont très contournés et forment des anses qui s'ouvrent dans les tubes droits avant de rejoindre les *rete testis*.

Le diamètre des tubes séminifères varie de 150-350 μm . Leur extrémité périphérique est aveugle. De l'intérieur vers l'extérieur, la paroi des tubes est formée par :

- une lame basale composée principalement de laminine, de collagène de type IV, d'héparane-sulfate et d'entactine ;
- une ou plusieurs assises de cellules myoïdes aussi appelées cellules péritubulaires, riches en actine, myosine et fibronectine. Ces cellules sont reliées entre elles par des molécules transmembranaires de type cadhérine reliées également aux molécules d'actine du cytosquelette, organisant ainsi un double réseau longitudinal et circulaire. Les contractions cellulaires résulteraient d'un contrôle paracrine-endocrine, et assureraient l'évacuation des spermatozoïdes des tubes séminifères ;
- une couche de collagène de types I et IV et de fibronectine, revêtue par l'assise de cellules endothéliales dont le rôle est de délimiter les capillaires lymphatiques du tissu interstitiel.

Les espaces compris entre les tubes séminifères sont composés de tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en nerfs. Ils représentent environ 25-30 % du volume du testicule. C'est dans ces espaces que des îlots de cellules de Leydig cohabitent avec des cellules conjonctives et gliales, mais également avec des macrophages, le tout baigné par le liquide interstitiel. Il existe d'importantes interactions endocrines et paracrine entre les différents types cellulaires.

Cordon spermatique – Vascularisation – Innervation

Le cordon spermatique est la structure anatomique comprise entre le testicule et la région inguinale (1). Il va de l'anneau inguinal profond au scrotum où il se termine à l'arrière du testicule, suspendu à son extrémité inférieure. Le cordon spermatique est enveloppé par le fascia spermatique externe, le muscle crémaster sensible à la chaleur, et le fascia spermatique interne. Il contient le canal déférent véhiculant vers l'aval les spermatozoïdes, ainsi que les artère testiculaire (ou spermatique), déférentielle, et funiculaire (ou crémasterienne). L'artère testiculaire se divise en branches terminales qui se ramifient dans l'albuginée et les cloisons interlobulaires. Le cordon contient également le système veineux de retour sanguin. Les plexus veineux drainant le sang du testicule s'organisent au niveau du pôle supérieur de celui-ci en un réseau appelé plexus pampiniforme, très impliqué dans le système de « refroidissement testiculaire ». Une varicocèle correspond à une dilatation anormale des veines du plexus pampiniforme induisant une dysrégulation thermique (fig. 1) (cf. infra Régulation thermique).

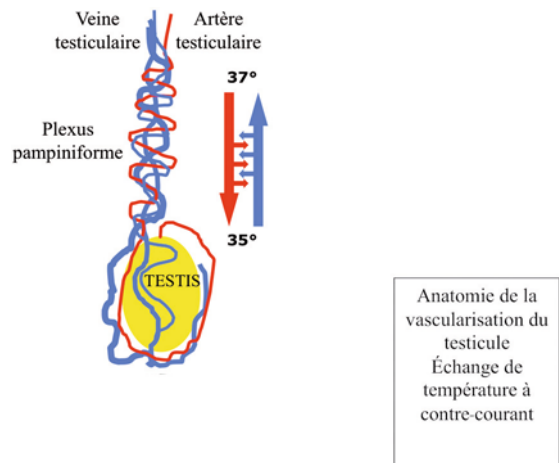


Fig. 1 – Anatomie de la vascularisation testiculaire. Plexus artério-veineux spécifique au testicule pour sa thermorégulation, le plexus pampiniforme.

De plus, le débit sanguin testiculaire est faible en comparaison à celui d'autres tissus. Ainsi, toute augmentation de température sans augmentation du débit sanguin peut s'accompagner d'hypoxie testiculaire.

Des vaisseaux lymphatiques issus du testicule et de l'épididyme ainsi que des ramifications nerveuses complètent la composition du cordon spermatique, en périphérie du plexus vasculaire. Enfin, de nombreuses terminaisons adrénergiques innervent les vaisseaux en contrôlant leur vasomotricité et les cellules péritubulaires musculaires lisses. Le tractus nerveux est également composé de fibres afférentes sensibles impliquées dans la perception de la douleur.

Régulation thermique de la spermatogenèse

La température des testicules chez l'homme adulte est comprise entre 30° C et 35,5° C, étant ainsi, en moyenne, inférieure de 4,5° C à la température corporelle centrale. Cette différence de température entre le corps et les testicules est retrouvée chez la plupart des mammifères (2). Ce gradient thermique est assuré par deux systèmes thermorégulateurs.

Chez les mammifères euthériens possédant un scrotum, le sang veineux testiculaire, qui chemine dans les vaisseaux situés à la surface du testicule, perd de sa chaleur par diffusion passive à travers le scrotum. De plus, la peau du scrotum est extensible, elle peut, en fonction de l'état de relaxation du muscle peaucier (ou dartos) qui l'entoure, se resserrer ou se détendre. En augmentant la surface d'évaporation et grâce à de nombreuses glandes sudoripares, la température du sang veineux testiculaire baisse et s'équilibre avec celle de la cavité scrotale, elle-même inférieure à la température du

tissu testiculaire. Le scrotum constitue ainsi le premier système thermorégulateur. Les muscles crémastrers jouent également un rôle en permettant d'éloigner ou de rapprocher les testicules de la chaleur du corps.

Le deuxième système thermorégulateur est assuré au niveau du cordon spermatique par un système vasculaire d'échange de chaleur à contre courant. Ce transfert de chaleur a lieu au niveau du plexus pampiniforme, enchevêtrement de veines qui véhiculent du sang veineux refroidi autour de l'artère testiculaire unique et spiralée. Ces échanges thermiques passifs vont avoir pour conséquences le refroidissement du sang artériel et le réchauffement du sang veineux (3).

Cependant, ce second système est tributaire du premier qui détermine la température du sang veineux. La peau scrotale apparaît ainsi comme le système thermorégulateur essentiel à l'abaissement de la température testiculaire dans une fourchette physiologique alors que le plexus pampiniforme avec son système d'échange de température à contre-courant en assure le maintien. De nombreuses études expérimentales chez les mammifères et chez l'homme, ont montré qu'une élévation de la température scrotale induisait une altération de la spermatogenèse, de la fertilité mais également des perturbations du développement embryonnaire se traduisant par des fausses couches chez l'animal (4). Ceci est d'autant plus important que de nombreuses situations peuvent être à l'origine d'élévation de la température scrotale chez l'homme (5). Par exemple, chez environ 10 % des hommes, la régulation thermique du scrotum est perturbée par l'absence de valves dans une ou plus rarement les deux veines spermatiques, ce qui a pour effet d'entraîner un reflux dans la veine concernée. La veine spermatique gauche est l'une des plus longues veines du corps puisqu'elle prend son origine au niveau du testicule et se jette dans la veine rénale gauche. La veine spermatique droite est généralement plus courte car elle se jette dans la veine cave. L'absence de valve dans ces veines se traduit par un reflux veineux pathologique permanent et aggravé lors des poussées abdominales avec pour effet la constitution de varices, généralement autour du testicule gauche, appelées varicocèle. Le reflux veineux pathologique interfère avec le système de refroidissement à contre-courant et rend impossible la thermorégulation et le refroidissement du sang artériel avec comme conséquence un réchauffement du testicule et la perturbation de la spermatogenèse. Il est démontré depuis très longtemps que l'opération de la varicocèle permet de diminuer le délai à concevoir d'un couple infertile sans pourtant observer d'amélioration significative des paramètres spermiologiques. Depuis quelques années, un nouveau paramètre du sperme, non évalué pour un premier bilan spermiologique, éva-

lue le taux de spermatozoïdes contenant un ADN fragmenté. En effet, ce taux de fragmentation est augmenté en cas de varicocèle tout comme le taux d'aneuploidie. Après traitement de la varicocèle par embolisation ou chirurgie, ces taux s'améliorent, ce qui favorise le pouvoir fécondant du sperme et réduit le taux de fausses couches (6, 7).

Spermatogenèse

La spermatogenèse débute, chez l'homme, à partir de la puberté et se poursuit durant toute sa vie. C'est un processus physiologique complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose qui, à partir des spermatogonies, cellules germinales souches diploïdes ($2n$ chromosomes), aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes (n chromosomes). Cette production des spermatozoïdes se produit au sein de l'épithélium des tubes séminifères.

L'épithélium séminifère est constitué de deux populations cellulaires différentes : les cellules somatiques (cellules de Sertoli) et les différentes cellules de la lignée germinale (spermatogonies, spermatocytes, spermatides). Dans l'espèce humaine, les cellules de la lignée germinale sont bien décrites (8).

La spermatogenèse se décompose en trois phases séquentielles (fig. 2).

1. La prolifération et la différenciation des spermatogonies permettant le renouvellement des cellules progénitrices, les spermatogonies- A_{dark} et $-A_{\text{pale}}$ (cf. infra). La division des spermatogonies- A_{pale} , à vocation multiplicative, qui aboutira à la constitution des spermatogonies B, lesquelles se diviseront à leur tour pour donner les spermatocytes au stade préleptotène.

2. La méiose, au cours de laquelle un spermatocyte donne quatre spermatides et comprenant les dernières synthèses d'ADN du stade spermatocyte préleptotène jusqu'à la fin des deux divisions méiotiques.

3. La spermiogenèse qui est la cytodifférenciation de spermatides rondes en spermatides allongées.

Au terme de la spermatogenèse, les spermatozoïdes se séparent des cellules de Sertoli et sont libérés dans la lumière du tubule séminifère. Cette étape est appelée la spermiation. Dès lors, les spermatozoïdes vont poursuivre leur excrétion vers l'épididyme.

L'ensemble de ces événements sont interdépendants mais chaque processus fait intervenir différentes molécules régulatrices issues des cellules de Sertoli, des cellules péritubulaires, des cellules de Leydig et des cellules germinales elles-mêmes, ainsi que des molécules du sang circulant agissant sur les cellules spermatiques, directement ou indirectement, à distance du lieu de leur sécrétion.

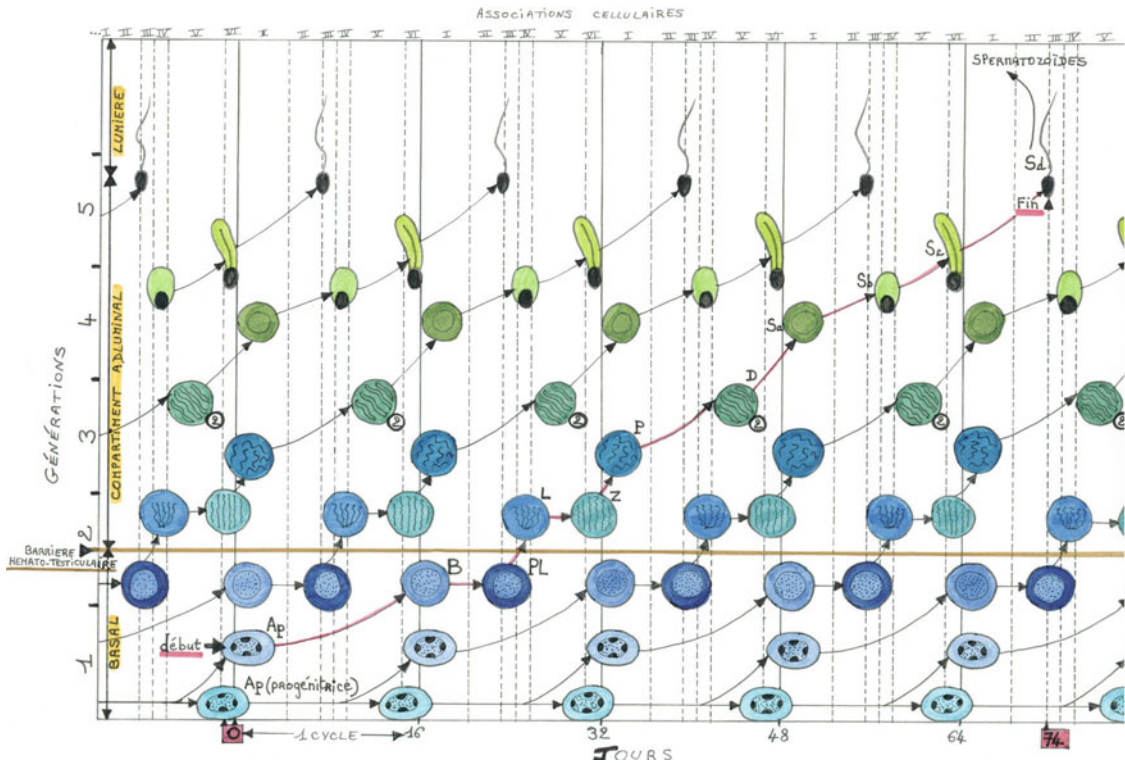


Fig. 2 – La spermatogenèse chez l'homme. Ap : spermatogonie-A_{pale}, B : spermatogonie-B. (Les différents types de spermatogonies sont décrits plus précisément fig. 3.) PL, L, Z, P, D : spermatocytes respectivement aux stades, préleptotène (PL), leptotène (L), zygotène (Z), pachytène (P), diplotène (D). S₁, S₂, S₃, S₄ : spermatozoïdes à divers stades de leur développement. Description des 4,6 cycles de l'épithélium séminifère nécessaires pour qu'une spermatogonie A_{pale} (désignée « début » en bas à gauche au jour 0 de la spermatogenèse) produise une cohorte de spermatozoïdes allongée après environ 74 jours et accomplissement de l'étape de spermiation (désignée « fin » en haut à droite). Ensuite, ces gamètes sont rapidement transportés par le fluide tubulaire vers les tubes éfferents pour prendre l'appellation spermatozoïdes. Plusieurs cycles spermatogénétiques (4,6 cycles) démarrent pendant la durée de 74 jours d'une spermatogenèse complète, afin d'assurer une production continue de spermatozoïdes. Cela permet d'observer des associations cellulaires particulières sur des coupes histologiques de tubules séminifères. Elles sont notées en abscisse en haut du schéma, de I à VI. D'après Amann (8).

Cellules germinales

Dans les tubes séminifères adultes, la spermatogenèse se déroule de manière centripète, c'est-à-dire que les cellules germinales vont se multiplier et se différencier de la périphérie vers la lumière (centre du tube). La spermatogenèse débute par la multiplication des spermatogonies souches, lesquelles sont disposées à la périphérie des tubes séminifères, contre la lame basale et entre les cellules de Sertoli (9). Sur la base de leurs caractéristiques nucléaires (noyaux sombre/dark et pâle/pale) on en distingue plusieurs types issus des divisions successives. Chez l'homme, nous observons les spermatogonies-A_{dark}, les spermatogonies-A_{pale}, ainsi que les spermatogonies-B. Ces diverses spermatogonies ne sont pas équivalentes en ce qui concerne leur rôle dans la gamétogenèse (fig. 3).

Chez l'homme, les spermatogonies-A_{dark} sont considérées comme les « vraies » cellules souches testiculaires. Elles ont une activité mitotique limitée au cours de la spermatogenèse normale et servent de réserve pour la régénération de la popula-

tion de cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère, par exemple après une chimiothérapie. Les spermatogonies-A_{pale} sont à la fois des cellules progénitrices qui se renouvellent mais certaines d'entre elles sont programmées, « adressées », pour assurer la différenciation cellulaire et atteindre le stade de spermatogonies-B. Cette entrée en division des spermatogonies-A_{pale} se fait par groupes cellulaires tous les 16 jours (cf. infra). Les cellules d'une même génération maintiennent entre elles des ponts cytoplasmiques jusqu'à la spermiogenèse, ce qui permet une synchronisation parfaite du développement gamétique de toutes les cellules filles issues d'un groupe de spermatogonies-A_{pale}, c'est l'onde spermatogénétique. De même, chaque entrée en division/différenciation d'un groupe de spermatogonies-A_{pale} est appelée « génération cellulaire » (9-11). Les spermatogonies-A_{pale} vont donc se diviser par mitose pour donner les spermatogonies-B, lesquelles se divisent à leur tour pour donner les spermatocytes I. Puis, les spermatocytes I vont subir les différentes étapes de la première division de méiose et former, au fur et à

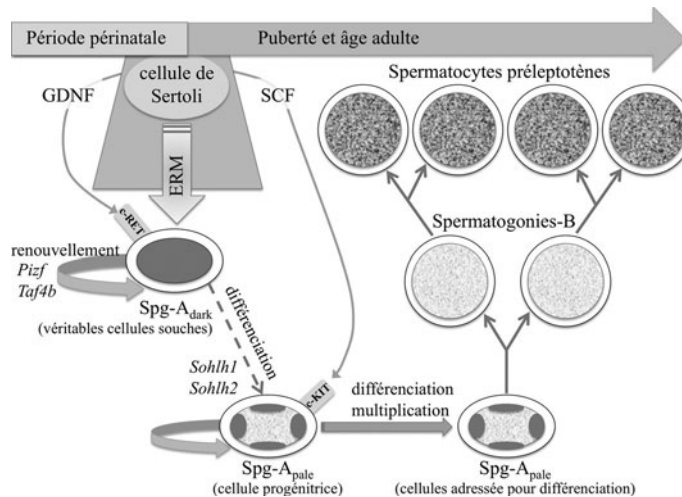


Fig. 3 – Les spermatogonies et leur renouvellement. Chez l'homme, les spermatogonies- A_{dark} sont les véritables cellules souches présentes dans les testicules prépubères. Leur activité mitotique est normalement réduite à l'âge adulte et elles servent principalement à régénérer la spermatogenèse en cas de besoin. Ces spermatogonies- A_{dark} , dont l'équivalent murin les SSCs (*spermatogonial stem cells*), se renouvellent sous l'action des gènes *Pizf* et *Taf4b* et se différencient en spermatogonies différenciées (les spermatogonies- A_{pale} et spermatogonies-B chez l'homme) sous l'action de *Sohlh1* et *Sohlh2*. Chez la souris, les cellules de Sertoli sont les contributrices majeures, à l'autorenouvellement des spermatogonies par les protéines GDNF (*glial cell-line-derived neurotrophic factor*) et ERM (*Ets related molecules* : facteurs de transcriptions), et à la différenciation des spermatogonies par la protéine SCF (*stem cell factor*). GDNF agit au durant la période périnatale et ERM au cours de la puberté et à l'âge adulte. c-RET et c-KIT sont des récepteurs de type tyrosine kinase. D'après Dadoune (11), Amann (8).

mesure, les spermatocytes I au stade préleptotène (parfois aussi appelés « jeunes spermatocytes I »), leptotène, zygotène, pachytène, puis diplotène. La première division méiotique permet alors d'atteindre le stade bref de spermatocyte II, qui se conclut par la deuxième division méiotique permettant d'atteindre le stade de spermatides des cellules haploïdes.

La spermiogenèse définit la cytodifférenciation des spermatides en spermatozoïdes. Chez l'homme, six stades de spermatides ont été décrits, selon leurs caractéristiques nucléaires et/ou acrosomiales et/ou cytoplasmiques, et sont appelées spermatides S_a , S_{b1} , S_{b2} , S_c , S_{d1} , et S_{d2} (8, 12-13). Chaque spermatide S_{d2} se différenciera en spermatozoïde, lequel sera libéré dans la lumière du tubule séminifère pour être excrété vers le canal épидидymaire.

À l'issue de la spermatogenèse, les spermatozoïdes sont considérés comme des cellules matures, ce qui n'est pas tout à fait exact puisque de nombreuses modifications membranaires et nucléaires vont encore devoir se produire pour qu'ils deviennent des gamètes mobiles et féconds.

Cycles de l'épithélium séminifère

Les différentes associations cellulaires sont chronologiquement et spatialement très organisées, ce qui permet de distinguer des cycles de l'épithélium séminifère. Ces cycles se déroulent par poussées ou vagues successives le long du tube séminifère.

Chez l'homme, le processus lent et continu de spermatogenèse (stade spermatogonie A_{pale} jusqu'à la spermiation) se déroule en moyenne en 74 jours (95 % IC : 69-80 jours), excrétion des spermatozoïdes comprise, sans que cette durée ne soit modifiée par la fréquence des éjaculations (12). Il faut rajouter à cela le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme : de 2,2 à plus de 8 jours, variable selon la fréquence éjaculatoire. Pour permettre la production continue de spermatozoïdes féconds, les cellules souches germinales sont programmées chez l'homme pour entrer en division par « vagues spermatogénétiques » tous les 16 jours. Les cellules de Sertoli sont étroitement associées à cette régulation. Ces vagues spermatogénétiques ou cycle de l'épithélium séminifère sont retrouvées sur les coupes histologiques de testicules. Certaines associations cellulaires sont systématiquement retrouvées sur les coupes. Six associations cellulaires sont classiquement décrites (14). La durée cumulée de ces six associations est ainsi de 16 jours, représentant la durée d'un cycle de l'épithélium séminifère (4,6 cycles pour une spermatogenèse complète de l'épithélium). Les associations cellulaires décrites ci-dessous décrivent les types cellulaires retrouvés, depuis le compartiment basal du tubule, jusqu'à sa lumière (entre parenthèses, le pourcentage de coupes de tubules comportant l'association cellulaire décrite, ainsi que la durée de l'association) :

- L'association I (30 % ; 4,8 jours) : spermatogonies- A_{dark} , spermatogonies- A_{pale} , spermatogonies-B, spermatocytes I au stade pachytène, spermatides S_a et S_{d1} .

- L'association II (20 % ; 3,2 jours) : spermatogonies-A_{pale}, spermatogonies-B, spermatocytes I au stade préleptotène, spermatides S_{d2} et spermatozoïdes.
- L'association III (6 % ; 0,96 jours) : spermatocytes I au stade préleptotène et spermatides S_{b1}.
- L'association IV (8 % ; 1,28 jours) : spermatocytes I au stade leptotène et spermatides S_{b2}.
- L'association V (31 % ; 4,96 jours) : spermatogonies-A_{dark}, spermatogonies-A_{pale}, spermatogonies-B, spermatocytes I au stade pachytène, spermatides S_c.
- L'association VI (5 % ; 0,8 jours) : spermatogonies-A_{dark}, spermatogonies-A_{pale}, spermatogonies-B, spermatocytes I au stade pachytène, spermatocytes II, spermatides S_c.

Notons qu'il existe des discussions autour de l'existence d'une division mitotique supplémentaire des spermatogonies-A_{pale} qui pourrait faire varier la durée de la spermatogenèse humaine.

Chez l'homme, les différentes générations de cellules germinales sont disposées dans les tubes selon des hélices concentriques. Ainsi, sur une même coupe histologique de tubules, il est possible de retrouver trois à cinq associations de cellules germinales différentes (fig. 4).

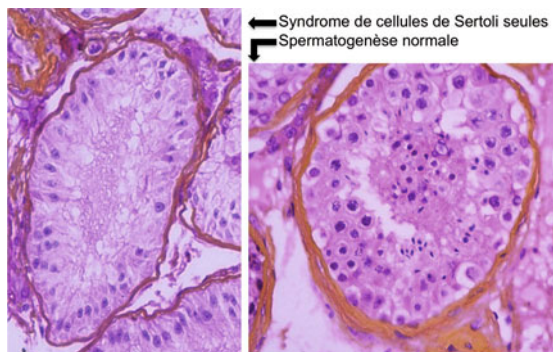


Fig. 4 – Coupe de tissu testiculaire normal et syndrome de cellules de Sertoli seules (SCOS : *Sertoli cell only syndrome*) ; grossissement x 1 700.

Cellules de Sertoli, barrière hémato-testiculaire, cellules de Leydig

La spermatogenèse se déroule dans les tubules séminifères grâce à la relation étroite entre les cellules somatiques de Sertoli et les cellules germinales (1, 15). Les cellules de Sertoli ont un rôle majeur dans le maintien de l'architecture complexe des tubules et dans la régulation et la programmation des cycles de l'épithélium séminifère. Les cellules de Sertoli assurent également un rôle de protection et de nutrition des cellules germinales, ainsi que la phagocytose des cellules germinales, surnuméraires ou anormales, et des corps résiduels des spermatides. Ce sont de grandes cellules pyramidales

qui s'étendent sur toute l'épaisseur de l'épithélium. La forme et le volume des Sertoli varient durant le cycle spermatogénétique, démontrant ainsi leur plasticité synchronisée avec l'évolution des cellules germinales. Les cellules de Sertoli sont ancrées à la membrane basale des tubules qu'elles synthétisent de concert avec les cellules périlitubulaires myoïdes. Les jonctions serrées (*tight-jonctions*) entre cellules de Sertoli adjacentes divisent l'épaisseur de l'épithélium séminifère en deux compartiments – le compartiment basal et le compartiment adluminal – participant ainsi à la formation d'une barrière hémato-testiculaire (16) (fig. 5).

Le compartiment basal, exposé à de nombreux composants de la lymphe et du sang, constitue une véritable niche pour les cellules souches testiculaires, les spermatogonies-A_{dark} et -A_{pale}, précurseurs de la spermatogenèse (17). Les interactions avec la cellule de Sertoli sont indispensables au maintien des caractères spécifiques des spermatogonies. Par exemple, certaines molécules produites par les cellules de Sertoli peuvent réguler la capacité de la niche à assurer le maintien et la différenciation des cellules souches (11) (fig. 3). Outre les spermatogonies, le compartiment basal contient également les spermatocytes I au stade préleptotène.

Le compartiment adluminal, quant à lui, contient au sein des cellules de Sertoli les spermatocytes à des stades plus avancés de la méiose, les spermatides post-méiotiques jusqu'à la spermiation. La barrière hémato-testiculaire s'établit au début de la puberté, lors du premier achèvement de la méiose par les cellules germinales, et va jouer un rôle de protection contre une réaction auto-immune ou des polluants véhiculés par le sang. Le compartiment adluminal est ainsi – immunologiquement – à l'abri de molécules et de cellules immunocompétentes d'origine sanguine. Cette protection assurée par la barrière hémato-testiculaire empêche ainsi la reconnaissance par le système immunitaire des protéines spécifiques de surface, qui sont exprimées à partir de la puberté, sur les cellules germinales au stade spermatocyte I pachytène, et le passage d'anticorps. En pathologie, la rupture de la barrière hémato-testiculaire par traumatisme testiculaire, inflammation, ou post-chirurgie testiculaire, peut induire une réaction immunologique aboutissant à la création d'anticorps anti-protéines spermatiques, communément appelés anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS), qui perturbent partiellement ou totalement le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (18, 19). En revanche, les cellules de Sertoli et les cellules périlitubulaires produisent des interférons et des protéines antivirales inductibles par l'interféron, leur conférant une fonction antivirale locale (20).

La spécificité de cette barrière contribue également à protéger la spermatogenèse d'agressions toxiques. Les études de reprotoxicité sur la gamé-

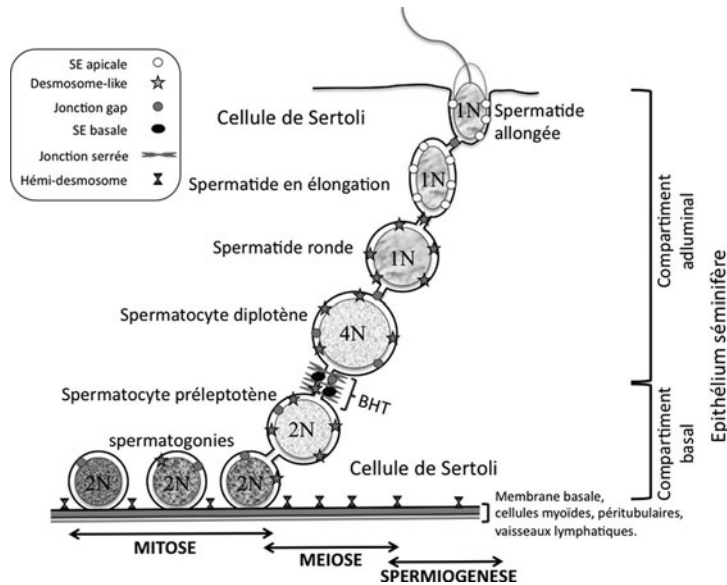


Fig. 5 – Représentation schématique de l'épithélium séminifère. Localisation relative des différents types de jonctions cellulaires constituant la barrière hémato-testiculaire (BHT) chez les mammifères (la meilleure description est faite chez le rat). La tunique propre du testicule est composée de deux zones acellulaires : la membrane basale et le réseau de collagène de type I ; et de deux zones cellulaires : les cellules myoïdes péricubulaires et les vaisseaux lymphatiques. La BHT du versant basal comprend des jonctions de type, serrée, gap, desmosome-like et de type spécialisation ectoplasmique (SE basale), entre cellules de Sertoli adjacentes. La BHT divise physiquement l'épithélium séminifère en deux compartiments, basal et adluminal (ou apical), conférant une polarité à l'épithélium. Les spermatocytes au stade préleptotène sont les cellules les plus différenciées du compartiment basal. À partir du stade diplotène, les spermatocytes I sont considérés comme appartenant au compartiment apical. Les spermatides en élongation sont principalement reliées entre elles et avec les cellules de Sertoli par des jonctions de type spécialisation ectoplasmique (SE apicale), assurant l'adhésion et l'orientation cellulaire de l'épithélium séminifère à ce niveau. Les jonctions cellulaires se rompent progressivement autour des spermatides allongées et l'expulsion du corps résiduel (reste cytoplasmique phagocyté par la cellule de Sertoli) se réalise pour que le gamète se libère dans la lumière du tubule. Noter les trois phases de la spermatogenèse, phase mitotique, phase méiotique et spermiogenèse, ainsi que le contenu génétique des cellules spermatogénétiques, cellules haploïdes (1N), cellules diploïdes (2N) et cellules tétraploïdes (4N). D'après Cheng et Mruk (16).

togenèse mâle se sont toujours confrontées au problème de la reconstitution, *in vitro*, de cette barrière hémato-testiculaire si singulière. L'endothélium et la lame basale des capillaires sanguins, les cellules péricubulaires, participent également à la constitution de la barrière hémato-testiculaire. Ainsi, seul le passage sélectif de molécules de taille réduite vers l'épithélium séminifère est admis. Par exemple, la barrière hémato-testiculaire facilite la diffusion de la testostérone et régule les mouvements d'hormones peptidiques comme l'inhibine et les gonadotropines. La concentration en inhibine est maintenue élevée dans le tubule alors que la FSH et la LH sont totalement exclues du liquide tubulaire.

Plusieurs autres types de jonctions relient les cellules de Sertoli entre elles et avec les cellules germinales. Nous pouvons citer, par exemple, des jonctions d'ancrage composées de plusieurs types de cadhérine et responsables de l'adhésivité cellulaire calcium-dépendante, des jonctions communicantes de type gap composées de diverses connexines, des desmosomes et des hémi-desmosomes, et enfin un dispositif jonctionnel particulier constitué par les expansions cytoplasmiques des spermatides allongées dans le cytoplasme sertolien (les complexes tubulo-bulbaires) (fig. 5).

Le cytosquelette des cellules de Sertoli, microfilaments d'actine et de vimentine, est très important pour le maintien de l'architecture cellulaire et pour les mouvements actifs du cytoplasme nécessaires à la migration des cellules germinales de la membrane basale vers la lumière du tubule. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique granulaire sont peu développés ; en revanche le réticulum endoplasmique lisse est le siège de synthèses particulièrement intenses nécessaires aux spermatides en élongations. Les lysosomes et les diverses vacuoles de résorption du matériel endocyté, tels les corps résiduels (restes cytoplasmiques) des spermatides et les cellules germinales en dégénérescence, sont répartis à deux niveaux différents de la cellule de Sertoli en fonction du stade du cycle de l'épithélium séminifère, soit au pôle basal périnucléaire, soit au pôle apical de la cellule.

Au cours de la spermatogenèse, les jonctions inter-sertoliennes se forment, se libèrent pour se reformer plus loin, assurant une véritable dynamique de remodelage qui autorise la migration des gamètes en maturation vers le compartiment adluminal du tubule. Le remodelage des jonctions cellulaires est hautement régulé afin d'organiser le passage des spermatocytes préleptotènes vers

le stade leptotène, cellules caractéristiques qui signalent l'entrée dans le compartiment adluminal de l'épithélium (21).

Les cellules de Sertoli procurent également les conditions critiques nécessaires au succès de l'évolution des spermatogonies en spermatides allongées, conditions physiques en tant que cellules de support, mais également créatrices d'un environnement biochimique spécifique à la stimulation de la maturation des cellules germinales. Les sécrétions des cellules de Sertoli sont très nombreuses et constituent la base moléculaire des interactions avec les cellules germinales (15) (fig. 6).

Plusieurs catégories de glycoprotéines sont individualisées, les protéines de transport ou bioprotectives qui sont abondantes et incluent les protéines transporteuses de métaux comme la transferrine et la céruloplasmine, les protéases et inhibiteurs de protéases qui sont particulièrement impliqués au cours de la spermiation et de la migration des spermatocytes préleptotène vers le compartiment adluminal, les glycoprotéines sécrétées pour former la membrane basale, et des glycoprotéines de régulation aux actions souvent inconnus. Le rôle de la transferrine, protéine transporteur du fer, est, quant à elle, bien décrit. Le fer est un facteur limitant quant à la constitution des jonctions serrées et est donc essentiel au développement normal de la maturation gamétique (15, 22, 23).

La relation très étroite entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales est indispensable à la spermatogenèse mais également au développement testiculaire (24).

Lors de la formation initiale du testicule embryonnaire, les cellules de Sertoli séquestrent les cellules germinales appelées gonocytes primordiaux à l'intérieur de cordons précurseurs des tubes séminifères et inhibent l'entrée en méiose des gonocytes. Les tubes séminifères ne prennent réellement forme qu'à la puberté.

Ce processus chez le mâle est gouverné par certains gènes spécifiques du chromosome Y. Les cellules de Sertoli et les cellules germinales entrent rapidement en prolifération après la formation du testicule embryonnaire. L'hormone anti-müllérienne (AMH), premier facteur endocrinien sécrété par le testicule embryonnaire, est produite par les cellules de Sertoli dès le début de la différenciation testiculaire. Cette hormone est à son maximum pendant la période fœtale afin d'assurer la régression des canaux de Müller et sa sécrétion ne diminue pratiquement qu'à la puberté (25, 26). Enfin, la puberté induit l'arrêt des mitoses sertoliennes, la formation de jonctions serrées entre cellules de Sertoli adjacentes, la poursuite à son terme du processus méiotique des cellules germinales et la différenciation spermatique jusqu'au stade de spermatozoïdes. C'est également à la puberté que se forme la barrière hémato-testiculaire sous l'action des androgènes. Avant la puberté, la spermatogenèse est incomplète, on ne peut, par exemple, qu'observer des précurseurs gamétiques allant jusqu'au stade de spermatocyte I chez des enfants de 6 ans.

Comme nous l'avons vu précédemment, le testicule est le siège de deux fonctions distinctes, compartimentées, la gamétogenèse dans les tubules séminifères, et la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig dans l'interstitium, entre les tubules. Il existe chez la souris deux populations distinctes de cellules de Leydig qui interviennent de manière séquentielle durant le développement testiculaire (27, 28). La première population est fœtale mais persiste minoritairement après la naissance alors que la seconde population se multiplie rapidement à la puberté, sous l'action de la LH, pour former des îlots cellulaires interstitiels proches des cellules péritubulaires, et migrer à l'âge adulte vers le centre de l'interstitium. Les facteurs régissant la mise en place des cellules de Leydig et leurs fonctions sont encore largement inconnus mais les gonadotropines LH (*luteinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*), les hormones thyroïdiennes, les hormones adrénocorticoïdes, les estrogènes et les androgènes, semblent intervenir.

Les cellules mésenchymateuses péritubulaires qui forment la limite externe des tubules séminifères ont des fonctions multiples. Elles sécrètent des facteurs tels que P-Mod-S qui module de nombreuses fonctions des cellules de Sertoli (29). Les cellules péritubulaires ont également une fonction contractile qui faciliterait le transport des cellules séminales depuis la lumière des tubules séminifères vers le canal épидидymaire, et participeraient au contrôle de la sécrétion du fluide tubulaire et indirectement au contrôle du rendement de la spermatogenèse (30). Des récepteurs aux androgènes ont été mis en évidence dans les cellules péritubulaires

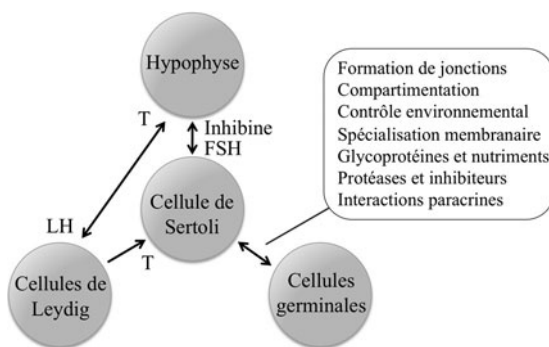


Fig. 6 – Diagramme illustrant le rôle central des cellules de Sertoli pour le contrôle de la spermatogenèse. Dialogues entre les cellules, hypophysaires, de Leydig, de Sertoli, et les cellules germinales via les hormones, testostérone (T), LH (*luteinizing hormone*), FSH (*follicle stimulating hormone*) et inhibine. D'après Griswold (15).

ou la follistatine, jouent également sur les régulations complexes contrôlant la synthèse et la libération de FSH et de LH (35).

L'inhibine a une double action inhibitrice, certaine au niveau hypophysaire, et probable au niveau hypothalamique. L'inhibine réduit à la fois la synthèse et la libération de FSH.

On peut donc résumer ainsi : le rétrocontrôle de la LH est dû exclusivement à l'action des stéroïdes leydigiens, alors que le rétrocontrôle de la FSH résulte de l'action des stéroïdes leydigiens ainsi que de celle de l'inhibine.

Régulations intragonadiques paracrine et autocrine

La culture *ex vivo* de fragments de tubules séminifères ainsi que les cocultures des divers types cellulaires du testicule, ont permis de mettre en évidence certaines interactions moléculaires entre les cellules.

Il a été observé notamment, une régulation paracrine des fonctions leydigiennes. Par exemple, la FSH stimule indirectement, via la cellule de Sertoli, les îlots de Leydig. La coculture de cellules de Sertoli et de cellules de Leydig induit une augmentation du nombre de récepteurs à LH ainsi qu'une augmentation de la production de stéroïdes par ces cellules. Cet effet est amplifié en présence de FSH dans la coculture. De plus, les hormones peptidiques et les facteurs de croissance produits par les cellules de Sertoli régulent la stéroïdogénèse leydigienne, positivement pour l'inhibine et l'IGF-1 (*insulin like-growth factor-1*), négativement pour l'activine et le TGF β (*transforming growth factor* β). Les cellules périlitubulaires, quant à elle, produisent P-Mod-S (*peritubular modifying substance*) (fig. 7), une protéine à action paracrine régulatrice des fonctions sertoliennes (29, 36). Le P-Mod-S induit la sécrétion d'ABP (*androgen binding protein*) et de transferrine par la cellule de Sertoli, mais inhibe l'activité de l'aromatase qui assure la transformation des androgènes en estrogènes et est présente dans de nombreux types cellulaires au niveau testiculaire.

Les cellules de Leydig élaborent de très nombreuses molécules autres que des stéroïdes. Par exemple, la régulation paracrine exercée par ces cellules fait intervenir l'ocytocine qui agit sur les cellules myoïdes périlitubulaires, et également des peptides opioïdes au rôle plus récemment investigué. Ces dernières, appelées endocannabinoïdes, sont des modulateurs lipidiques qui se lient aux récepteurs cannabinoïdes CNR. Ces récepteurs étaient jusqu'alors uniquement retrouvés dans le cerveau. Récemment, des CNR ont été retrouvés dans les cellules de Leydig, dans les cellules de Sertoli et dans les cellules de la lignée germinale. Chez l'homme et les rongeurs, l'exposition chronique aux canna-

binoïdes, ou leur consommation, diminue la production et la sécrétion de testostérone, altère la spermatogénèse et réduit le poids des testicules et des glandes annexes (37-39). Les cellules de Leydig produisent également beaucoup de facteurs de croissance qui ont un effet sur les cellules de Sertoli prépubères mais également adultes (IGF-1, TGF β et IL-1 [interleukine-1]) (36).

En ce qui concerne les régulations paracrine et autocrine des cellules de Sertoli sur les cellules germinales, plus de 200 molécules sécrétées par les Sertoli étant retrouvées, nous ne reprendrons que les molécules les mieux caractérisées. Parmi les facteurs agissants sur les cellules germinales nous citerons les métabolites du glucose, des protéines régulatrices, des lipides, des glycoprotéines sulfatées, des protéines de liaison aux vitamines, et des facteurs de croissance.

L'action de la vitamine A est bien décrite et indique que c'est un élément essentiel de la différenciation des spermatogonies, de leur entrée en méiose et de la spermiation des spermatides (40). L'inhibine et l'activine sertoliennes ont respectivement un effet inhibiteur et activateur sur la multiplication des cellules germinales. Enfin, EGF (*epidermal growth factor*), IGF-1 et le bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) activent alors que le TGF β inhibe la prolifération des cellules germinales.

Les cellules germinales elles-mêmes exercent un effet paracrine sur les fonctions sertoliennes. L'expression de leurs ARNm et leurs synthèses protéiques dépendent du stade du cycle de l'épithélium séminifère ; selon le stade des cellules germinales en développement, la production d'inhibine, d'activateur du plasminogène, ou de transferrine par les cellules de Sertoli varie beaucoup, de même que la réponse à la testostérone et à la FSH. La coculture de cellules germinales avec des cellules de Sertoli augmente la production d'ABP et de transferrine de ces dernières. Les corps résiduels, reliquats cytoplasmiques des spermatides matures phagocytés par les cellules de Sertoli, génèrent la synthèse d'IL-1 α puis d'IL-6. IL-1 α stimule la synthèse d'ADN des spermatogonies préleptotène alors qu'IL-6 l'inhibe. Les spermatocytes au stade pachytène ainsi que les spermatides rondes sécrètent de l'EGF ou du TGF β qui active et inhibe, respectivement, la production d'inhibine de la cellule de Sertoli. Il a été très récemment démontré chez le rat que le β NGF (β *nerve growth factor*), sécrété par les cellules germinales principalement aux stades de spermatocytes pachytènes et spermatides rondes, bloque les spermatocytes II en métaphase via l'augmentation de Mos et Emi2 (deux protéines constitutantes du CSF) dans les spermatocytes selon un schéma rappelant ce qui se réalise au cours de la maturation ovocytaire (41). Quant au bFGF, détecté dans les spermatogonies et les spermatocytes pachytènes, il stimule toutes les fonctions sertoliennes (fig. 8).

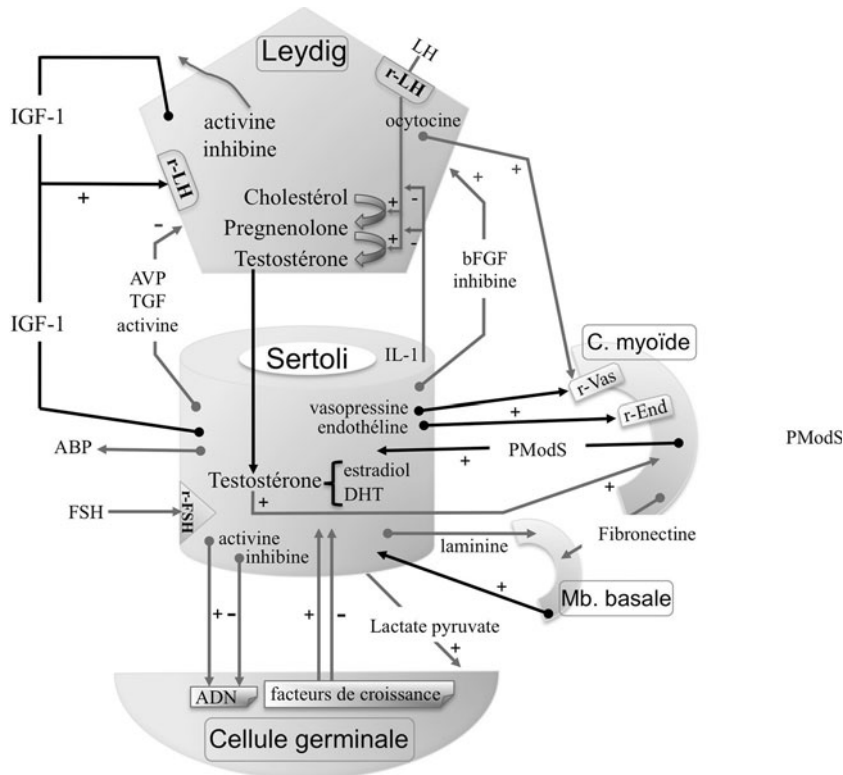


Fig. 8 – Relations paracrines entre les cellules de Leydig, les cellules péritubulaires, les cellules de Sertoli et les cellules germinales : les régulations intra-gonadiques restent sous le contrôle endocrine des gonadotropines. Les facteurs dont l'action est unanimement reconnue sont figurés en traits gras. D'après Dadoune et Dumoulin (1).

Les effets des estrogènes sur la spermatogenèse sont maintenant clairement établis (42). Même si l'équilibre androgènes/oestrogènes est important pour le développement sexué, chez le mâle cette balance existe avec une régulation précise, endocrine et paracrine, qui participe à sa complexité. L'activité cellulaire d'aromatase, qui permet la transformation des androgènes en oestrogènes, est au centre de l'équilibre. À côté des effets bien démontrés des estrogènes dans l'augmentation des pathologies masculines congénitales ou non, telles que cryptorchidie, hypospadias, cancers testiculaires, et perturbations diverses de la spermatogenèse, il existe des pathologies de l'aromatase elle-même (43, 44). L'identification de patients déficitaires en aromatase a permis de mieux comprendre l'action des oestrogènes sur la fertilité mâle. Chez l'homme, les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, ainsi que les cellules germinales aux stades de spermatocytes, spermatoïdes et spermatozoïdes, expriment le récepteur de l'aromatase (42).

Androgènes et testicule

Les androgènes, la testostérone ou son métabolite, la 5-dihydroxytestostérone (DHT), sont des

hormones stéroïdes qui déterminent l'expression du phénotype mâle, depuis le développement des gonades mâles et la conservation des caractères sexuels secondaires jusqu'à l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. Le sang veineux testiculaire transporte de la testostérone et des stéroïdes en quantité importante. Le gradient de concentration entre les compartiments artériel et veineux pour la testostérone, le sulfate de déhydroépiandrosterone et le sulfate d'androstènediol, est très en faveur du compartiment veineux. La lymphe participe également au transport des stéroïdes vers la circulation générale (28).

Le mode d'action hormonal utilise le récepteur aux androgènes (RA), un des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le gène du RA est de type facteur de transcription inductible par son ligand. Il est localisé sur le bras long du chromosome X (Xq11-12) (44). L'induction de RA module l'expression de plusieurs gènes cibles aboutissant à l'accomplissement de la spermatogenèse et plus largement à la fertilité (45). Ce sont les travaux utilisant des souris *knock-out* (KO) et chimériques pour ce récepteur qui ont démontré l'importance de l'intégrité du récepteur aux androgènes pour l'acquisition et la maintenance du phénotype mâle. Pour exemple, la souris mâle, KO totale pour le RA, exprime

un phénotype totalement féminin pour l'anatomie des organes sexuels, vagin, clitoris, et le testicule est féminisant en position intra-abdominale. Cela correspond exactement au cas pathologique d'insensibilité du récepteur aux androgènes chez l'homme.

Il est maintenant démontré que le RA est présent dans les cellules de Sertoli, les cellules péritubulaires et les cellules des espaces interstitiels incluant les cellules de Leydig et les cellules musculaires lisses périvasculaires du testicule humain (25). En revanche, la localisation du RA dans les cellules germinales est encore controversée selon les espèces étudiées. Il semblerait que la présence du RA à certains stades des cellules germinales, notamment au stade de spermatides allongées chez le rat, et des spermatozoïdes chez le singe, permet d'envisager une action des androgènes sur la mobilité gamétique et plus largement sur la maturation finale des spermatides (46). Enfin, la présence du RA dans les mitochondries et la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains permettent de supposer un rôle direct des androgènes sur les cellules germinales (47).

Comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, la spermatogenèse est très dépendante des facteurs paracrines et autocrines qui sont synthétisés par les divers types de cellules testiculaires, cellules de Sertoli et cellules péritubulaires particulièrement. La transgénèse animale du récepteur aux androgènes ne permet pas à elle seule de savoir précisément comment le RA dans chaque type cellulaire du testicule agit sur la spermatogenèse.

On peut cependant résumer les connaissances actuelles ainsi :

1. Les cellules de Sertoli sans RA ont des fonctions de soutien et de nutrition des cellules germinales très perturbées. La spermatogenèse s'arrête alors au stade de spermatocytes I diplotène, avant l'accomplissement de la première division méiotique.
 2. L'absence du RA dans les cellules de Leydig affecte principalement la fonction de production d'androgène. La spermatogenèse est alors bloquée plus tardivement, au stade spermatides rondes.
 3. L'absence du RA dans les cellules musculaires lisses et les cellules péritubulaires myoïdes n'empêche pas une spermatogenèse complète mais la production de spermatozoïdes est réduite.
 4. De manière contradictoire, l'expérimentation qui consiste en la délétion du RA des cellules germinales n'affecterait pas la fertilité des souris (48).
- La connaissance de l'action des androgènes sur la spermatogenèse humaine n'est donc pas encore totale et nécessite de nouveaux outils expérimentaux.

Apoptose et spermatogenèse

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée. Ce mécanisme intervient de manière

importante durant la spermatogenèse normale en éliminant beaucoup des cellules germinales porteuses d'anomalies génétiques impropres à la réalisation d'une fécondation normale et/ou à la conception d'une descendance saine. Toute dérégulation du phénomène apoptotique, par excès ou par défaut, peut induire une infertilité.

L'apoptose des cellules germinales se déroule en impliquant deux processus, l'un intrinsèque dans les mitochondries (protéines Bcl-2), l'autre extrinsèque par des récepteurs membranaires (superfamille du récepteur au TNF). Les stimuli apoptotiques physiologiques contrôlent l'homéostasie du tissu testiculaire, mais dans des conditions pathologiques, des agents externes incluant de nombreux toxiques chimiques, des protéines du stress cellulaire à la chaleur, et des traitements de chimiothérapie, peuvent intervenir négativement sur le phénomène. Les dérèglements hormonaux sont également à l'origine d'une apoptose perturbée. Le type de processus apoptotique adopté par les cellules germinales dépend du type de stimulus (49). La mise en évidence de mécanismes membranaires empruntant certaines voies du processus apoptotique sur les spermatozoïdes éjaculés fait débat. Il pourrait pourtant s'agir alors d'une mort programmée du spermatozoïde en l'absence de fécondation intriquant étroitement deux mécanismes, celui de l'apoptose et celui de la capacitation spermatique (50, 51).

Notions de toxicologie reproductive – Réglementation REACH – Méthodes d'étude

Plusieurs études suggèrent que l'exposition à des polluants présents à des doses même très faibles (micropolluants) dans l'environnement serait responsable d'altérations de la fonction de reproduction masculine et de certaines pathologies testiculaires (diminution du nombre de spermatozoïdes, cancers, cryptorchidie, hypospadias), dont le nombre a augmenté au cours des cinq dernières décennies dans certaines régions du monde (52, 53). Il devient indispensable de mieux connaître leur impact sur la santé humaine et sur l'environnement et de caractériser les mécanismes d'action des différentes classes de produits au niveau du système reproducteur et notamment sur la spermatogenèse.

C'est dans ce contexte qu'est entrée en vigueur, le 1^{er} juin 2007, la réglementation européenne REACH (règlement n°1907/2006/CE sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques) dont les objectifs sont de fournir une meilleure connaissance des propriétés chimiques, toxiques et écotoxiques des substances

fabriquées ou importées dans l'Union européenne, d'assurer la maîtrise des risques liés à leurs usages et, si nécessaire, de restreindre ou d'interdire leur emploi si une toxicité sur la reproduction et/ou le développement était démontrée. Environ 30 000 substances chimiques, présentes dans les produits de consommation courante et produites dans des volumes supérieurs à 1 tonne par an, sont concernées par cette procédure qui sera gérée au niveau de l'Europe par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA). Les substances particulièrement préoccupantes, telles que les substances CMR (cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques), PBT (persistantes, bioaccumulables et toxiques), vPvB (très persistantes et très bioaccumulables), et celles ayant des caractéristiques particulières, par exemple, les substances perturbant le fonctionnement hormonal appelées plus généralement « perturbateurs endocriniens », devront obtenir l'autorisation de la Commission européenne, qui s'appuiera sur les recommandations de l'ECHA. Leur utilisation pourra aussi être soumise à restriction, voire être interdite. Pour toutes les molécules concernées par REACH, il sera nécessaire d'effectuer une batterie de tests physicochimiques, d'écotoxicité et de toxicité. L'expérimentation animale nécessaire à ces tests pourrait alors entraîner l'utilisation de plusieurs millions d'animaux. Et même si REACH et la directive 86/609/CE du Conseil encouragent l'utilisation de méthodes alternatives comme les modèles cellulaires (*ex vivo*), moléculaires (*in vitro*) ou encore de modélisation informatique (*in silico*), la Commission européenne, pour autant, ne définit pas précisément les tests alternatifs à utiliser.

Différents systèmes de culture *ex vivo*

L'organisation complexe du testicule rend particulièrement difficile l'étude de sa physiopathologie. C'est pourquoi, différents systèmes de culture *ex vivo* du tissu testiculaire ou des cellules testiculaires isolées ont été développés et ont permis aux chercheurs de mieux caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires ainsi que les facteurs impliqués dans la spermatogenèse et sa régulation. Aujourd'hui encore, les enjeux de la spermatogenèse *ex vivo* restent primordiaux non seulement pour la recherche fondamentale mais aussi pour les études toxicologiques et les applications médicales futures comme la maturation des spermatozoïdes *ex vivo* ou la préservation de la fertilité chez les enfants sous traitements gonadotoxiques. Plusieurs méthodes de culture sont donc proposées.

Culture organotypique

La culture organotypique correspond à la culture *ex vivo* de testicules ou de fragments de tissu testi-

culaire. Le tissu, ainsi cultivé, garde pendant quelques jours son organisation tridimensionnelle et sa fonction. Sur le plan fonctionnel, nous sommes proches de la situation *in vivo*. Cependant, au bout de quelques jours, une nécrose centrale peut apparaître et la migration des cellules sur le support de culture entraîne une perte de l'architecture. Son principal avantage est qu'il respecte l'architecture des tubules séminifères et les interactions entre les cellules somatiques et les cellules germinales (54).

Culture de tubes séminifères isolés

La culture de tubes séminifères isolés par digestion enzymatique et mécanique du tissu testiculaire permet de conserver l'architecture tridimensionnelle et les relations existants entre les cellules germinales et les cellules somatiques. Au bout de quelques jours, les cellules somatiques vont coloniser la surface des boîtes de culture. Il est également observé une comigration des cellules de Sertoli avec des cellules germinales due à la présence de jonctions intercellulaires conservées intactes. Les ponts cytoplasmiques entre les cellules germinales sont également maintenus. La technique de microdissection des tubes séminifères par transillumination permet le tri, avant leur culture, des tubes en fonction du stade du cycle de l'épithélium séminifère visible par transparence au moyen d'une lumière blanche. Une amélioration importante a résidé dans la culture des fragments de tubes séminifères sur des supports perméables qui permettent aux cellules de s'organiser en un système polarisé similaire à celui de l'épithélium séminifère *in vivo* (55).

Monoculture de cellules testiculaires

Avec le développement de la culture cellulaire, il a été possible de dissocier les cellules du tissu par digestion enzymatique et mécanique et d'isoler plus particulièrement un type cellulaire, notamment grâce aux techniques de sédimentation, de centrifugation, d'élutriation centrifuge ou encore de cytométrie en flux associée au trieur de cellules. Ainsi, il a été développé des monocultures des cellules du tube séminifère (ou une population enrichie) telle que les cellules de Sertoli, les cellules périlitubulaires, ou les cellules germinales (au stade de différenciation désiré), mais aussi des cellules du tissu interstitiel comme les cellules de Leydig et les macrophages. Dans ces conditions, les cellules gardent leurs propriétés intrinsèques pendant quelques jours seulement (56).

Culture de cellules immortalisées

Quelques équipes ont obtenu des cellules germinales mâles ou des cellules de Sertoli immortalisées, le plus souvent par l'introduction d'une oncoprotéine

virale immortalisant et/ou par mutagenèse dirigée. Cependant, ce type de cellules modifiées n'a pas encore apporté la preuve de son utilité en recherche fondamentale et est encore peu utilisé.

Co-culture de cellules de Sertoli et de cellules germinales

Pour étudier plus précisément la spermatogenèse et permettre aux cellules germinales de se multiplier et se différencier *ex vivo*, il a fallu développer des systèmes ingénieux de coculture et mettre au point les milieux et les conditions de culture adéquates. Comme nous avons pu le voir, les cellules germinales ont besoin d'un environnement sertolien pour survivre et se différencier. En conséquence, des systèmes de coculture de cellules de Sertoli et de cellules germinales ont été mis au point. Dans ces conditions, les cellules germinales gardent leurs caractéristiques morphologiques, leurs interactions avec les cellules de Sertoli, survivent et se différencient. Il est possible, grâce au tri cellulaire, de cultiver des cellules de Sertoli avec des cellules germinales à un stade précis (spermatogonies, spermatocytes ou spermatides). La coculture peut également se faire sur un support perméable recouvert ou non d'extraits de matrice extracellulaire ou de cellules périvitellines précultivées, ce qui permet de conserver la polarité fonctionnelle des cellules de Sertoli (57). D'autres systèmes ont été développés comme les cocultures tridimensionnelles dans un milieu semi-solide de type Agar ou les cocultures utilisant des cellules transformées (coculture de cellules germinales et de cellules de Sertoli immortalisées) (58).

L'ensemble de ces méthodes ouvre de nouvelles perspectives non seulement dans le domaine de la recherche fondamentale, mais aussi dans le cadre de nouvelles thérapies luttant contre l'infertilité masculine (maturation *ex vivo*, criblage de médicaments) ou en toxicologie testiculaire prédictive.

Avantage/inconvénient des méthodes *ex vivo* pour l'étude en toxicologie des fonctions testiculaires

Dans le cadre de REACH, l'évaluation de la reprotoxicité repose sur des essais spécifiés par l'OCDE, où l'expérimentation animale est la règle puisque peu de méthodes alternatives ont été validées. Nous manquons donc de modèles pertinents et les rares modèles *in vivo* utilisés ne sont pas toujours les plus appropriés pour des études mécanistiques. Les études *in vitro* réalisées jusqu'ici en toxicologie ont utilisé principalement des monocultures primaires ou des lignées de cellules somatiques testiculaires (cellules de Leydig ou cellules de Sertoli). Ces monocultures primaires sont des systèmes simples (monocouche) qui permettent l'étude des aspects fonctionnels des cellules cultivées (sécré-

tion, réponse à des facteurs exogènes, récepteurs, survie, prolifération). Toutefois, de tels systèmes ne permettent pas d'étudier les effets de ces composés sur la spermatogenèse « physiologique » et les cultures de cellules germinales isolées ont une faible durée de vie en monoculture, ce qui réduit grandement la pertinence des résultats obtenus (59). D'autres systèmes ont donc été proposés. Les cultures organotypiques de fragments de testicules fœtaux humains ou murins (60) permettent d'étudier un nombre restreint de paramètres sur certaines populations de cellules germinales (gonocytes). Cette méthode est inappropriée pour permettre, en culture, l'achèvement de la méiose comme lors d'une spermatogenèse complète car l'espérance de vie des cellules germinales différenciées est ici relativement courte (54). Par ailleurs, la disponibilité du tissu humain limite l'utilisation d'une telle approche à grande échelle.

Deux autres méthodes semblent bien plus pertinentes et facilement reproductibles pour évaluer et étudier les effets toxiques de substances chimiques sur la spermatogenèse. Ce sont les cultures de tubes séminifères isolés et les cocultures utilisant des boîtes bi-compartmentées (bicamérales), les deux compartiments étant séparés par un support perméable. La coculture de cellules testiculaires est réalisée dans le compartiment supérieur de la boîte, sur le support. Les jonctions cellulaires inter-sertoliennes et celles entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont maintenues ou se remettent en place. Avant d'atteindre les cellules germinales, les composés potentiellement toxiques déposés dans le compartiment inférieur doivent traverser cette barrière reproduisant *ex vivo* la barrière hémato-testiculaire.

En revanche, en culture classique, un composé décrit comme toxique pour certains types de cellules germinales, différenciées ou non, est déposé directement au contact de celles-ci. *In vivo*, ce composé toxique n'aurait peut-être pas eu accès aux cellules germinales en raison de la perméabilité sélective de la barrière hémato-testiculaire.

Le système de coculture de cellules testiculaires en boîte bicamérale a permis de réaliser des cultures sur une durée de plus de 4 semaines et de démontrer que l'ensemble de la méiose ainsi que le début de la spermiogenèse pouvaient être obtenus *ex vivo* chez le rat (55, 61). Dans ce système, la chronologie de la différenciation des cellules germinales mâles est respectée et il a été possible d'étudier certains mécanismes de régulation de la spermatogenèse ainsi que la toxicité de certaines substances validant et rendant pertinent ce système vis-à-vis de la physiologie testiculaire (62). Ces systèmes de coculture couplés à des méthodes analytiques performantes permettront d'étudier un grand nombre de paramètres, de déterminer

les mécanismes moléculaires responsables de la toxicité testiculaire de faibles concentrations de composés organiques ou minéraux, étudiés seuls ou en cocktail. Il sera également possible de corréler les perturbations somatiques et germinales, observées au cours de la culture, aux modifications du transcriptome et du protéome de ces cellules. Le modèle rat est actuellement le plus utilisé mais d'autres modèles seront probablement nécessaires à brève échéance.

Préservation de la fertilité – Transplantation de cellules germinales – Maturation *ex vivo* des gamètes et cellules souches testiculaires

Les progrès réalisés en AMP et une meilleure connaissance des mécanismes de la spermatogenèse ouvrent de nouvelles perspectives pour le traitement de certaines stérilités et sur les possibilités de préserver la fertilité. Deux approches sont en cours de développement. La première consiste à cryoconserver du tissu testiculaire et la deuxième à maturer des cellules germinales *ex vivo*.

Congélation du tissu testiculaire – Greffe – Maturation *ex vivo* du tissu testiculaire

Lors de certaines pathologies, cancéreuses notamment, les traitements utilisés peuvent être stérilisants. La préservation de la fertilité est donc un enjeu important, particulièrement chez les enfants prépubères, chez lesquels aucune cryoconservation du sperme ne peut être proposée. Une procédure innovante de préservation de la fertilité a été récemment publiée. Elle consiste à prélever et cryoconserver du tissu testiculaire immature contenant les cellules souches germinales. Après guérison, l'enfant devenu adulte et qui exprime son désir de paternité peut se voir proposer deux solutions pour utiliser le tissu testiculaire congelé : soit la greffe intratesticulaire du tissu est réalisée afin qu'une spermatogenèse complète se remette en place, soit la maturation *ex vivo* du tissu afin d'obtenir des spermatozoïdes utilisables en fécondation *in vitro* assistée par micromanipulation (*intracytoplasmic sperm injection* ou ICSI) est effectuée.

Des études précliniques ont permis de démontrer la faisabilité d'une transplantation autologue intratesticulaire de tissu testiculaire, immature ou mature, ou encore de spermatogonies ayant subi la cryoconservation (63). Il a été observé une spermatogenèse normale dans le testicule greffé avec production *in situ* de spermatozoïdes fonctionnels et matures capables de féconder des ovocytes et de

générer une descendance. Ces résultats permettent d'envisager le repeuplement du testicule d'hommes soumis à des traitements chimio- ou radiothérapeutiques. Cependant, de nombreux problèmes demeurent et une application clinique de la préservation de la fertilité nécessite encore l'amélioration de la technique et l'optimisation des différentes étapes, prélèvement, congélation/décongélation, préparation du tissu ou des cellules, transplantation *in situ*, avant d'offrir une (ré) initiation de la spermatogenèse à partir du tissu ou des cellules transplantées. Il est également nécessaire de se prémunir contre les risques biologiques qui s'y rapportent, en particulier celui de l'introduction possible d'agents pathogènes ou de cellules cancéreuses.

D'autres voies alternatives à la technique de transplantation ont été proposées, comme la xénogreffe (greffe chez des souris immunodéficientes par exemple), la protection des gonades par suppression hormonale ou la culture et la maturation *ex vivo* des cellules germinales après décongélation du tissu testiculaire, permettant d'obtenir ainsi des spermatozoïdes utilisables en ICSI. Pour des raisons éthiques, de coût ou tout simplement d'efficacité, parmi ces alternatives, la maturation *ex vivo* semble la plus attractive.

Restauration de la fertilité masculine par la spermatogenèse *ex vivo*

Certaines infertilités masculines proviennent d'un blocage de la spermatogenèse durant la méiose ou au cours de la spermiogenèse. Récemment, à partir des progrès réalisés en culture cellulaire, il a été proposé d'obtenir des spermatides voire des spermatozoïdes utilisables pour l'ICSI, à partir de spermatozytes provenant d'hommes ayant un arrêt de la spermatogenèse, en utilisant des systèmes de culture *ex vivo*. Il a été plus anciennement décrit, et la controverse persiste encore, que dans le cas d'arrêt complet de la spermiogenèse au stade de spermatides rondes, leur utilisation ou l'obtention *in vitro* de spermatides allongées ont donné des naissances (64, 65). Les mécanismes biologiques qui sous-tendent les processus de fécondation et de développement embryonnaires sont encore mal connus et l'utilisation de spermatides, cellules germinales immatures, obtenues ou non par différenciation *ex vivo*, soulèvent de nombreux questionnements.

Toutefois, de grands progrès continuent d'être obtenus concernant la spermatogenèse *ex vivo* et, d'ici quelques années, l'obtention de spermatozoïdes matures sera, sans doute, réalisable. Une autre voie thérapeutique a vu récemment le jour avec la possibilité d'obtenir des cellules germinales dérivées de cellules souches embryonnaires.

Cellules germinales dérivées de cellules souches embryonnaires

Depuis peu de temps, des équipes de recherche ont réussi, chez la souris, à différencier *ex vivo* des cellules souches embryonnaires (ES) en cellules germinales mâles (66). Des cellules germinales souches dérivées de cellules souches embryonnaires transplantées dans un testicule ne contenant pas de cellules germinales ont produit des spermatozoïdes matures. Cependant, les spermatozoïdes présentaient des anomalies structurales et une mobilité réduite. Injectés dans des ovocytes, ils ont néanmoins permis l'obtention d'embryon. Une équipe aurait même réussi à obtenir, chez la souris, une descendance après l'injection ovocytaire intracytoplasmique de ces cellules germinales différenciées dérivées de cellules ES. Cependant, ces résultats restent à confirmer d'autant qu'il existe une létalité précoce des quelques animaux nés de cette procédure et des aberrations génétiques induites. Compte tenu de l'inefficacité actuelle de la gamétogenèse *ex vivo* à produire des spermatozoïdes fonctionnels à partir de cellules ES et de la rareté des données, l'utilisation des cellules ES (ou de cellules souches pluripotentes induites, iPS) comme source de gamètes ou comme traitement de l'infertilité est une perspective encore lointaine.

Conclusion

Dans ce chapitre sur la spermatogenèse, nous avons tout d'abord classiquement souhaité aborder l'aspect descriptif de son anatomie, de sa physiologie et de ses régulations.

Même si l'accumulation de données scientifiques ces dernières années a permis d'importantes avancées en assistance médicale à la procréation notamment dans le diagnostic et le traitement des pathologies testiculaires, congénitales ou acquises, il reste encore un long chemin à parcourir avant d'atteindre une connaissance complète des mécanismes et des acteurs de la régulation de la spermatogenèse (67). Il sera bien sûr toujours possible d'aller plus loin dans le traitement des infertilités masculines, notamment par la réalisation *in vitro*/*in vivo* d'une spermatogenèse complète, à partir de cellules souches de diverses origines (adultes, iPS, embryonnaires, etc.), autologues au patient infertile.

Mais nous pensons que cet enjeu thérapeutique est secondaire par rapport à celui, prioritaire, qui concerne l'évaluation des substances sur la spermatogenèse. En effet, depuis la promulgation en 2007 de la législation européenne REACH impose

de connaître la toxicité éventuelle des molécules chimiques commercialisées sur la reproduction et le développement embryonnaire, la recherche doit, avant de chercher à traiter les rares cas d'infertilité masculine au-delà de toute thérapeutique depuis l'avènement de la technique ICSI, prioritairement tenter d'évaluer l'action des toxiques présents dans notre environnement sur la spermatogenèse pour mieux la préserver. Il est donc important d'avoir à présent des outils pertinents pour l'évaluation de cette toxicité (68). C'est pourquoi nous avons décrit les méthodes actuelles qui permettent d'évaluer la reprotoxicité, *in vitro*. Celle-ci a jusqu'alors été principalement évaluée par les industriels, *in vivo* sur des modèles animaux peu pertinents. De plus, la réglementation REACH préconise des méthodes alternatives afin de répondre aux objectifs français et européens de réduire l'usage d'animaux de laboratoires (69).

Nous souhaitons, pour terminer, introduire ici la notion de « physio-toxicologie testiculaire » qui sous-entend de caractériser l'effet du toxique aux différentes périodes du développement de la fonction testiculaire, c'est-à-dire dans des conditions aussi proches que possible de la physiologie. En effet, la complexité de l'évaluation des toxiques sur la spermatogenèse est en rapport avec le moment de l'action du toxique sur le testicule : en période embryonnaire et fœtale, en période néonatale et prépubertaire, ou au moment de l'activité reproductive adulte. L'usage de cocultures *in vitro* semble prometteur pour évaluer l'action de toxiques, en particulier sur le processus singulier à la gamétogenèse que représente la méiose (70). Il est maintenant temps d'avoir de véritables outils d'évaluation de la reprotoxicité qui permettront également de mieux connaître la physiologie de la spermatogenèse et d'avancer dans la production *in vitro* de gamètes mâles aptes à être utilisés en reproduction assistée.

Références

1. Dadoune JP, Dumoulin A (2001) Structure et fonctions du testicule. In: Thibault C, Levasseur MC (eds). La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA Editions, Paris, p 256-89
2. Setchell BP, Mieusset R (1996) Testis thermoregulation. In: Hamamah S, Mieusset R (eds) Male gametes production and quality. Les éditions INSERM, Paris, p 65-73
3. Einer-Jensen N, Hunter RHF (2005) Counter-current transfer in reproductive biology? Reproduction 129: 9-18
4. Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S (2006) Effect of heat stress on the fertility of male mice *in vivo* and *in vitro*. Reprod Fert Dev 18: 647-53
5. Jung A, Schuppe HC (2007) Influence of genital heat stress on semen quality in humans. Andrologia 39: 203-15
6. Acar H, Kilinc M, Guven S *et al.* (2009) Comparison of semen profile and frequency of chromosome aneuploidies in sperm nuclei of patients with varicocele before and after varicocelectomy. Andrologia 41: 157-62

7. Mohammed A, Chingwundoh F (2009) Testicular varicocele: an overview. *Urol Int* 82: 373-9
8. Amann RP (2008) The cycle of seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 29: 469-87
9. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006) Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 12: 275-82
10. De Rooij, Mizrak SC (2008) Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development* 135: 2207-13
11. Dadoune JP (2007) New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol* 45: 141-7
12. Heller CG, Clermont Y (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 20: 545-71
13. Ehmcke J, Schlatt S (2006) A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* 132: 673-80
14. Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112: 35-51
15. Griswold MD (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9: 411-6
16. Cheng Y, Dolores D, Mruk C (2009) An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44: 245-63
17. Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL (1999) Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod* 60: 1429-36
18. Bohring C, Krause W (2005) The role of antisperm antibodies during fertilization and for immunological infertility. *Chem Immunol Allergy* 88: 15-26
19. Naz RK (2009) Status of reproductive vaccines. *Am J Reprod Immunol* 61: 11-8
20. Dejuq N, Chousterman S, Jegou B (1997) The testicular antiviral defense system: localization, expression and regulation of 2'5'oligoadenylate synthetase, double-stranded RNA-activated protein kinase and Mx proteins in the rat seminiferous tubule. *J Cell Biol* 139: 865-73
21. Lui WY, Lee WM (2008) Mechanisms of reorganization of cell-cell junctions in the testis. *Frontiers in Bioscience* 13: 6775-86
22. Sylvester SR, Griswold MD (1994) The testicular iron shuttle: A nurse function of Sertoli cells. *J Androl* 15: 381-5
23. Skinner MK, Schlitz SM, Anthony CT (1989) Regulation of Sertoli cell differentiated function: testicular transferin and androgen-binding protein expression. *Endocrinology* 124: 3015-24
24. McLaren A (1988) Sex determination in mammals. *Trend Genet* 4: 153-7
25. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE (2009) Ontogeny of the Androgen Receptor Expression in the Fetal and Postnatal Testis: Its Relevance on Sertoli Cell Maturation and the Onset of Adult Spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 72: 787-95
26. Magre S, Vigier B (2001) Développement et différenciation sexuelle de l'appareil génital. In: Thibault C, Levasseur MC (eds). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA Editions, Paris, p 235-55
27. Prince FP (2001) The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol* 168: 213-6
28. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C (2009) Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev* 30: 119-32
29. Norton JN, Skinner MK (1989) Regulation of Sertoli cell function and differentiation through the actions of a testicular paracrine factor P-Mod-S. *Endocrinology* 124: 2711-9
30. Romano F, Tripiciano A, Muciaccia B *et al.* (2005) The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception* 72: 294-7
31. Matsumoto AM, Bremner WJ (1989) Endocrine control of human spermatogenesis. *J Spermiol Biochem* 33: 789-90
32. Weinbauer GF, Behre HM, Fingscheidt U *et al.* (1991) Human follicle stimulating hormone exerts a stimulatory effect on spermatogenesis, testicular size and serum inhibin levels in the gonadotropin-releasing hormone antagonists-treated non-human primates (macaca fascicularis). *Endocrinology* 129: 1831-9
33. Tapanainen JS, Aittomäki K, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT (1997) Men homozygous for an activating mutation of the follicle-stimulating hormone FSH receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 15: 205-6
34. Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I *et al.* (2000) Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology* 141: 1735-45
- 34bis. Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I *et al.* (2001) Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology* 142: 2789-95
35. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P *et al.* (2008) Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 323-30
36. Skinner MK (1993) Sertoli cell peritubular myoid cell interactions. In: Russell LD, Griswold MD (eds). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL, p 477-84
37. Cacciola G, Chioccarelli T, Mackie K *et al.* (2008) Expression of type-1 cannabinoid receptor during postnatal testicular development: possible involvement in adult Leydig cell differentiation. *Biol Reprod* 79: 758-65
38. Maccarrone M (2009) Endocannabinoids and reproductive endocrinology. *Curr Opin Investig drugs* 10: 305-10
39. Wang H, Dey SK, Maccarrone M (2006) Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev* 27: 427-48
40. Mark M, Ghyselinck NB (2009) Effets de la vitamine A sur la spermatogenèse. *Med Reprod Gynecol Endocr* 11: 215-26
41. Perrard MH, Chassaing E, Montillet G, *et al.* (2009) Cytostatic Factor proteins are present in male meiotic cells and b-Nerve Growth Factor increases Mos levels in rat spermatocytes. *PLoS One* 4: e7237
42. Carreau C, Silandre D, Bois C *et al.* (2007) Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 5-10
43. Skakkebaek NE (2004) Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. *Int J Androl* 27: 189-201
44. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM *et al.* (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-30
45. Rochira V, Granata ARM, Madeo B *et al.* (2005) Estrogens in males: what we have learned in last 10 years? *Asian J Androl* 7: 3-20
46. Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994) Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134: 2307-16
47. Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE (2005) Estrogen receptors (ER) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 20: 3481-7
48. Merlet J, Racine C, Moreau E *et al.* (2007) Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3615-20
49. Shaha C (2007) Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 173-86

50. De Vantéry-Arrighi C, Lucas H, Chardonnes D, de Agostini A (2009) Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 34-46
51. Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander HJ, Paasch U (2009) Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 24: 2071-8
52. Olesen IA, Sonne SB, Hoei-Hansen CE *et al.* (2007) Environment, testicular dysgenesis and carcinoma *in situ* testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 462-78
53. Jégou B, Jouannet P, Spira A (2009) La fertilité est-elle en danger ? La Découverte (Ed), Paris, p 5-221
54. Roulet V, Denis H, Staub C *et al.* (2006) Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum Reprod* 21: 1564-75
55. Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH *et al.* (1998) Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 59: 379-87
56. Barlovatz-Meimon G, Adolphe M (2003) Culture de cellules animales, INSERM Editions Scientifiques (Ed), Paris
57. Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard-Sapori MH *et al.* (1997) Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57: 68-76
58. Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M *et al.* (2009) Horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 15: 521-9
59. Pineau C, Dupais A, Jégou B (1999) The coculture of Sertoli cells and germ cells: applications in toxicology. *Toxicol in vitro* 13: 513-20
60. Lambrot R, Livera G, Coffigny H *et al.* (2006) A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 88: 1831-5
61. Staub C, Hue D, Nicolle JC *et al.* (2000) The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260: 85-95
62. Perrard MH, Hue D, Staub C *et al.* (2003) Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Dev* 65: 86-95
63. Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K (2009) Testicular Stem Cells for Fertility Preservation: Preclinical Studies on Male Germ Cell Transplantation and Testicular Grafting. *Pediatr Blood Cancer* 53: 274-80
64. Tesarik J, Mendoza C, Testart J (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 333: 525
65. Al-Hasani S, Ludwig M, Palermo I *et al.* (1999) Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatids from azoospermic patients: results and review. *Hum Reprod* 14 (Suppl 1): 97-107
66. Daley G (2007) Gametes from Embryonic Stem Cells: A Cup Half Empty or Half Full? *Science* 316: 409-10
67. Veyrunes F, Chevret P, Catalan J *et al.* (2010) A novel sex determination system in a close relative of the house mouse. *Proceeding of The Royal Society B* 277: 1049-56
68. Hartung T (2009) Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 460: 208-12
69. Lejeune M, Touraine JL (2009) L'expérimentation animale en Europe: quelles alternatives ? Quelle gouvernance ? Les Rapports de l'Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST) Présidé par M C. Birraux. Assemblée Nationale Française (ed) (<http://www.assemblee-nationale.fr>), p 9-249
70. Perrard MH, Grenet C, Prisant N *et al.* (2010) Analyse de la spermatogenèse ex vivo. Application à l'analyse de la toxicité testiculaire. *Médecine/Sciences* 26: 305-310

J.-P. Wolf, V. Barraud-Lange,
A. Ziyat, J.-C. Pont,
C. Serres, J. Auer
et B. Lefèvre

L'interaction gamétique au cours de la fécondation

L'ovocyte

L'ovocyte qui va être fécondé a grandi en taille au sein de son follicule et s'est entouré de la zone pellucide, structure amorphe acellulaire composée de glycoprotéines au nombre de quatre dans l'espèce humaine (1). Cette zone pellucide va avoir plusieurs fonctions : la reconnaissance et la sélection du spermatozoïde fécondant, ainsi que le déclenchement de sa réaction acrosomique lui permettant de libérer les enzymes qu'il transporte dans l'acrosome. Ceux-ci vont lui permettre de rompre les liaisons entre la ZP1 et les polymères de ZP2-ZP3 afin de se frayer un passage et de se propulser au travers de la zone pellucide grâce à ses battements flagellaires jusque dans l'espace périvitellin (2).

Du point de vue nucléaire, l'ovocyte vient alors d'accomplir les derniers stades de sa maturation. Lui qui était resté bloqué au stade dictyé de la prophase de la première division de la méiose depuis la vie fœtale recommence sa maturation au moment du pic ovulatoire de LH, soit 36 heures avant l'ovulation chez la femme. Il passe alors successivement en métaphase 1 qui se caractérise par la rupture de la vésicule germinale, puis en métaphase 2 avec l'expulsion du premier globule polaire à $2n$ chromatines. C'est ainsi qu'il est expulsé du follicule de de Graaf lors de l'ovulation (fig. 1).

L'ovocyte, entouré de son cumulus composé de cellules de la granulosa, tombe alors dans le cul-de-sac de Douglas où il est repris par une trompe, le plus souvent l'homolatérale, mais ce n'est pas une obligation. La rencontre du spermatozoïde et de l'ovocyte a lieu dans l'ampoule de cette trompe. Il y a alors environ 200 spermatozoïdes autour du cumulus.

Les spermatozoïdes

Parmi les spermatozoïdes qui entourent l'ovocyte dans l'ampoule tubaire, la plupart sont capités, c'est-à-dire que leur membrane est devenue plus



Fig. 1 – Ovocyte en métaphase 2. Il s'agit de l'image d'un ovocyte tel qu'il est ovulé. Le diamètre total est d'environ 140 μm , celui de l'ooplasm lui-même est de 120 μm . Dans l'espace périvitellin, la présence du premier globule polaire signe la fin de la première partie de la méiose. En l'absence de prophase au cours de la seconde division de la méiose, l'ovocyte est donc en métaphase 2. La seconde partie de la méiose et l'expulsion du second globule polaire seront déclenchées lors de l'activation ovocytaire qui suit la pénétration du spermatozoïde.

fluide du fait de la perte des molécules décapitantes de sa matrice extracellulaire et de quantités importantes de cholestérol de sa membrane (3). Cette capacitation se traduit aussi par l'acquisition d'un mouvement dit hyperactivé. Les spermatozoïdes pénètrent ainsi rapidement le cumulus et se dirigent vers la zone pellucide. La fixation du spermatozoïde à la ZP, au niveau de la glycoprotéine ZP3 plus précisément, déclenche la réaction acrosomique comme nous l'avons vu. Le spermatozoïde qui pénètre naturellement dans l'espace périvitellin est donc obligatoirement capité et acrosome-réagi.

La fécondation est une fusion des membranes

Le mécanisme de la fécondation elle-même doit être détaillé. Si l'on recouvre des spermatozoïdes d'un anticorps fluorescent, et qu'on insémine des ovocytes avec, la fluorescence va se retrouver sur la

membrane du zygote ainsi formé. La membrane du spermatozoïde se mêle donc à celle de l'ovocyte, ce qui permet l'incorporation du noyau spermatique à l'intérieur de l'ooplasme, le cytoplasme ovocytaire. Seule, semble-t-il, la membrane acrosomique interne mise à nue par la réaction acrosomique fait l'objet d'une phagocytose par l'ovocyte comme l'indiquent les vues en microscopie électronique de gamètes au cours de la fécondation et rapportées par Yanagimachi (4) (fig. 2). La membrane ovocytaire est recouverte de microvillosités. Il est vraisemblable que ces microvillosités aient été préalablement connectées avec les prolongements cytoplasmiques des cellules de la corona dont nous savons que les gaps junctions les reliant à l'ovocyte ont été relâchés par le pic ovulatoire de LH (fig. 3). Chez la souris, il existe une zone dite amicrovillaire située en regard de la plaque métaphasique de l'ovocyte en métaphase 2 (5). D'un point de vue fonctionnel, cette disposition se comprend car si le spermatozoïde pénétrait le cortex ovocytaire en regard de la plaque métaphasique, il risquerait de se trouver expulsé à l'intérieur du second globule polaire, puisque celui-ci va nécessairement se former dans l'espace compris entre la plaque métaphasique et la zone corticale de l'ovocyte située à son aplomb. Chez l'humain, il n'y a pas de zone amicrovillaire semble-t-il mais lorsqu'on insémine des ovocytes dépellucidés, les quelques 25 spermatozoïdes environ qui fusionnent avec se retrouvent localisés à un même pôle comme s'il y avait déjà une polarisation de l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte (fig. 4).

Le spermatozoïde acrosome-réagi aborde l'ovocyte par sa région équatoriale située juste en arrière de la membrane interne de l'acrosome (le spermatozoïde étant acrosome-réagi, la pointe de la tête n'a plus ni membrane cytoplasmique ni membrane externe de l'acrosome). L'adhésion entre les gamètes s'établit entre la zone microvillaire de l'ovocyte et la région équatoriale du spermatozoïde. Sur le spermatozoïde, c'est donc au niveau de cette région équatoriale que doivent se trouver les molécules chargées de cette adhésion. La fusion des membranes commence au niveau de la partie postérieure du segment équatorial et se propage à la région post-acrosomique (fig. 2). Cette fusion devient circonférentielle à la tête du spermatozoïde et le noyau spermatique est ainsi incorporé au cytoplasme ovocytaire. Le flagelle le sera également.

Pas de bloc à la polyspermie au niveau de la membrane de l'ovocyte humain

L'existence d'un bloc à la polyspermie au niveau de la membrane ovocytaire dans l'espèce humaine est discutée car il semble exister chez la souris. Des expériences menées sur des ovocytes humains lors

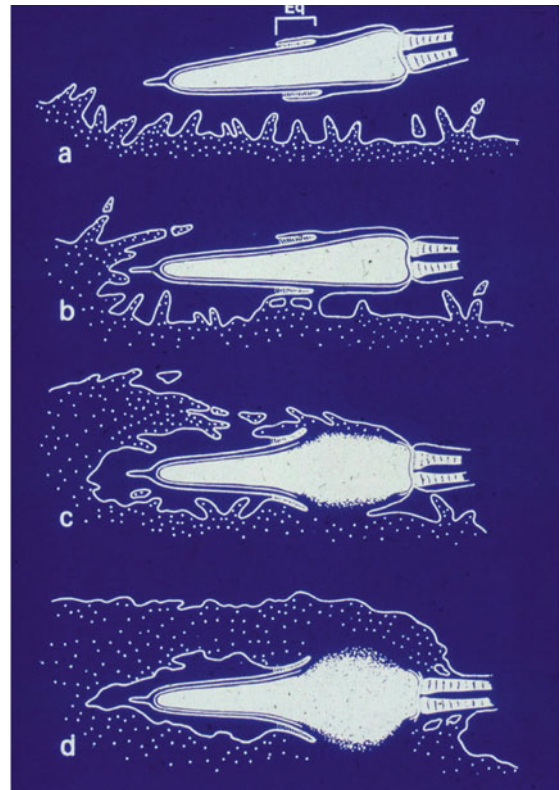


Fig. 2 – Schéma de la fusion membranaire des gamètes selon Yanagimachi (4). a : le spermatozoïde se trouve dans l'espace périvitellin en regard de la région membranaire de l'ovocyte dotée de microvillosités ; b : le spermatozoïde adhère à la membrane ovocytaire par son segment équatorial ; c : la fusion des membranes gamétiques commence au niveau de la partie postérieure du segment équatorial ; d : la fusion des membranes s'étend de proche en proche jusqu'à l'incorporation de la tête spermatique dans l'ooplasme. Le flagelle sera également intégré dans le cytoplasme ovocytaire.

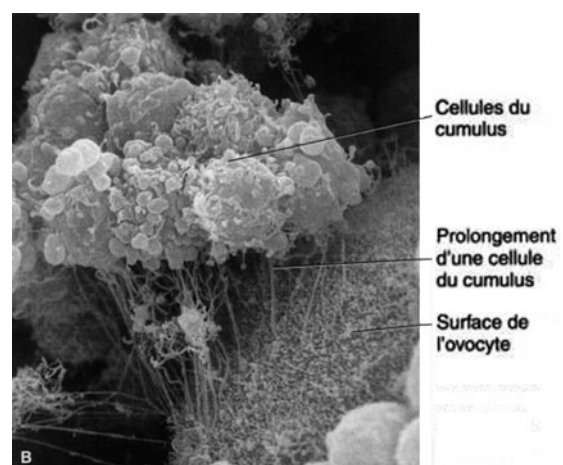


Fig. 3 – Prolongements cytoplasmiques des cellules de la corona vers l'ovocyte et gap jonction en microscopie électronique à balayage, d'après Philipps (50). La zone pellucide a été lysée et ne persistent que les prolongements cytoplasmiques qui relient les cellules de la corona radiata aux microvillosités de l'ovocyte. La connexion avec l'ovocyte se fait par l'intermédiaire de gap junctions communicantes.

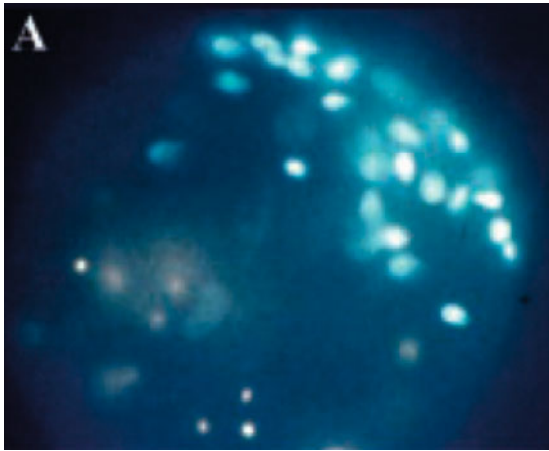


Fig. 4 – Ovocyte humain dépellucidé et inséminé. Cet ovocyte humain a été dépellucidé et inséminé. Au bout d'une heure d'insémination, il a été fixé et incubé avec du Dapi, un colorant vital intercalant de l'ADN. Seul l'ADN fluoresce en blanc. On voit que les 25 spermatozoïdes environ qui ont pénétré l'ovocyte l'ont tous fait au même pôle de la cellule (43).

de microinjection de type SUZI (*Subtotal insemination*) ont montré qu'il existe une corrélation linéaire très significative entre le nombre de spermatozoïdes fécondants que l'on a injecté dans l'espace périvitellin d'un ovocyte et le nombre de ceux qui pénètrent à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire (6). Sur l'ovocyte humain fraîchement ovulé, il n'existe donc pas de bloc membranaire physiologique à la polyspermie.

Cône de fusion

La fusion des membranes gamétiques et l'incorporation de la tête spermatique à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire s'accompagnent d'une intense réorganisation de la membrane ovocytaire. Comme nous l'avons montré, il y a constitution d'un cône de fécondation autour du point de pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte caractérisé par la disparition des glycoprotéines membranaires dans cette surface (fig. 5) (7). Nous avons, entre autres, montré que l'intégrine $\alpha\beta 1$ ainsi que la tétraspanine CD9, abondamment présentes sur la membrane et uniformément distribuées sur l'ovocyte en métaphase 2, disparaissent de la surface du cône de fécondation. Sur le reste de la surface membranaire, l'intégrine $\alpha\beta 1$ et la tétraspanine CD9 clustérisent en patches sur l'ovocyte de souris et l'ovocyte humain. Cette réorganisation est sous le contrôle de la tétraspanine CD9 et s'élargit à la surface de l'ovocyte progressivement. Une zone semblable apparaît autour de la zone de constitution du second globule polaire (7). L'anticorps anti-CD9 inhibe cette réorganisation membranaire et la fusion gamétique dans l'espèce humaine. Chez la souris l'anticorps anti-CD9 inhibe également la fécondation (8, 9).

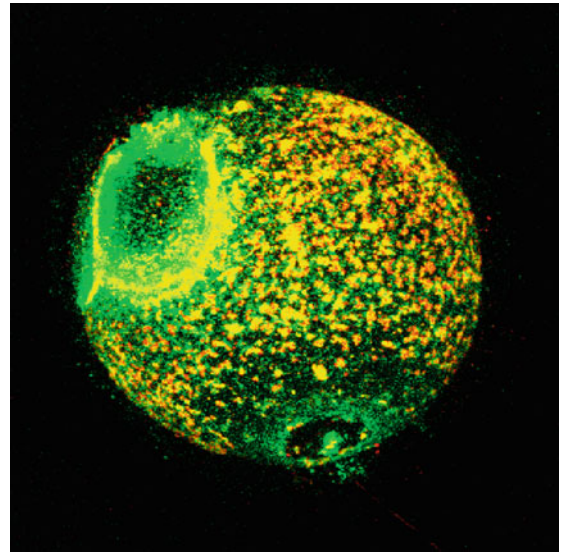


Fig. 5 – Cône de fusion. Cet ovocyte a été inséminé pendant 45 minutes puis fixé. Un marquage de la sous-unité intégrine $\alpha 6$ (vert) et de la tétraspanine CD9 (rouge) a été effectué. La zone pellucide a été retirée lors de l'analyse informatique pour mieux visualiser l'ovocyte. Un spermatozoïde est en train de pénétrer l'ooplasm. Le point de fusion est marqué par un point vert intense. Il est entouré d'une zone circulaire complètement dépourvue de protéines. En dehors, une zone plus large également circulaire est en voie de déplétion des protéines d'intérêt. En dehors de cette zone, il y a présence de patches regroupant les deux protéines détectées (7).

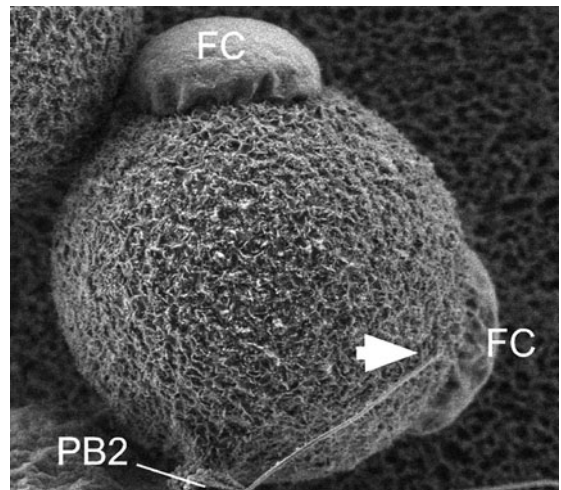


Fig. 6 – Cône de fusion (FC) sur un ovocyte de souris dépellucidé en microscopie à balayage d'après Dalo (51). PB2 : globule polaire. Il s'agit de la vue en microscopie à balayage d'un ovocyte dépellucidé et fécondé. On peut voir une boursouflure au niveau de la zone de pénétration du spermatozoïde correspondant au cône de fusion.

Le cône de fécondation a été étudié en microscopie électronique. Il correspond à une zone dans laquelle il y a disparition des microvillosités membranaires, ce qui aboutit à une augmentation locale de la superficie de la membrane et à la constitution d'une blèbe sur l'ovocyte dépellucidé (fig. 6). Il n'est pas certain qu'une telle structure existe sur

l'ovocyte intact dans sa zone pellucide, mais la disparition des microvillosités membranaires semble être un fait.

Histoire des molécules de la famille ADAM

L'histoire commence en 1987 lorsque l'équipe de Paul Primakoff, à l'Université Davis de Californie, découvre ce qu'il appelle alors la PH-30 (10). Pour ce faire, il a immunisé des souris avec des spermatozoïdes de cobaye et en a obtenu une série d'anticorps monoclonaux qu'il teste, les uns après les autres. Deux d'entre eux reconnaissent la partie postérieure de la tête des spermatozoïdes en immunofluorescence, la PH-1 et la PH-30. Toutefois, ajoutée aux milieux d'incubation de gamètes de souris, seule la PH-30 inhibe effectivement l'interaction gamétique et la fécondation. C'était en fait la première molécule caractérisée d'une famille appelée ADAM car les molécules qu'elle contient comportent toutes un site désintégrine et un domaine métalloprotéase d'où l'acronyme ADAM pour *A Disintegrin And Metalloprotease*. La PH-30 s'appelle maintenant la fertiline β ou ADAM2. C'est un hétérodimère qui a été décrit comme le ligand par lequel le sperme interagit avec la membrane ovocytaire. Les sous-unités fertiline α et β sont les prototypes des gènes de la famille ADAM (11, 12).

Les fonctions des molécules de la famille ADAM ont été analysées en utilisant des anticorps, des peptides ou des protéines mimant le site de fixation de leur domaine désintégrine lors de test de fécondation *in vitro*. Des peptides recombinants de ADAM1, ADAM2, ADAM3 se lient à la membrane plasmique d'ovocytes de souris et inhibent la liaison spermatozoïde ovocyte et donc la fécondation (13). De plus, les études de souris présentant un KO de ces gènes ont donné des arguments supplémentaires sur leur implication dans l'interaction gamétique (14). Ainsi des spermatozoïdes dépourvus de fertiline α (ADAM1) ou de fertiline β (ADAM2) peuvent fusionner avec les ovocytes à un taux de 50 % du contrôle. Cela suggère que d'autres molécules sont impliquées dans la fusion et que le rôle des fertilines est limité à l'adhésion des membranes (15). Le mâle présentant la délétion de la fertiline β est infertile car ses spermatozoïdes ne peuvent pas remonter la filière génitale de la femelle et restent bloqués à l'origine de l'oviducte. Ce phénomène est probablement dû à leur incapacité à se lier à l'épithélium tubaire comme ils le font normalement au niveau de ce qu'on appelle le « sperme réservoir ». C'est un compartiment fonctionnel au niveau duquel les spermatozoïdes se lient à l'épithélium tubaire, ce qui retarde leur capacitation et assure donc une présence plus longue de spermatozoïdes féconds dans le tractus génital femelle (fig. 7).

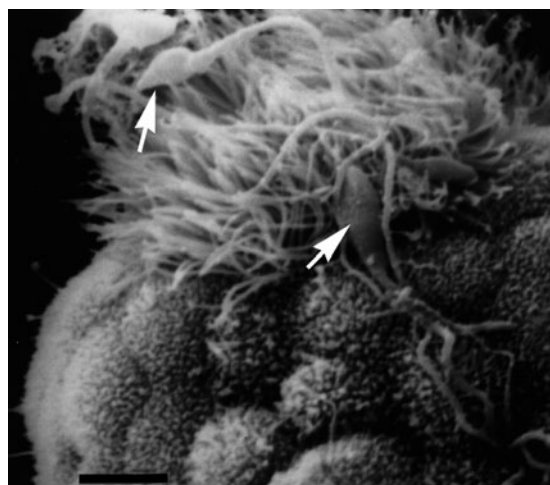


Fig. 7 – Sperme réservoir. Compartiment fonctionnel correspondant à la fixation transitoire des spermatozoïdes au niveau des cellules ciliées de l'épithélium tubaire. Il semble que la fonction de ce « sperm reservoir » est de retarder la capacitation des spermatozoïdes qui y sont fixés de manière à allonger le délai au cours duquel des spermatozoïdes sont présents dans les voies génitales féminines. Lorsque le spermatozoïde se détache, il reprend son chemin vers l'ovocyte et réalise sa capacitation.

Le domaine désintégrine des ADAM est composé de 60 à 90 acides aminés présentant une grande homologie avec ceux de la désintégrine de venin de serpent. La désintégrine de venin de serpent contient un tripeptide RGD et inhibe de manière compétitive l'adhésion des plaquettes médiée par des intégrines au fibrinogène et autres ligands (16).

Une analyse structurale a montré que le RGD est présent au sommet d'une boucle en épingle à cheveux semblable à celle présente dans la fibronectine. Cependant, la plupart des ADAM ne contiennent pas la séquence RGD dans leur domaine désintégrine. En effet, le domaine tripeptide putatif de liaison de la fertiline présente une spécificité d'espèce. En position du tripeptide RGD, la séquence consensus dans la fertiline β est le QDE chez la souris et le FEE dans l'espèce humaine (pour revue (17)).

De plus, des expériences suggèrent que l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ joue un rôle dans la liaison de la fertiline β et de la cyritestine (18). En effet, chez la souris, des anticorps spécifiques inhibent la liaison de la fertiline β à l'ovocyte et la liaison directe de peptides reproduisant le site de fixation de la fertiline β à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$. Ces données suggèrent que l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ est le récepteur de la fertiline β (18).

D'un autre côté, des molécules appartenant à la sous-famille des intégrines se liant au tripeptide RGD parmi lesquelles $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ sont également exprimées par l'ovocyte et sont impliquées dans la fécondation comme le montrent les expériences d'insémination en présence du tripeptide RGD (19). Bronson *et al.* ont montré ainsi qu'une reconnaissance RGD – dépendante est impliquée

dans l'adhésion spermatozoïde membrane ovocytaire puisque le peptide RGD diminue le taux de fécondation dans le modèle de pénétration des ovocytes dépellucidés de hamster. Pareillement, nous avons montré une inhibition partielle et dose-dépendante de la fusion gamétique dans l'espèce humaine par le peptide RGD (19, 20).

De plus, l'oligopeptide GdRGDSP qui bloque spécifiquement la fibronectine et la vitronectine inhibe significativement la liaison des spermatozoïdes humains à la membrane d'ovocytes dépellucidés de hamster. Cela est important car la fibronectine et la vitronectine sont deux glycoprotéines qui contiennent une séquence RGD fonctionnelle et qui sont toutes deux présentes sur le spermatozoïde humain capacité et acrosome-réagi (21). Ces résultats indiquent qu'une intégrine RGD sensible est impliquée dans le processus de fusion.

Famille des intégrines

Parmi les molécules associées aux tétraspanines se trouve la famille des intégrines dont un groupe est partenaire de la tétraspanine CD151. Les intégrines constituent une famille de molécules d'adhésion transmembranaires. Ce sont des dimères $\alpha\beta$ impliqués dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Les sous-unités β peuvent s'associer avec des sous-unités α différentes, mais c'est la sous-unité $\beta 1$ qui est la plus fréquemment concernée formant ainsi la plus grande famille d'intégrines. Ce sont également des molécules de signalisation à deux directions : de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (inside-out) et à l'inverse de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in). De fait, l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines implique des signaux régulateurs, incluant des phosphorylations de protéines qui contrôlent de multiples fonctions telles la mort cellulaire, la croissance cellulaire et la différenciation. Réciproquement, la force des intégrines au cours de la liaison est régulée par divers stimuli. Cela peut être médié par une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand, mais plus probablement par une augmentation de son avidité qui peut elle-même être régulée par des modifications du clustering des intégrines à la surface des cellules et par des liaisons latérales avec d'autres protéines transmembranaires (22).

Parmi les intégrines exprimées à la surface de l'ovocyte, se trouve l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ qui est associée à la tétraspanine CD9 (23). L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ a longtemps été considérée comme le récepteur du spermatozoïde sur la membrane ovocytaire du fait de sa capacité à interagir avec les protéines de la famille ADAM et notamment avec la fertiline β (24). En effet, le groupe de Primakoff a montré, en

1995, que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ était impliquée dans la liaison du spermatozoïde à la membrane ovocytaire et que l'inhibition de cette liaison avec l'anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) inhibait et cette liaison et, par voie de conséquence, la fusion gamétique elle-même (24). Toutefois, ce modèle a été remis en question par la même équipe qui a montré que les souris portant une invalidation conditionnelle du gène de la sous-unité intégrine $\beta 1$ (porteuse d'ovocytes dépourvus de la sous-unité intégrine $\beta 1$) étaient fertiles et qu'il en est de même des souris délétées de toutes les intégrines portées par l'ovocyte. De même, leurs ovocytes pouvaient être fécondés *in vitro* (25).

Des peptides dérivés de la séquence du site de liaison du domaine désintégrine de la fertiline β se lient à l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et inhibent la fécondation (8, 24, 41). Cependant, les tests de liaison et de fusion sur les gamètes de souris en présence de l'anticorps monoclonal anti- $\alpha 6$, GoH3 ont donné des résultats disparates en fonction de la technique utilisée pour enlever la zone pellucide. Ainsi, la liaison des spermatozoïdes aux ovocytes n'est pas inhibée quand la zone pellucide est enlevée par un traitement à la trypsine et le taux de fécondation des ovocytes en cumulus intacts n'est pas diminué. Au contraire, nous avons montré que l'anticorps GoH3 inhibe la fusion gamétique dans l'espèce humaine quand la zone pellucide a été enlevée mécaniquement par microdissection à l'aide de ciseaux, technique que nous croyons plus respectueuse de l'intégrité membranaire et de ses fonctions (7).

Modèle de l'ovocyte dépellucidé (ZP – free)

Le modèle des ovocytes dépellucidés a été le plus fréquemment utilisé pour les tests d'inhibition de la fécondation (26). La zone pellucide peut être enlevée de l'ovocyte par des moyens chimiques (tyrode acide), enzymatiques (trypsine) ou mécaniques à l'aide de ciseaux de microdissection ou d'un piézo-électrique. Les auteurs ont justifié l'utilisation de ce modèle par le fait qu'on étudie alors les interactions membrane/membrane en s'affranchissant de la zone pellucide. Cependant, le retrait de la zone pellucide n'est pas anodin, car il modifie considérablement les conditions locales de l'interaction gamétique ce qui est de nature à expliquer certainement les résultats contradictoires obtenus entre les différents protocoles expérimentaux. Nous avons montré en effet que l'ablation de la zone pellucide entraîne la formation de patches comprenant plusieurs intégrines dont l'intégrine $\alpha 6$ et des tétraspanines (7). De même, plusieurs fonctions ovocytaires liées à la fusion sont modifiées. L'anticorps anti-CD9 ne peut inhiber la fécondation d'ovocytes humains

que s'il est introduit dans le milieu avant que la dépellucidation ne soit effectuée. Ce n'est plus le cas après (7). Cela suggère que la fonction de la tétraspanine CD9 est court-circuitée par le retrait de la zone pellucide ce qui semble également être le cas de la fonction de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$. Ainsi, He *et al.* ont rapporté une absence d'effet inhibiteur de l'anticorps anti- $\alpha 6$ GoH3 sur des ovocytes dépellucidés alors que nous avons systématiquement retrouvé une inhibition sur l'ovocyte intact (27). C'est la raison pour laquelle l'utilisation du modèle de l'ovocyte dépellucidé, aussi utile qu'il soit dans l'étude des phénomènes moléculaires, ne doit pas être considérée comme un modèle reflétant la physiologie de l'interaction gamétique.

Intégrines spermatiques

Les intégrines existent aussi à la surface du spermatozoïde. Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$ qui sont les récepteurs de la fibronectine et de la vitronectine apparaissent respectivement à la surface du spermatozoïde pendant la capacitation et la réaction acrosomique (28). La vitronectine est elle aussi sécrétée par le spermatozoïde lors de la réaction acrosomique. Sa présence dans les milieux de culture augmente les taux de fécondation chez la souris (29). Le fait que l'adhésion sperme-ovocyte soit induite par la vitronectine sécrétée pendant la réaction acrosomique a amené Fusi *et al.* à formuler l'hypothèse selon laquelle la vitronectine constitue un « velcro » liant les gamètes ensemble (30). Cette hypothèse induit l'implication d'intégrines sensibles au tripeptide RGD sur les deux gamètes. Il avait, de plus, été montré que l'expression de la sous-unité intégrine $\beta 3$ sur le spermatozoïde est semblable à celle de la sous-unité αv dans l'espèce humaine. Le pourcentage de spermatozoïdes exprimant la sous-unité intégrine $\beta 3$ étant corrélé à la proportion des spermatozoïdes qui font leur réaction acrosomique après induction par un ionophore suggère leur implication dans cette fonction. Une cinétique du réaménagement des intégrines $\alpha 6$ pendant la fusion gamétique montre que les sous-unités $\alpha 6$ sont clustérisées au point de pénétration du spermatozoïde (19). La fréquence de la formation de ces clusters est directement liée au nombre de spermatozoïdes qui ont fusionné. Cela a conduit Takahashi *et al.* à suggérer que la fusion sperme-ovocyte a lieu sur un site où l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ est déjà clustérisée et que cette interaction a lieu par une association directe du sperme avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ (26).

Des questions demeurent toutefois sur les intégrines et leur rôle dans la fusion gamétique. L'action possible des anticorps anti-intégrine $\alpha 6$ sur les spermatozoïdes de souris au cours d'expé-

riences d'insémination n'a jamais été considérée, alors qu'elle aurait dû être suspectée. En effet, la présence de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ sur les spermatozoïdes humains avait déjà été rapportée par cytométrie de flux, son expression étant réduite dans les cas de térato- ou d'oligoasthénotératospermie (31). Par ailleurs, la sous-unité intégrine $\beta 1$ avait été détectée par immuno-histochimie sur la membrane basale des tubes séminifères, des spermatocytes, des spermatides et des spermatozoïdes dans l'espèce humaine. De plus, une corrélation positive entre l'expression de la sous-unité intégrine $\beta 1$ sur les spermatozoïdes humains et leur fécondance avait été démontrée suggérant que l'intégrine spermatique pourrait être déterminante dans le processus de reconnaissance et d'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte (31). Reddy *et al.* avaient d'ailleurs proposé que l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ puisse être un marqueur clinique d'évaluation de la qualité fécondante du sperme (31).

La présence d'intégrine spermatique chez l'humain suggère qu'il puisse y en avoir également sur les spermatozoïdes de souris, la plupart des fonctions étant conservées entre ces deux espèces. Nous avons effectivement montré la présence de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ sur le spermatozoïde de souris. Son expression est modulée selon que le spermatozoïde est capacité ou non et acrosome-réagi ou non (27). Non seulement l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ est présente sur les spermatozoïdes de souris, mais elle est fonctionnelle et impliquée dans le processus de fusion gamétique. En effet, des incubations séparées des ovocytes et des spermatozoïdes ont montré une inhibition bien plus importante quand seuls les spermatozoïdes sont pré-incubés avec l'anticorps comparé à l'inhibition obtenue quand les ovocytes sont seuls pré-incubés avec le même anticorps. Cette découverte est d'importance car l'article de De Almeida rapportait l'effet de l'anticorps GoH3 dans le milieu d'insémination sans tenir compte en aucune façon d'un éventuel effet de l'anticorps sur les spermatozoïdes (24). Ses résultats doivent donc être réévalués. Mais plus important, toutes les expériences d'invalidation de gènes des sous-unités intégrines qui ont été menées sur l'ovocyte de souris l'ont été sans tenir compte non plus de la présence d'intégrines sur les spermatozoïdes. Or, dans chacune de ces expériences, ce sont des spermatozoïdes sauvages et donc porteurs d'intégrines qui ont été utilisés pour les inséminations. En d'autres termes, les sous-unités intégrines qui avaient été délétées de l'ovocyte se trouvaient sur la membrane du spermatozoïde et se trouvaient donc présentes au moment de la fusion des membranes. Voilà qui est également de nature à amener quelques réévaluations de ces expériences.

Tétraspanines

La seule protéine de la membrane ovocytaire connue pour être essentielle est la tétraspanine CD9. Effectivement, les souris *cd9*^{-/-} présentent une réduction extrêmement sévère de leur fertilité et les ovocytes *CD9*^{-/-} ne sont pas fécondables *in vitro* (23, 32). Cette dernière affirmation demande toutefois à être remise en question puisque nous sommes arrivés à obtenir des taux de fécondation de 20 % sur des ovocytes intacts et, curieusement, que de 5 % sur des ovocytes dépellucidés en fécondation *in vitro* alors que les taux de fécondation des ovocytes sauvages étaient de 80 % environ et de 100 % pour les ovocytes dépellucidés. De plus, les anticorps anti-CD9 inhibent le processus de fusion *in vitro* entre les gamètes comme nous l'avons vu (8, 33).

La tétraspanine CD9 appartient à la super famille des tétraspanines qui comprend 33 molécules dans l'espèce humaine. Les tétraspanines ont de courtes extrémités N et C terminales intracellulaires, quatre domaines transmembranaires séparant deux domaines extracellulaires de tailles inégales (33, 34). Une forme isolée de la boucle la plus grande est capable d'inhiber partiellement la fusion gamétique lorsque les ovocytes, mais pas les spermatozoïdes, sont pré-incubés en sa présence indiquant que la tétraspanine CD9 peut fonctionner en cis sur la surface de l'ovocyte possiblement en interagissant avec une autre protéine de surface (35).

Les tétraspanines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion, la migration cellulaire, la transduction du signal et la différenciation (in 34, 36, 37). Une caractéristique majeure des tétraspanines est leur capacité à interagir entre elles et avec un large nombre d'autres protéines de surface réalisant ainsi un réseau très étendu d'interactions moléculaires : le tétraspanine web. Dans le schéma habituel, chaque tétraspanine interagit directement avec un nombre limité de molécules partenaires (une molécule partenaire est une protéine qui interagit avec cette tétraspanine dans des conditions qui ne sont jamais observées entre tétraspanines) qu'elle connecte à d'autres tétraspanines au travers d'interactions entre tétraspanines. Ce second niveau d'interaction est supposé se produire dans des microdomaines membranaires différents des domaines générés par les *GPI-anchored proteins-enriched microdomains* ou les rafts (34, 36, 37). Deux partenaires majeurs ont été identifiés pour CD9. Il s'agit de CD9P-1 et EWI-2 (38, 39). Ils appartiennent à une sous-famille de protéines contenant un domaine immunoglobuline et sont exprimés par l'ovocyte.

CD9 n'est pas l'unique tétraspanine exprimée par l'ovocyte. Les ovocytes humains expriment

également les tétraspanines CD81 et CD151 (7), alors que l'expression de CD81 chez la souris a déjà été rapportée (13). L'anticorps anti-CD81 inhibe partiellement la liaison et la fusion des spermatozoïdes avec les ovocytes (13). De plus, la surexpression de CD81 par l'injection de son ARNm dans les ovocytes restaure partiellement la fécondance des ovocytes *CD9*^{-/-} (40). On ne sait toutefois pas si CD81 joue un rôle physiologique dans la fusion gamétique.

Protéine Izumo

L'importance de la protéine Izumo a été démontrée 20 ans après que l'on ait découvert que son anticorps inhibe la fécondation. C'est seulement en 2005 que la délétion de son gène a montré qu'elle est indispensable à la capacité fécondante des spermatozoïdes (41). En effet, les souris mâles et femelles ayant subi une délétion du gène de la protéine Izumo ne présentent comme seule anomalie que l'incapacité des spermatozoïdes à fusionner avec la membrane ovocytaire. Toutes les caractéristiques du sperme des souriceaux apparaissent normales par ailleurs. La rencontre avec les gamètes se fait également normalement mais, une fois entrés dans l'espace vitellin, les spermatozoïdes s'avèrent incapables de fusionner avec la membrane ovocytaire. La molécule Izumo fait partie de la famille des immunoglobulines. Les spermatozoïdes humains contiennent également la protéine Izumo qui semble donc conservée dans les espèces (41). L'addition d'un anticorps anti-Izumo aux spermatozoïdes humains les rend aussi incapables de fusionner avec des ovocytes dépellucidés de hamster (41).

La protéine Tssk6 est une molécule faisant partie de la famille des sérines kinase et qui est exprimée après la méiose au cours de la spermatogénèse. Lors de la réaction acrosomique, la protéine Izumo est relocalisée de la partie antérieure de la tête spermatique à la région post acrosomale. Cette relocalisation apparaît nécessaire à la fusion. Chez les souris qui ont subi le KO du gène de la protéine Tssk6, cette relocalisation n'a pas lieu, ce qui entraîne une stérilité des mâles *Tssk*^{-/-} (42).

Intérêt clinique

L'un des intérêts cliniques de cette recherche est la découverte d'un peptide augmentant les capacités fusiogènes des gamètes murins et humains. Le peptide cyclique cFEE (phénylalanine ; acide glutamique ; acide glutamique) avait été synthétisé dans le projet de tester sa capacité inhibitrice (43). En effet, il reproduit la séquence du site de liaison

du domaine disintégrine de la fertiline β présente sur la membrane du spermatozoïde. Mis en supplément dans le milieu d'insémination il était supposé entrer en compétition avec la molécule native portée par le spermatozoïde lui-même et donc diminuer ses capacités de fixation. C'est d'ailleurs ce qui se passe avec les peptides similaires linéaires (44). La cyclisation que nous avons introduite afin de mimer au mieux la conformation naturelle de la protéine a modifié ses propriétés. Elle se fixe effectivement à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ mais par ses propriétés augmente le recrutement et ou l'activation des autres intégrines présentes sur la membrane et, dans les faits, augmente le nombre de spermatozoïdes susceptibles de fusionner avec les ovocytes dépellucidés chez l'humain (43).

La présence de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ sur la membrane spermatique suggère que le peptide puisse également avoir un effet spermatique. Il est d'autant plus probable que le peptide analogue, mais spécifique de l'espèce murine, le QDE cyclique, augmente le taux de fécondation des ovocytes inséminés intacts dans leur cumulus. Or, dans cette seconde expérience, les spermatozoïdes doivent nécessairement traverser la zone pellucide (45). Nous avons d'ailleurs étudié les effets du peptide FEEc sur les spermatozoïdes humains et il semble qu'il puisse permettre d'augmenter significativement la mobilité spermatique et plus précisément la vitesse linéaire (données non publiées).

La trogocytose

De quoi s'agit-il ? Il s'agit de transfert de fragments de membrane d'une cellule à une autre. C'est ainsi qu'on a décrit les échanges d'information entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T (46). Le rapport avec les gamètes tient dans le fait que le même échange de fragments membranaires a été découvert entre l'ovocyte et le spermatozoïde situé dans l'espace périvitellin, c'est-à-dire le spermatozoïde fécondant. C'est en pistant la tétraspanine CD9 lors de l'interaction de deux gamètes de souris que nous nous sommes aperçus que le spermatozoïde présent dans l'espace périvitellin était couvert lui-même de CD9 qu'il n'exprime habituellement pas (47). Or, la tétraspanine étant une molécule traversant quatre fois la membrane, comme son nom l'indique, il y a peu de chance que sa présence sur la membrane spermatique puisse être due à une simple diffusion. Pour confirmer le passage de fragments membranaires, des ovocytes dépellucidés ont été marqués avec un colorant lipidique le PKH 26 rouge pour les uns et le PKH67 vert pour les autres. Inséminés en même temps, on retrouva des spermatozoïdes rouges sur la membrane de l'ovocyte vert et réciproquement

(47). Le phénomène a été confirmé par le groupe japonais de Miyado qui a montré que l'acquisition par le spermatozoïde de tétraspanine CD9 était de nature à augmenter les capacités fusiogènes de ce dernier (48).

Le transfert de membrane a donc bien lieu, mais deux mécanismes non exclusifs l'un de l'autre ont été décrits. La trogocytose donc qui nécessite le contact des membranes cellulaires et peut avoir lieu immédiatement et la capture de vésicules dites exosomes « like » présentes dans l'espace périvitellin et sécrétées par l'ovocyte lui-même. Bien sûr, dans ce second cas, il convient de laisser le temps à l'ovocyte de sécréter suffisamment de vésicules. En revanche, les spermatozoïdes peuvent capter ces vésicules, même en l'absence des ovocytes. Il reste à démontrer que ce phénomène a lieu de façon physiologique lors de la fécondation et qu'il est indispensable à son mécanisme.

Au total : un modèle possible

L'ovocyte isolé dans sa zone pellucide ne peut recevoir de matériel membranaire d'aucune autre cellule. Il possède donc toutes les molécules nécessaires à son pouvoir fusiogène. L'ovocyte est-il capable de fusionner avec n'importe quelle cellule se trouvant dans l'espace périvitellin, le spermatozoïde étant le seul à pouvoir y pénétrer physiologiquement ? Certainement pas, car les ovocytes dépellucidés ne fusionnent pas spontanément avec d'autres cellules, de même que des ovocytes dépellucidés mis au contact l'un de l'autre ne fusionnent pas ensemble non plus. L'ovocyte doit donc subir une activation pour que s'exprime sa capacité fécondante. Cette hypothèse est directement renforcée par le fait que l'ovocyte subit effectivement des remaniements membranaires importants lors de la fécondation. Un cône de fusion apparaît autour du point d'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte et nous avons décrit une large réorganisation de ses protéines membranaires au cours et dans les suites immédiates de la fusion membranaire. Tout cela concourt à l'idée selon laquelle l'ovocyte possède tout son matériel de liaison et de fusion au spermatozoïde mais qu'il doit être activé.

Qu'en est-il du spermatozoïde ? Il porte incontestablement des molécules impliquées dans la reconnaissance et la fusion membranaire. Nous savons depuis peu qu'il est capable de se lier et de fusionner avec des cellules de lignées somatiques, pourvu que celles-ci possèdent et expriment à leurs surfaces des molécules nécessaires et complémentaires à celles du spermatozoïde (49). Parmi celles-ci, il y a la fertiline β , et la vitronectine dont nous savons qu'elles sont exprimées par le spermatozoïde au cours de sa

capacitation. On sait que le spermatozoïde n'est pas spontanément fusiogène puisqu'il doit au préalable réaliser sa capacitation et sa réaction acrosomique pour devenir fécondant. Mais un certain nombre d'entre eux le font de manière tout à fait spontanée. Pourtant personne n'a, jusqu'à présent, rapporté d'images de spermatozoïdes fusionnant entre eux ou avec des cellules de la granulosa par exemple. Or, les spermatozoïdes sont à la fois porteurs de la fertiline β et de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, c'est-à-dire en d'autres termes du ligand et du récepteur. Pour qu'ils ne se lient pas les uns aux autres, il faut donc que leurs capacités fusiogènes soient activées au dernier moment lorsque les spermatozoïdes se trouvent dans l'espace périvitellin au contact de la membrane ovocytaire. C'est à ce moment là qu'a lieu l'échange de fragments membranaires entre la membrane ovocytaire et le spermatozoïde fécondant. Cet échange de fragments membranaires apporte au spermatozoïde les molécules qu'il n'a pas ou peu, entre autres les tétraspanines CD9 et CD81 ou leurs partenaires. Or, nous avons montré que ces molécules permettent la réorganisation de la membrane de l'ovocyte survenant au cours de la fécondation, de même que nous avons montré que les anticorps anti-CD9 inhibent la réorganisation membranaire et la fécondation dans l'espèce humaine (7). Nous pouvons donc imaginer que l'acquisition de ces molécules permette à la membrane spermatique la même réorganisation que celle de l'ovocyte. Ainsi, des patches de molécules d'adhésion sur la membrane ovocytaire pourraient faire face à des patches de ligands sur la membrane du spermatozoïde et vice-versa. Effectivement, nous avons déjà montré que l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ que la fertiline β sont symétriquement distribuées sur les membranes des deux gamètes. Ainsi pourrait s'expliquer la nécessité de ce transfert de fragments membranaires qui a lieu entre l'ovocyte qui va être fécondé et le spermatozoïde fécondant.

Références

- Lefevre L, Conner SJ, Salpekar A *et al.* (2004) Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19: 1580-6
- Litscher, E, Williams Z, Wassarman P (2009) Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Mol Reprod Dev* 76: 933-41
- De Jonge C (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11: 205-14
- Yanagimachi R (1978) Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol* 12: 83-105
- Longo FJ, Chen DY (1985) Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 107: 382-94
- Wolf JP, Ducot B, Kunstmann JM *et al.* (1992) Influence of sperm parameters on outcome of subzonal insemination in the case of previous IVF failure. *Hum Reprod* 7: 1407-13
- Ziyyat, A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F *et al.* (2006) CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin $\alpha 6 \beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci* 119: 416-24
- Chen MS, Tung KS, Coonrod SA *et al.* (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 11830-5
- Rubinstein E, Ziyyat A, Wolf JP *et al.* (2006) The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17: 254-63
- Primakoff, P, Hyatt H, Tredick-Kline J (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 104: 141-9
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck C *et al.* (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356: 248-52
- Evans, J, P, Kopf GS, Schultz RM (1997) Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Dev Biol* 187: 79-93
- Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM (2001) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell* 12: 809-20
- Nishimura H, Cho C, Branciforte D *et al.* (2001) Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233: 204-13
- Cho C, Ge E, Branciforte D *et al.* (2000) Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin beta (-/-) sperm: evidence for C-terminal modification, alpha/beta dimerization, and lack of essential role of fertilin alpha in sperm-egg fusion. *Dev Biol* 222: 289-95
- Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA *et al.* (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 195: 168-71
- Evans JP (2002) The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update* 8: 297-311
- Tomczuk M, Takahashi Y, Huang J *et al.* (2003) Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. *Exp Cell Res* 290: 68-81
- Ji YZ, Wolf JP, Jouannet P, Bomsel M (1998) Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. *Hum Reprod* 13: 682-9
- Bronson R, Fusi F (1990) Sperm-oolemmal interaction: role of the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion peptide. *Fertil Steril*. 54: 527-9
- Fusi FM, Lorenzetti I, Mangili F *et al.* (1994) Vitronectin is an intrinsic protein of human spermatozoa released during the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 39: 337-43
- Sanchez-Mateos P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F (1996) Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol* 7: 99-109
- Miyado K, Yamada G., Yamada S, *et al.* (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287: 321-4
- Almeida EA, Huovila APJ, Sutherland AE *et al.* (1995) Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 81: 1095-104
- He ZY, Brakebusch C, Fassler R *et al.* (2003) None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol* 254: 226-37
- Takahashi Y, Yamakawa N, Matsumoto K *et al.* (2000) Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. *Mol Reprod Dev* 56: 412-23

27. Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Saffar L *et al.* (2007) Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev Biol* 7: 10
28. Fusi FM, Tamburini C, Mangili F *et al.* (1996) The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Mol Hum Reprod* 2: 169-75
29. Boissonnas CC, Montjean D, Lesaffre C *et al.* (2010) Role of sperm alphavbeta3 integrin in mouse fertilization. *Dev Dyn* 239: 773-83
30. Fusi FM, Bernocchi N, Ferrari A, Bronson R. (1996) Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? *Mol Hum Reprod* 2: 859-66
31. Reddy VR, Rajeev SK, Gupta V (2003) Alpha 6 beta 1 Integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertil Steril* 79 Suppl 3: 1590-6
32. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C *et al.* (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287: 319-21
33. Charrin S, Le Naour F, Silvie O *et al.* (2009) Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* 420: 133-54
34. Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 397-422
35. Zhu GZ, Miller BJ, Boucheix C, *et al.* (2002) Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* 129: 1995-2002
36. Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58: 1189-205
37. Levy S, Shoham T (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5: 136-48
38. Charrin S, Le Naour F, Labas V *et al.* (2003) EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* 373: 409-21
39. Charrin S, Le Naour F, Oualid M *et al.* (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* 276: 14329-37
40. Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A (2002) Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81 ; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 247: 327-34
41. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434: 234-8
42. Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA *et al.* (2009) Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 122: 2741-9
43. Ziyyat A, Naud-Barriant N, Barraud-Lange V *et al.* (2005) Cyclic FEE peptide increases human gamete fusion and potentiates its RGD-induced inhibition. *Hum Reprod* 20: 3452-8
44. Bronson R, Fusi FM, Calzi F *et al.* (1999) Evidence that a functional fertilin-like ADAM plays a role in human sperm-oolemmal interactions. *Mol Hum Reprod* 5: 433-40
45. Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, DUCOT B *et al.* (2008) Cyclic QDE peptide increases fertilization rates and provides healthy pups in mouse. *Fertil Steril* 9: 2110-5
46. Joly E, Hudrisier D (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* 4: 815
47. Barraud-Lange V, Naud Barriant N, Bomsel M, *et al.* (2007) Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J* 21: 3446-9
48. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K *et al.* (2008) The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12921-6
49. Mattioli M, Gloria A, Mauro A *et al.* (2009) Fusion as the result of sperm-somatic cell interaction. *Reproduction* 138: 679
50. Phillips DM, Shalgi R (1980) Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J Ultrastruct Res* 72: 1-12
51. Dalo DT, Maccaffery JM, Evans JP (2008) Ultrastructural analysis of egg membrane abnormalities in post-ovulatory aged eggs. *Int J Dev Biol* 52: 535-44

J. Mandelbaum

Histoire de la fécondation *in vitro*

Introduction

Le 25 juillet 1978 naissait, en Angleterre, Louise Brown, le premier enfant conçu par fécondation *in vitro* (FIV) et transfert embryonnaire dans l'utérus maternel. Ce jour-là, le biologiste Robert Edwards et le gynécologue Patrick Steptoe démontraient à la communauté scientifique sceptique, voire hostile, que les travaux réalisés depuis plus de 20 ans chez les petits mammifères étaient transposables à l'espèce humaine. Un espoir extraordinaire se levait pour toutes les femmes atteintes de stérilité tubaire définitive. Cet enfant était environ le soixante-quinzième être vivant (après quelques lapins et autres rongeurs) conçu par cette technique. Trente ans plus tard, on mesure le chemin parcouru. La FIV s'est enrichie de techniques collatérales : congélation d'embryons, d'ovocytes, de tissus gonadiques, ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*), DPI (diagnostic préimplantatoire), don d'ovocytes, etc. L'ICSI a révolutionné le traitement des stérilités masculines. La FIV et ses « dérivés » sont proposés dans bien d'autres indications (stérilités idiopathiques, endométriose, risque viral, risque de transmission d'une maladie génétique grave, etc.) et représentent le dernier recours lorsque les ovocytes font défaut ou lorsque l'on veut préserver une fertilité que des traitements agressifs vont altérer. Ce sont entre 1 et 3 % des enfants, en Europe, qui sont issus de cette technique et, pour l'année 2002, on pouvait estimer leur nombre dans le monde à 230 000 environ (1). La FIV a longtemps été déclinée au futur, puis au présent... elle a maintenant également un passé respectable sur lequel on peut se pencher.

La préhistoire de la FIV

Seuls les auteurs qui publient ont une petite chance de passer à la postérité, leurs écrits représentant le

matériau de l'histoire qui s'écrit bien des années après. On peut ainsi penser que c'est vers 1880 que les premiers essais de culture *in vitro* de l'embryon de mammifères, conçu *in vivo*, eurent lieu à Vienne, grâce à Schenk (2). Il fut suivi par nombre de chercheurs variant les milieux, les conditions de culture, les espèces qui définirent, peu à peu, les prérequis indispensables au développement embryonnaire *in vitro* (3). Schenk s'essaya également, sans succès, à la fécondation *in vitro* dans le milieu extérieur.

Dès 1930, Grégory Pincus, médecin et biologiste américain, plus connu pour être le co-inventeur de la pilule contraceptive, tente les premières fécondations *in vitro* chez le lapin. Il se désole de voir qu'aucun des transferts dans la trompe, d'ovocytes exposés aux spermatozoïdes n'aboutit à une naissance. En 1934, avec Enzmann (4), dans le laboratoire de physiologie générale de l'université de Harvard, il découvre qu'il faut 12 heures de culture pour que des ovocytes, prélevés dans des follicules immatures, reprennent leur méiose et parviennent en métaphase 2. Aidé d'Enzmann et de Saunders, il recommence alors l'expérience de transfert intratubaire d'une mixture ovocyte-spermatozoïdes et pense avoir réussi la fécondation *in vitro*... en fait, sans doute, des fécondations *in vivo* dans la trompe, les premiers GIFT (*gamete intra fallopian transfer*) de l'histoire. Leurs travaux sont contemporains de la sortie du *Meilleur des Mondes* d'Aldous Huxley (1932), qui fait de la FIV la méthode labellisée de conception des êtres humains dans une société technologique et totalitaire, pour le moins inquiétante. Est-ce cette fiction et sa proximité avec Pincus qui ont amené, 10 ans plus tard, en 1944, John Rock, un célèbre gynéco-obstétricien de Harvard, à tenter avec Miriam Menkin (5) l'aventure de la FIV... humaine cette fois ? Toujours est-il qu'ils récupèrent plusieurs centaines d'ovocytes en peropératoire et en inséminent 138 *in vitro*. Le recueil se fait le plus souvent en début de phase folliculaire et sans, bien sûr, aucun monitoring de l'ovulation. Ils pensent avoir obtenu les trois premiers

embryons humains conçus *in vitro*. Difficile cependant de leur attribuer ce crédit en l'absence de preuves évidentes de fécondation. D'autant que, se basant sur les travaux de Pincus, ils considèrent que l'ovocyte humain immature n'a besoin que de 12 heures pour atteindre la métaphase 2 et devenir fécondable. Sans doute ces « embryons » étaient-ils tout simplement des ovocytes fragmentés. Finalement, ils abandonnent ce projet, sans avoir été jusqu'au transfert *in utero*. C'est le lapin qui sera la première espèce de mammifère chez laquelle la fécondation *in vitro* sera réussie, scientifiquement documentée et attribuée, selon l'origine géographique des commentateurs, soit au Français Charles Thibault, soit à l'Américain MC Chang. En 1954, Charles Thibault et ses collègues, Louis Dauzier et Suzanne Winterberger-Torres, publiaient dans les Comptes rendus de l'Académie des Sciences l'image d'un ovocyte de lapine présentant, dans son cytoplasme, deux pronuclei mâle et femelle ainsi que des restes du flagelle. Cette image prouvait indubitablement que cet ovocyte, recueilli dans la trompe après son ovulation et mis en présence de spermatozoïdes capables *in utero*, avait bien été fécondé *in vitro* (6). Mais c'est la publication de Chang, en 1959, qui confirmait que cette FIV était bien capable d'aboutir à un développement embryonnaire normal et à la naissance de jeunes (7). Chang, après avoir quitté la Chine et sa province natale du Shanxi pour poursuivre son cursus de biologiste, avait travaillé à Edinburgh puis Cambridge où il avait rencontré le virus de la biologie de la reproduction. Mais c'est à la Worcester Foundation of Experimental Biology, dans le Massachusetts qu'il sera finalement recruté par Grégory Pincus pour travailler sur la fécondation *in vitro*. Ses travaux, menés chez le lapin, sont parallèles à ceux de l'équipe de Thibault à l'INRA de Jouy-en-Josas. Chang décide de transférer des zygotes à 2 PN, issus de la FIV des gamètes d'un couple de lapins noirs, dans une femelle receveuse blanche et obtient des lapereaux dont la noirceur prouve l'origine : la FIV avait dès lors un avenir ! Chang restera, sans doute, plus associé, dans la mémoire scientifique, aux cinq années (1951-1956) passées à travailler avec Pincus sur l'administration par voie orale de la pilule contraceptive combinée, que pour ses autres activités de recherche. J'ai cependant le souvenir d'un monsieur de 80 ans, recevant en 1987, à Norfolk (Fifth World Congress on IVF), un prix pour l'ensemble de ses travaux : plus de 350 publications, essentiellement dans le domaine de la reproduction, dont les premières données sur la capacitation des spermatozoïdes, là encore, parallèlement à l'Australien Colin Austin (8). C'est dire si la recherche sur la reproduction chez les mammifères était mondiale et amenait pas à pas vers la FIV humaine.

En attendant, les découvertes sur la capacitation et la réaction acrosomique du spermatozoïde ouvrent la voie à la FIV avec des spermatozoïdes capables, non plus dans le tractus génital femelle, mais *in vitro* (in 9, 10). Et c'est la première FIV chez le hamster, grâce à Yanagimachi et... Chang, encore (11). Ruizo Yanagimachi deviendra le « maître » d'Hawaï, l'un des plus inventifs parmi les biologistes de la reproduction, celui qui obtint, (entre autres prouesses) des souriceaux normaux après lyophilisation des spermatozoïdes (12). Resté fidèle au modèle rongeur (hamster puis souris), il est encore, en 2009, co-auteur de publications dans PNAS dont l'une sur la régulation épigénétique durant le clonage. Lors d'un congrès international, je le rencontrais, très impressionné par ce talentueux chercheur, qui travaillait comme Michelle Plachot et moi, à l'époque, sur le hamster doré. Notre timidité céda rapidement devant ce petit monsieur simple et chaleureux, avide de discuter de données expérimentales et dont l'accent de citoyen américain d'origine japonaise transformait les « *in vitro* et *in vivo* », qui émailaient souvent nos propos, en réjouissants « *in bibo* et *in bitro* », que nous n'oublierions pas de sitôt.

Après le hamster, c'est chez la souris que fut réussie la FIV (1968), grâce à David Whittingham (13), autre grand nom de la biologie de la reproduction, à qui l'on doit les premières congélations de morulae (1972) (14) et d'ovocytes de souris (1977) (15), avec naissance de jeunes. Il ouvrait ainsi la voie à la cryoconservation des gamètes et embryons de mammifères. Mais ne brûlons pas les étapes. Ce n'est qu'en 1969 que les premières preuves cytologiques de la fécondation *in vitro* de l'ovocyte humain furent apportées (16) et il fallut encore attendre une décade pour que soient décrites les premières FIV chez les animaux de ferme : vache, porc, chèvre, mouton et deux décades pour qu'il en soit de même chez le cheval. De même, ce n'est que 4 ans après la naissance de Louise Brown que naît le premier veau éprouvette (1982) et il faut patienter jusqu'en 1990 pour célébrer le premier poulain FIV (17). La préhistoire de la FIV s'achève, entrons dans l'histoire.

L'histoire de la FIV humaine commence en Angleterre

La maturation ovocytaire

C'est comme généticien et spécialiste de la souris que Robert G, dit Bob, Edwards commença sa carrière de biologiste et obtint sa thèse de sciences. Quelques années plus tard, il s'intéresse à la maturation de l'ovocyte dans le but de réaliser

fécondation et développement embryonnaire *in vitro* jusqu'au stade blastocyste, fasciné déjà par les potentialités extraordinaires qu'il entrevoit dans les cellules dissociées du bouton embryonnaire, futures cellules souches (18). Il confirme que la maturation ovocytaire *in vitro* nécessite 12 heures chez les rongeurs pour passer du stade de vésicule germinative à celui de métaphase 2, mais découvre avec étonnement qu'il n'en va pas de même chez les ruminants et les primates où 37 heures semblent indispensables pour réaliser le même parcours et obtenir des ovocytes fécondables. Qu'en est-il chez la femme ? Ce même long délai semble nécessaire (19). Pour poursuivre ce travail, Bob Edwards a besoin d'ovocytes, beaucoup d'ovocytes et les quelques fragments d'ovaire que les docteurs Molly Rose, puis Victor Lewis, lui fournissent à Londres, ne suffisent pas. Lorsqu'il évoquait son envie de poursuivre jusqu'à la fécondation et au développement embryonnaire, les regards de nombre de gynécologues contactés se détournent et les espoirs de collaboration s'évanouissent. Grâce à l'entremise de Victor McKusick, chef du service de génétique médicale à l'hôpital Johns Hopkins de Baltimore, il obtient une bourse pour séjourner 6 mois dans le service de gynécobstétrique où officient les Jones, Howard et Georgeanna, lui connu comme chirurgien de la stérilité, elle comme gynécologue et endocrinologue de la reproduction, tous les deux passionnés et vite enthousiastes devant le projet de FIV humaine. Ils fournissent à Bob des tranches d'ovaires polykystiques, obtenues lors de classiques résections cunéiformes (aujourd'hui abandonnées au profit du « drilling » ovarien) et qui contiennent nombre de follicules antraux. Le travail avance vite dans le petit laboratoire attaché au bloc opératoire et la chronologie de la maturation de l'ovocyte humain est confirmée (20). Il reste deux semaines avant le retour à Londres, délai que Bob met à profit pour tenter de féconder les ovocytes maturés *in vitro*. Difficile d'imaginer qu'en si peu de temps autant d'approches furent tentées : insémination des ovocytes avec des spermatozoïdes lavés, en présence de fragments de trompe, d'endomètre ou de mucus cervical, avec l'obsession de réussir la capacitation des spermatozoïdes humains pour laquelle le simple lavage était bien suffisant. Ils essayent d'incuber les gamètes dans la trompe de lapine mais les ovocytes sont rapidement entourés d'un manteau mucineux de sécrétions tubaires tandis qu'ils disparaissent dans celles du singe macaque (*cynomolgus*). Tout cela n'aboutit qu'à l'obtention de quelques ovocytes présentant bien deux pronuclei... mais pas de flagelle intracytoplasmique prouvant qu'il ne s'agit pas d'un artéfact (21). Ce travail collaboratif anglo-américain fut donc publié en tant que « tentative d'obtenir la FIV humaine »

et non en tant que premier succès (22). Pourtant, des années plus tard, en revoyant les clichés pris à cette époque, Bob Edwards se dit que la technique de fixation utilisée pouvait avoir empêché la visualisation du flagelle et la reconnaissance de cette première avancée.

Les premiers ovocytes humains fécondés

Revenu en Angleterre, il cherche toujours un gynécologue, prêt à se lancer avec lui dans l'aventure de la FIV humaine. Il a lu dans *The Lancet* un article d'un gynéco-obstétricien de l'hôpital général d'Oldham, Patrick Steptoe sur une nouvelle technique, la coelioscopie, que ce dernier a apprise au contact de Raoul Palmer à Paris et adoptée. Parmi toutes les possibilités qu'elle offre, le fait de pouvoir ponctionner les follicules ovariens afin d'aspirer les ovocytes qu'ils contiennent, retient l'attention de Bob Edwards. En effet, lorsque MC Chang a voulu réitérer son expérience de fécondation *in vitro*, à partir d'ovocytes maturés *in vitro* cette fois, il n'obtint qu'un développement embryonnaire limité aux premiers stades de clivage et aucune naissance après transfert intratubaire. Bob Edwards est donc à la recherche d'ovocytes humains préovulatoires, mûris à l'abri de leur follicule dans l'ovaire et recueillis juste avant l'ovulation afin de réussir non seulement la fécondation *in vitro*, mais également le développement d'embryons viables. Il téléphone à Steptoe et lui expose son projet. La réponse n'est pas négative, ils conviennent de se recontacter. Mais Oldham est loin, à 200 miles de Cambridge et Bob hésite. Quelques semaines plus tard, ils sont tous deux orateurs lors d'une réunion de la Société Royale de Médecine à Londres. « Vous ne m'avez pas rappelé » remarque Steptoe ! C'est le début d'une longue collaboration qui amènera Bob Edwards à faire régulièrement 4 heures de route pour chercher à Oldham, les ovocytes qui serviront aux essais de fécondation *in vitro* dans le laboratoire de Physiologie de l'Université de Cambridge. À cette époque, Bob a toujours la même obsession : la capacitation des spermatozoïdes humains et Patrick demande à ses patientes, avant hystérectomie, d'avoir des rapports avec leur conjoint afin de placer des ovocytes maturés *in vitro* dans leur trompe pour une fécondation *in vitro*... intratubaire !

Mais rapidement, Bob maîtrise la maturation ovocytaire, utilise les milieux simples de fécondation décrits chez le hamster, contrôle les conditions de culture et, avec l'aide de Barry Bavister, un de ses doctorants qui invente de nouveaux milieux, plus adaptés, il réalise enfin la fécondation de l'ovocyte humain *in vitro*, de façon reproductible et efficace (23, 24).

La collecte percoelioscopique de l'ovocyte préovulatoire se développe et permet l'obtention d'ovocytes

ayant réalisé leur maturation *in vivo*. Edwards et Steptoe perfectionnent le système : des patientes, à cycle normal, reçoivent deux à trois injections de gonadotrophines hMG (*human menopausal gonadotrophins*), en phase folliculaire. Lorsque les cinq à six follicules, qui n'ont pas entamé leur processus d'atréxie, sécrètent une quantité suffisante d'œstrogènes, une injection d'hCG (*human chorionic gonadotrophin*) déclenche leur maturation. Une coelioscopie permet le recueil d'ovocytes qui sont, 28 heures après l'hCG en métaphase 1 et à 35-36 heures, en métaphase 2, juste avant l'ovulation (25). On vérifie ainsi, pas à pas, que maturation *in vivo* et *in vitro* ont bien la même chronologie, chez l'humain. Dès lors, plus de pénurie d'ovocytes, plus de nécessité de réaliser une maturation *in vitro* préalable et l'étude du développement embryonnaire peut commencer, développement que l'on va aider en utilisant un milieu plus riche, surtout en pyruvate, le Ham's F10 auquel on va adjoindre du sérum ou de l'albumine. Et les résultats seront spectaculaires, permettant de décrire tous les stades de clivage de l'embryon humain, jusqu'au stade de blastocyste expansé puis éclos (26, 27).

Les premiers transferts

Il est temps de passer au transfert dans l'utérus et à la phase clinique de l'aventure. Les risques d'anomalies des enfants nés de ces embryons conçus *in vitro* leur paraissent peu importants, au vu de la vaste expérimentation animale existante du développement comparée de l'embryon *in vivo* et *in vitro* chez diverses espèces. Tout étant à inventer, il faut définir les conditions du transfert, atraumatique, aseptique, avec le minimum de milieu possible... À partir de là, l'équipe commence à réaliser le transfert *in utero* des embryons clivés chez des femmes infertiles, atteintes de stérilité tubaire définitive, pour qu'il n'y ait aucun doute quant à la réalité d'un éventuel succès... mais échouent à obtenir la moindre grossesse. Parmi tous les problèmes qui auraient pu expliquer ces échecs, Bob Edwards désigne un responsable, le corps jaune. En effet, le traitement par hMG-hCG entraînant une phase lutéale courte de 8-9 jours, il semblait indispensable de réaliser une supplémentation en progestérone pour compenser ce déficit lutéal et favoriser l'implantation et le début de la grossesse. À l'époque, il n'existait pas encore de progestérone micronisée et pour éviter des injections intramusculaires quotidiennes douloureuses, un progestatif retard, le caproate d'hydroxyprogestérone ou dépôt Primolut®, fut choisi (250 mg tous les 5 jours). Edwards et Steptoe ne savent pas qu'il a un effet lutéolytique et délétère sur le développement de l'endomètre et se désespèrent. Heureu-

sement, les dosages plasmatiques de la β hCG sont devenus disponibles et se révèlent positifs, 8 jours après le transfert, chez plusieurs des patientes traitées. L'implantation avait donc bien eu lieu, mais la grossesse s'était rapidement interrompue, grossesse « biochimique » seulement, un concept et un vocable promu à un bel avenir.

Le moral de l'équipe remonte, on abandonne le Primolut® et l'on essaie de varier les types de soutien de la phase lutéale, les types de stimulation. Cependant les temps sont difficiles. Les critiques ne manquent pas en Angleterre à l'encontre de ces tentatives d'apprenti sorcier. Elles émanent souvent de confrères et poussent Edwards et Steptoe à très tôt s'engager dans une réflexion éthique et sociétale (28). Par ailleurs, les rivalités pointent, la perspective de la FIV humaine tente d'autres équipes, en Amérique, et surtout en Australie où, en 1973 déjà, de Kretzer a rapporté deux grossesses biochimiques, dont la réalité est peut-être contestable, mais qui prouvent que la course est engagée (29). En 1975, toujours après stimulation par gonadotrophines et transfert d'un blastocyste, survient une grossesse... tubaire cette fois (30), dont Steptoe pratique l'exérèse à 11 semaines. C'est une tragédie pour la patiente, une immense déception pour eux, mais ils tiennent la preuve, devant le jeune fœtus d'apparence normale que l'application clinique de la FIV est possible. Ils découvrent aussi, avec surprise qu'une grossesse, même après transfert *in utero* de l'embryon, peut être ectopique.

Louise Brown, enfin !

Déprimés mais tenaces, ils décident de se tourner vers le cycle spontané avec un monitoring de la LH urinaire toutes les 4 heures pour déterminer le moment du pic spontané de LH, et cette fois le succès sera au bout du chemin. Il était temps, Patrick Steptoe, bientôt à la retraite, doit bientôt quitter Oldham. Le 10 novembre 1977, il prélève un ovocyte à Lesley Brown et deux jours et demi plus tard, il lui transfère un embryon de 8 cellules. Cette fois, la grossesse est évolutive. Heureusement, c'était la deuxième patiente prise en charge en cycle spontané ! Au printemps 1978, a lieu à Paris, à l'hôpital Necker, la réunion annuelle de la Société Nationale pour l'Étude de la Stérilité et de la Fécondité (l'actuelle SFEF). Le thème du colloque est l'implantation de l'œuf. Bob Edwards a été invité à y présenter ses travaux. Il nous parlera de toutes les étapes, des difficultés, des grossesses précocement interrompues, de la grossesse extra-utérine. Nous sommes fascinés mais un peu déçus que tout cela n'aboutisse toujours pas. Le mardi 25 juillet 1978, peu avant minuit, Louise Brown, 2 700 grammes, naissait par césarienne à l'hôpital

général d'Oldham, consacrant 10 ans de travail et introduisant dans la reproduction humaine une quatrième dimension (31). Charles Thibault a difficilement pardonné à Bob Edwards d'avoir tu cette grossesse, proche du terme, lors de sa venue à Paris et ce dernier n'a jamais compris que l'on puisse imaginer qu'il annoncerait en France et à l'avance un événement de cette importance, qui demeura secret jusqu'au bout pour permettre à Lesley et John Brown de vivre tranquillement cette naissance, tandis que 3 000 journalistes avaient élu domicile à Oldham, traquant le « scoop ». Des 32 transferts en cycle spontané, réalisés à cette époque, résultèrent trois autres grossesses dont une FCS triploïde et un accouchement prématuré à 20 semaines d'un enfant qui ne survécut pas. La mère, au grand dam de Bob Edwards, avait décidé de faire un week-end de randonnée, peu après son amniocentèse. Enfin, l'accouchement d'un garçon cette fois, parfaitement normal, achevait la saga d'Oldham (32-33). Laissons la parole à Charles Thibault : « Les succès de la fécondation *in vitro* sont le résultat, on ne le soulignera jamais assez, de recherches cliniques poursuivies avec une admirable persévérance. Il faut avoir à l'esprit cette véritable traversée du désert qu'ont été pour Edwards les dix années écoulées avant que ne soit obtenue, en 1978, la première naissance d'un bébé humain résultant d'une fécondation *in vitro*. Une telle ténacité ne s'observe pas pour les études chez l'animal. Les chercheurs sont pressés de publier, les décideurs sont impatients. Ce fait est à mon sens regrettable, car de nombreuses questions difficiles mériteraient d'être étudiées chez l'animal. Ce n'est que de cette sorte de va-et-vient entre l'animal et l'homme et de cette confrontation réitérée que peuvent être attendus de nouveaux progrès. Mais il faut savoir que les fruits mûrissent lentement. »

La FIV en France

Un terrain propice

Pour que la FIV humaine réussisse, il fallait une collaboration entre des biologistes de la reproduction ayant l'habitude de la fécondation *in vitro* animale, des gynécologues revenus des succès très relatifs de la chirurgie tubaire et rompus à la coelioscopie, des endocrinologues et des biochimistes de la reproduction. La France était particulièrement bien placée dans cette configuration.

Charles Thibault, l'un des principaux fondateurs de l'école de biologie de la reproduction dans notre pays, avait été le premier à obtenir la fécondation *in vitro* d'un ovocyte de mammifère, il dirigeait

le laboratoire de physiologie animale de l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) et la Chaire de physiologie de la reproduction de l'Université Paris 6. Il entretenait des liens privilégiés avec les gynécologues et médecins de la reproduction comme Albert Netter et René Musset puis Jean Cohen, Jacques Salat-Baroux et tant d'autres. Passionné par sa discipline, avide d'échanger, de transmettre, de créer des opportunités, il fonda en 1981 le Club fécondation, une « auberge espagnole », comme il l'appelait lui-même, où se retrouvaient des chercheurs travaillant tant sur la reproduction humaine que sur celle des animaux de ferme, des rongeurs, des poissons et crustacés... où chacun amenait ses questions, ses problèmes, ses avancées dans une stimulante discussion qui nous faisait rejoindre Jouy-en-Josas avec enthousiasme malgré la distance. Charles Thibault savait la grandeur et la servitude de la recherche : s'il avait été le premier à féconder l'ovocyte de lapin *in vitro*, il faudra 25 ans pour que son équipe arrive à faire de même chez le bovin. Les premiers qui se lancèrent dans l'aventure de la FIV humaine du côté de la biologie étaient ses élèves.

Les traitements de l'infertilité du couple avaient été développés depuis les années 1940 en France par quelques écoles phares comme celle de l'hôpital Broca à Paris avec Raoul Palmer, celle de l'hôpital Necker où Albert Netter et son équipe d'endocrinologues de la reproduction et de gynécologues médicaux formaient tandem avec le chirurgien René Musset installé lui à l'Hôtel-Dieu, et bien d'autres encore... Tous les ingrédients étaient réunis pour que la FIV humaine ait une histoire française.

L'émergence de deux équipes

Dès 1973, Albert Netter dont je venais de devenir l'une des chefs de clinique me proposa comme objectif de recherche : la fécondation *in vitro* dans l'espèce humaine. Lasse d'annoncer des diagnostics de stérilité définitive à des couples désespérés, j'acceptais sans hésitation. Pour y parvenir, l'expérimentation animale s'imposait. C'est finalement en binôme que nous démarrâmes avec Michelle Plachot, jeune biologiste Inserm qui travaillait dans le laboratoire du service. Charles Thibault accepta de nous encadrer et nous proposa d'étudier la fécondation de l'ovocyte du hamster doré de Syrie (*Mesocricetus auratus*), après maturation *in vivo* ou *in vitro*. Nous avions décrit une particularité de l'ovocyte du hamster dont la maturation devait être nucléaire, mais aussi membranaire pour pouvoir être fécondé. De même que la maturation cytoplasmique, ces modifications de la zone pellucide ne s'obtenaient qu'*in vivo*, juste avant l'ovulation. Nous tentions d'en comprendre

les mécanismes dans le laboratoire de l'hôpital Necker que nous avions installé, grâce à l'aide bienveillante de Pierre Mauvais-Jarvis qui était devenu mon chef de service, de Jean de Grouchy, directeur INSERM de l'unité, dont dépendait Michelle, et de Pierre Royer. La naissance de Louise Brown nous rappela que là était notre objectif.

Peu de temps après, Charles Thibault nous fit part de la demande de Jean Cohen qui cherchait des biologistes pour mettre en place un programme de FIV humaine. Lui aussi s'intéressait à la FIV depuis quelques années, mais ses essais chez le singe, avec A. Psychoyos à Saint-Antoine, avaient échoué (34). Il s'était alors adressé à Émile Papiernik, chef du service de gynécologie-obstétrique de l'hôpital Antoine Béchère de Clamart. Émile, souhaitant développer un secteur de recherches multidisciplinaires, avait constitué une unité INSERM originale de « physiologie et psychologie de la reproduction humaine » où, entre autres, une équipe de biologistes avec Ondine Bomsel, Alain Gougeon et Jacques Testart, arrivé de l'INRA en 1977, travaillaient sur le follicule ovarien humain. Au printemps 1978, sous l'impulsion d'un chef de clinique dynamique, René Frydman, Jacques Testart avait accepté de quitter la culture du follicule pour s'engager dans la fécondation *in vitro* (35). Jean Cohen attendait une réponse de Clamart quand Charles Thibault lui parla des « biologistes de Necker ». Nous apprenions ainsi qu'une équipe française s'était déjà investie dans la FIV humaine et nous n'avons pas hésité une seconde pour accepter à notre tour ce pari. La première phase fut expérimentale et nous fixions les ovocytes que nous estimions fécondés pour apporter la preuve que nous étions dans la bonne voie. Je me souviens de cette image, caractéristique d'un zygote à deux pronuclei que Charles Thibault avait décrété être, sans conteste, un œuf humain fécondé et non une parthénogenèse, quelle émotion ! Peu après, Jacques Salat-Baroux nous faisait la même demande de collaboration et nous devenions le laboratoire central où arrivaient les ovocytes, recueillis par Jean Cohen à l'hôpital de Sèvres et par Jacques Salat-Baroux à l'hôpital Tenon.

Le cauchemar du cycle spontané

Bien que l'usage des gonadotrophines et du citrate de clomifène ait été très familier aux cliniciens des deux équipes, les déboires d'Edwards et Steptoe ne pouvaient être ignorés et tout le monde s'engagea dans la voie épineuse du cycle spontané : dosages urinaires toutes les 4 heures à la recherche du pic de LH. Les contraintes étaient grandes pour les patientes et rendaient notre vie imprévisible. Lorsqu'une femme entrait en surveillance, chaque fin d'après-midi était marquée par l'attente du

résultat des dosages qui décidait si le programme de la soirée pouvait se dérouler normalement. Nous découvrions que l'ovulation avait volontiers lieu en seconde partie de nuit. Il fallait, passé minuit, rejoindre le bloc opératoire ou le laboratoire, selon son statut de clinicien ou de biologiste. Pour notre part, c'était à Necker que nous guettions le conjoint portant le précieux thermos contenant le flacon de fluide folliculaire aspiré à Sèvres ou à Tenon et maintenu à 37° C. L'envie de réussir cette aventure, de répondre à l'attente anxieuse que nous lisions dans les yeux de nos patientes, d'approcher ce miracle de la vie que nous observions sous nos microscopes nous permettait sans doute de supporter les contraintes et la fatigue de cette période. L'arrivée des dosages plasmatiques de LH et la description du LH SIR (*LH surge-initiating rise*) par l'équipe de Clamart améliorait les choses (36). Il devenait possible de repérer, non pas l'acmé du pic de LH, mais son début qui se situait 38-40 heures avant la rupture folliculaire. On disposait de plus de temps pour s'organiser et les échecs de recueil se faisaient moins fréquents. Si l'étape de fécondation ne nous posait plus de problèmes, les clivages étaient rares. Nos relations étaient très amicales avec l'équipe de Clamart et les échanges scientifiques habituels. C'est donc tout naturellement que nous discutâmes de ce problème. Quelle en était la cause ? Nos procédures étaient très proches et nous utilisions le même milieu. Mis au point à partir de la composition des fluides folliculaires, tubaires et utérins de la lapine, la brebis et la femme par Yves Ménézo, le fameux B2 fut appelé plus tard le « French milieu » car toute la FIV française l'adopta (37). Une différence de taille, cependant, notre configuration géographique imposait le transport des ovocytes et des embryons entre le bloc opératoire et le laboratoire; le transport était-il en cause ? Pour le savoir, nous bâtissions dans l'enthousiasme un protocole expérimental dans lequel pour dix patientes, le transport se ferait de Sèvres à Clamart et retour. Si des embryons étaient obtenus, c'est que le transport n'était pas en cause. C'est ce qui arriva, dès le premier essai, prenant tout le monde par surprise. Lorsque je vins chercher les embryons à Clamart pour aller faire avec Jean Cohen le transfert à Sèvres, je compris que nous n'avions pas réfléchi aux conséquences. Nous venions d'entrecroiser cliniciens et biologistes de deux équipes amies... mais néanmoins concurrentes¹.

La première grossesse française qui en résulta était au centre d'un imbroglio tragi-comique, que Jacques Testart a déjà raconté (35) : Jean Cohen était heureux, les biologistes ennuyés, René Frydman en

1. Un nouvel « échange » entre les équipes aurait lieu, un peu plus tard, quand Joëlle Bélaïsch-Allart, quitte Clamart pour rejoindre Sèvres où elle succèdera à Jean Cohen, dans la responsabilité de l'AMP et à Vincent Lofredo en tant que chef du service de gynécologie-obstétrique.

colère. Le protocole expérimental s'arrêta là, les clivages avaient désormais lieu également à Necker, sans que nous ayons modifié nos pratiques.

Le transport des ovocytes et des embryons, dans de bonnes conditions de température et de pH fut largement utilisé par la suite, faute de mieux, par nombre d'équipes clinique et biologique n'ayant pas la même localisation géographique.

Quant à nous, l'interruption spontanée de cette grossesse au terme de 10 semaines remit la balle au centre. Que se passait-il à cette époque dans le monde ?

La FIV marque une pause avant la généralisation de ses succès

Après les deux naissances d'Oldham, Edwards et Steptoe, désormais à la retraite, mirent 2 ans et demi avant de pouvoir fonder ce qui allait devenir la célèbre clinique d'AMP de Bournhall, près

de Cambridge. D'autres groupes s'étaient constitués dans plusieurs pays et continents mais les quelques grossesses obtenues n'étaient pas évolutives. Il en allait de même en France : FCS à Clamart, FCS à Tenon, FCS à Montpellier où s'était formée une nouvelle équipe réunissant Bernard Hédon, Olivier Flandres, Claude Humeau et Françoise Arnal. Le doute s'installait, quant à la reproductibilité de la FIV. Allait-on renouveler l'exploit anglais ? Ces incertitudes favorisaient échanges et discussions amicales lors de colloques, comme celui de Kiel en Allemagne de l'Ouest en septembre 1980 (38). On avait les mêmes problèmes, on tentait les nouvelles « recettes » en désespoir de cause, on cherchait... C'est dire si la naissance de Candice Reed en juin 1980 en Australie (39), troisième bébé FIV dans le monde, obtenue elle aussi en cycle naturel, rassura tout le monde, bientôt suivie par la reprise d'activité d'Edwards et Steptoe et les premières naissances de Bournhall. La FIV n'était pas une illusion.



Fig. 1 — Photographie des participants à la troisième réunion de Bournhall (1997). *Premier rang (de gauche à droite) : Bruce Lessey, Jan Tesarik, Georgeanna Jones, Howard Jones, Jacqueline Mandelbaum, Michelle Plachot. Deuxième rang (de gauche à droite) : Scott Chappell, Carlos Simon, Klaus Diedrich, Basil Tarlatzis, Karen Leib. Troisième rang (de gauche à droite) : J Russell, Arnaud Ythier, Anne Chandley, Renato Fanchin, Jean Cohen, Ernest Loumaye, Steve Smith. Quatrième rang (de gauche à droite) : Carol Warner, Marku Seppala, Lars Hamberger, Matts Wikland, Bart Fauser. Dernier rang (de gauche à droite) : Colin Howles, Kay Elder, David Gardner, Jack Cohen, André Van Steirteghem, Paul Devroey, Sergio Oehninger, Jacques Salat-Baroux, Bob Edwards, Peter Brinsden, Alan Trounson.*

Plus de trente ans se sont écoulés depuis la naissance de Louise Brown ; plusieurs des « pionniers » de la FIV ont disparu, leur mémoire est vivante.

La première réunion organisée à Bournhall, le 6 septembre 1981, rassembla les « pionniers » de la FIV qui avaient déjà eu des grossesses. Une des sujets le plus débattu fut celui de la stimulation ovarienne : Alan Trouson et John Leeton, les Australiens, plaidaient pour l'usage du clomifène qui permettait d'obtenir un peu plus d'ovocytes et de déclencher l'ovulation par hCG lorsque l'estradiol plasmatique atteignait ou dépassait 300 pg/mL et par follicule (40). Georgeanna et Howard Jones, les Américains, rapportaient leur expérience malheureuse du cycle naturel : 41 cœlioscopies, 13 transferts, aucune grossesse. Ils étaient revenus à leur stimulation habituelle, les hMG-hCG et le treizième essai aboutissait à une grossesse évolutive (41).

Les deux années suivantes virent se succéder les faire-parts de naissances en France : février 1982, naissance d'Amandine à Clamart ; juin 1982 naissance d'Alexia à Sèvres ; mars 1983 naissance de Wilfrid à Tenon ; juillet 1983 naissance à Montpellier. En Suède, à Göteborg la première naissance FIV dans un pays nordique était rapportée en 1982 par Hamberger (42) et Feichtinger et Kemeter obtenaient les premiers jumeaux autrichiens (43).

À partir de là, il devient impossible de citer tout le monde, les centres de FIV se multiplient de pays en pays, de ville en ville. La fécondation extracorporelle devient un traitement de routine de l'infertilité du couple, les indications s'étendent, les techniques dérivées ou associées se multiplient qui seront déclinées dans d'autres chapitres. Pour qu'il en soit ainsi, il fallut adapter la FIV des débuts. On peut difficilement imaginer un usage large de la FIV en cycle spontané, nécessitant la disponibilité des équipes cliniques et biologiques 24 heures sur 24 pour le recueil du seul ovocyte préovulatoire. La réintroduction de la stimulation ovarienne contrôlée et la qualité du monitoring de la croissance folliculaire ont facilité le développement de la fécondation *in vitro*. Le recueil ovocytaire sous cœlioscopie aurait été également une contrainte limitante, que la mise au point de la ponction échographique transvaginale a levée (44-46). Cependant, disposer de nombreux embryons sans avoir la possibilité de les transférer *in utero* n'était guère satisfaisant. Enfin, l'application à l'humain de la congélation embryonnaire (47-50) a rendu une cohérence à la stratégie de recrutement multifolliculaire en évitant la destruction des embryons surnuméraires et en augmentant l'efficacité globale de la FIV. Difficile de prévoir de quoi demain sera fait. Peut-être retournera-t-on vers une démarche plus naturelle, adaptée aux préoccupations de la société moderne, mais en ayant trouvé les moyens d'en accroître l'efficacité.

Références

1. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART), de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KJ *et al.* (2009) World Collaborative Report on Assisted Reproductive Technology 2002. *Hum Reprod* 24: 2310-20
2. Schenk SL (1880) Das Säugethierei künstlich befruchtet ausserhalb des Mutterthieres. *Mitt Embr Inst K K Univ Wien* 1: 107-18
3. Brinster RL (1974) Embryo development. *J Anim Sci* 38: 1003-12
4. Pincus G, Enzmann EV (1934) Can mammalian oocytes undergo normal development in vitro? *Proc Natl Acad Sci USA* 20: 121-2
5. Menkin MF, Rock J (1948) In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Am J Obstet Gynecol* 55: 440-52
6. Dauzier L, Thibault C, Wintenberger S (1954) La fécondation in vitro de l'oeuf de la lapine. *C R Acad Sci, Paris* 238: 844-45
7. Chang MC (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184: 466-67
8. Austin CR (1951) Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4: 581-92
9. Bavister BD (2002) Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 124: 181-96
10. Clarke GN (2006) ART and history, 1678-1978. *Hum Reprod* 21: 1645-50
11. Yanagimachi R, Chang MC (1963) Fertilisation of hamster eggs in vitro. *Nature* 200: 281-82
12. Wakayama T, Yanagimachi R (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 16: 639-41
13. Whittingham DG (1968) Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* 220: 592-3
14. Whittingham D, Leibo S, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 178: 411-14
15. Whittingham DG (1977) Fertilization and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees C. *J Reprod Fertil* 49: 89-94
16. Bavister BD, Edwards RG, Steptoe PC (1969) Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 20:159-60
17. Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G (1991) In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil (suppl)* 44: 375-84
18. Fauser BC, Edwards RG (2005) The early days of IVF. *Hum Reprod* 11: 437-38
19. Edwards RG (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-51
20. Edwards RG (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 2: 926-29
21. Edwards RG (2002) Tribute to Georgeanna and Howard Jones. *Reprod Biomed Online* 6: 352-60
22. Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HW Jr (1966) Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 96: 192-200
23. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969) Early stages of fertilization in vitro in human oocytes matured in vitro. *Nature* 221: 632-35
24. Bavister BD, Edwards RG, Steptoe PC (1969) Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 20 159-60
25. Steptoe PC, Edwards RG (1970) Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1: 683-89

26. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1970) Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature* 227: 1307-9
27. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM (1971) Human blastocyst grown in culture *Nature* 229: 132-3
28. Edwards RG, Sharpe J (1971) Social values and research in human embryology. *Nature* 231: 87-91
29. De Kretser D, Dennis P, Hudson B *et al.* (1973) Transfer of a human zygote. *Lancet* 2: 728-29
30. Steptoe PC, Edwards RG (1976) Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1: 880-82
31. Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366
32. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 737-56
33. Edwards RG (1996) Patrick Steptoe. *Hum Reprod* 11 suppl: 215-34
34. Cohen J, Trounson A, Dawson K *et al.* (2005) The early days of IVF outside the UK. *Hum Reprod Update* 11: 439-59
35. Testart J (1986) De l'éprouvette au bébé-spectacle. In: *L'œuf transparent*. Paris, Flammarion: 39-95
36. Testart J, Frydman R, Feinstein MC *et al.* (1981) Interpretation of plasma LH assay for the collection of mature oocytes from women; definition of an LH surge initiating rise (LH S.I.R). *Fertil Steril* 36: 50-54
37. Menezo Y (1976) Synthetic medium for gamete survival and maturation and for culture of fertilized eggs. *C R Acad Sci Paris* 282: 1967-70
38. Hafez ESE, Semm K (1982) *In Vitro fertilization and Embryo transfer*. MTP Press limited, Lancaster, England
39. Lopata A, Johnston I, Hoult I, Speirs A (1980) Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory oocyte. *Fertil Steril* 33: 117-20
40. Trounson A, Leeton J, Wood J, Webb J, Wood C (1981) Pregnancies in the human by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 212: 681-2
41. Jones HR (2002) IVF: Past and future. *Reprod Biomed Online* 6: 375-81
42. Hamberger L, Wikland M, Nilsson L *et al.* (1982) Methods for aspiration of human oocytes by various techniques. *Acta Med Rom* 20: 370-8
43. Feichtinger W, Szalay S, Kemeter P *et al.* (1982) Twin pregnancy after laparoscopic oocyte recovery, in-vitro fertilization and embryo transfer *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1982 42: 197-9
44. Lenz S, Lauritsen JG (1982) Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anaesthesia: a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 38: 673-7
45. Dellenbach P, Nisand I *et al.* (1984) Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle puncture for oocyte retrieval. *Lancet* 1: 1467
46. Wikland M, Hamberger L (1984) Ultrasound as a diagnostic and operative tool for in vitro fertilization and embryo replacement (IVF/ER) programs. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1: 213-16
47. Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305:707-9
48. Zeilmaker G, Alberda A, van Gent I *et al.* (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 42: 293-96
49. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J *et al.* (1986) High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 46: 268-72
50. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M *et al.* (1987) Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 2: 709-15

I. Cédric-Durnerin,
C. Meynant, J.-N. Hugues,
O. Boïko, S. Herberg
et S. Czernichow

Nutrition et fertilité : aspects féminins

Introduction

Le fonctionnement de l'axe reproductif est intimement lié au statut nutritionnel. Dans de nombreuses espèces, l'adaptation du système de reproduction aux saisons ou aux conditions climatiques a pour objectif d'optimiser les chances de survie de la descendance. Le système reproductif des femelles est plus sensible aux conditions nutritionnelles que celui des mâles car la grossesse et l'allaitement représentent une grande dépense énergétique. De nombreuses données expérimentales chez l'animal ont permis de mieux comprendre les relations entre nutrition et reproduction et ont conduit à des modifications nutritionnelles pour améliorer la reproduction notamment dans les élevages.

Dans l'espèce humaine, l'impact des facteurs nutritionnels sur la mise en route de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien à la puberté et son fonctionnement pendant la vie reproductive est bien établi mais des données suggèrent que la nutrition soit aussi impliquée dans les phénomènes de fécondation, d'implantation et de développement embryonnaire. De plus, le niveau de nutrition maternelle pendant la grossesse influence non seulement le développement fœtal mais aussi la susceptibilité à certaines maladies à l'adolescence ou à l'âge adulte. Parallèlement, de nombreux facteurs comportementaux de style de vie sont également susceptibles d'agir sur la fertilité. En effet, la reproduction féminine est caractérisée par un déclin de la fertilité avec l'âge qui commence dès 30 ans et s'accélère après 38 ans. Dans les pays industrialisés, la conjonction d'un désir plus tardif de maternité des femmes avec la progression croissante de l'obésité représente un véritable problème dans la prise en charge de l'infertilité. En France, la prévalence du surpoids est de 23,3 % et celle de l'obésité, de 13 % dans la population féminine en 2006 (1) et au cours des 10 dernières années, la prévalence de l'obésité

féminine s'est accrue de 64 %. De plus, chez les femmes en âge de procréer, surpoids et obésité sont plus fréquemment retrouvés après 30 ans qu'avant : 22,7 % vs 12,7 % et 16,8 % vs 10,1 % (2). Or, l'âge moyen des femmes à l'accouchement est de presque 30 ans et seule la fécondité après 30 ans continue de progresser. Au même titre qu'une alimentation adaptée est capable de prévenir les maladies cardio-vasculaires et certains cancers, l'alimentation pourrait constituer un élément essentiel, mais largement négligé dans la prévention des troubles de l'ovulation et de l'infertilité féminine. De plus, si les traitements tels que la stimulation ovarienne, la chirurgie et l'assistance médicale à la procréation (AMP) sont efficaces, ils sont néanmoins coûteux et une prise en charge nutritionnelle associée pourrait permettre d'améliorer leur efficacité.

Nous aborderons dans cette revue le rôle de la nutrition sur la reproduction féminine tant dans ses aspects qualitatifs (sous-nutrition, surpoids et obésité) qui sont maintenant relativement bien connus que dans ses aspects qualitatifs (rôle des différents nutriments, vitamines et minéraux) qui sont encore partiellement établis. Nous n'envisagerons pas le rôle de la nutrition sur le déroulement de la grossesse même si son impact n'est plus à démontrer. En effet, le risque de complications de la grossesse (anomalies congénitales, HTA gravidique, diabète gestationnel, accouchement prématuré, césarienne, dystocie des épaules, mortalité *in utero* et néonatale, complications du post-partum) est augmenté chez la femme obèse mais aussi chez celle qui présente des troubles du comportement alimentaire (3). Nous n'aborderons pas non plus, bien qu'ils soient souvent intimement liés à la nutrition, le rôle dans l'infertilité féminine des facteurs comportementaux de style de vie : exercice physique, tabagisme, consommation d'alcool et de caféine, stress psychologique et exposition à des polluants environnementaux (4).

Rôle du poids sur la fertilité féminine

L'impact sur les capacités reproductives féminines des anomalies de poids définies par un indice de masse corporelle (IMC) ou *body mass index* (BMI) en dehors des valeurs normales (tableau I) a été démontré dans la population générale, tant pour le surpoids et l'obésité que pour un faible poids (5, 7). De plus, le poids à l'adolescence qu'il s'agisse de maigreur, de surpoids et surtout d'obésité s'est avéré être lié à la fertilité ultérieure et la fertilité totale à la fin de la vie reproductive, indépendamment du poids à l'âge adulte dans deux études épidémiologiques dans la population finlandaise (8) et la population américaine (9).

Enfin, le poids de la femme lors de sa naissance est également lié à la fertilité ultérieure dans une étude épidémiologique dans la population danoise, avec une augmentation du délai nécessaire à concevoir pour un petit poids de naissance (< 2 500 g à terme ou 1 500 g en cas de prématurité) ou un poids de naissance élevé (> 4 500 g à terme ou 3 500 g en cas de prématurité) en particulier si l'IMC avant grossesse est inférieur à 25 dans le premier cas et supérieur à 25 dans le second (10).

Tableau I. – Définition de l'indice de masse corporelle ou *body mass index*.

IMC ou BMI = poids (kg)/taille² (m)
– Valeurs normales : $20 < \text{IMC} \leq 25$
– Surpoids : $25 < \text{IMC} \leq 30$
– Obésité : $\text{IMC} > 30$
– Obésité morbide : $\text{IMC} > 40$
– Faible poids : $\text{IMC} < 20$ ou 18,5

Insuffisance d'apports nutritionnels

Dans les pays industrialisés, la pathologie de la reproduction liée à l'insuffisance d'apports nutritionnels est en rapport avec des troubles du comportement alimentaire (anorexie mentale, boulimie) ou la pratique intensive d'un sport, responsables d'une aménorrhée liée au poids qui touche 1 à 5 % des femmes. En effet, la mise en route de l'activité ovarienne cyclique à la puberté requiert un poids (47 kg) ou une masse grasse critique. Cependant, le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien est plus dépendant de la balance énergétique que du poids lui-même. Les états de maigreur constitutionnelle ne s'accompagnent pas toujours d'anomalies du cycle si l'apport calorique reste large et, à l'inverse, des aménorrhées hypothalamiques peuvent se rencontrer chez des femmes de poids normal mais ayant une alimentation sélectivement restreinte en matières grasses. Si l'anovulation est responsable de l'infertilité, après retour à un poids normal, la fertilité de ces patientes est normale (11). En

revanche, l'évolution de la grossesse est altérée par les troubles du comportement alimentaire avec un risque quatre fois plus élevé d'accouchement prématuré et un plus faible poids de naissance (12). Ceci implique donc la nécessité d'un contrat de poids avant mise en route de tout traitement inducteur de l'ovulation et un suivi rapproché de la grossesse qui doit être considérée comme une grossesse à risque. Chez les patientes infertiles traitées en AMP, l'impact d'un IMC < 20 ou < 18,5 semble peu marqué sur les résultats en dehors d'une augmentation du risque de fausse couche spontanée (13).

Surpoids et obésité

On assiste à une véritable épidémie d'obésité dans les pays industrialisés avec des conséquences lourdes sur la santé : augmentation du risque de DNID, de maladies cardio-vasculaires, de cancer, d'arthrose et d'apnées du sommeil. L'obésité touche 3 à 5 fois plus les individus des classes socio-économiques les plus faibles. Elle s'accompagne d'une augmentation de la fréquence, de la sévérité et de la précocité de survenue du syndrome métabolique (tableau II) qui combine répartition prédominante de la graisse au niveau abdominal, dyslipidémie, hypertension artérielle et perturbation du métabolisme du glucose et de l'insuline. Or, la graisse abdominale et l'insulinorésistance (IR) sont deux facteurs majeurs impliqués dans la perturbation du cycle menstruel chez la femme.

Dans la population générale, le risque relatif d'infertilité par anovulation est multiplié par 1,3 (IC à 95 % : 1,2-1,6) pour un IMC compris entre 24 et 25,9 et augmente jusqu'à 3,7 (IC à 95 % : 2-3,7) pour un IMC > 32 et la part du surpoids dans l'infertilité par anovulation est deux fois plus importante que celle du sous-poids (5). Néanmoins, les femmes présentant une obésité gynoïde ont rarement une perturbation des cycles et ont des taux d'androgènes normaux. Inversement, l'obésité androïde est impliquée dans les troubles de l'ovulation (14) et le rapport taille/hanche est corrélé à la prévalence des troubles du cycle. Or, l'épidémie d'obésité s'accompagne d'un accroissement de l'obésité abdominale : en France en 2006 l'étude ObEpi (1) recense 35,8 % de femmes avec un tour de taille > 88 cm. La répartition corporelle de la graisse semble également impliquée dans les performances reproductives puisque dans une étude prospective de 500 femmes en insémination avec sperme de donneur, on note une corrélation négative entre le rapport taille/hanche et le taux de conception après ajustement pour l'âge, la parité, le poids, la durée des cycles et la consommation de tabac (15).

Tableau II. – Définition du syndrome métabolique (Fédération internationale du diabète 2005).

Présence de 3 au moins des 5 critères suivants :

- Obésité centrale avec tour de taille > 88 cm ou 80 cm pour les femmes européennes (critère obligatoire)
- HTA > 130-85 mmHg
- Hypertriglycéridémie $\geq 1,5$ g/L (1,7 mmol/L)
- Hypocholestérolémie HDL < 0,5 g/L (1,29 mmol/L)
- Intolérance aux hydrates de carbone : hyperglycémie à jeun entre 1,10 et 1,26 g/L et/ou à 2 h de l'HGPO 75 g entre 1,4-1,99 g/L à réaliser systématiquement si l'IMC est > 27 ou s'il existe des antécédents familiaux de DNID ou personnels de diabète gestationnel.

L'obésité par le biais de l'IR est surtout parfaitement connue pour aggraver les troubles de l'ovulation (16) chez les patientes ayant une prédisposition au syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). En effet, l'IR est un puissant amplificateur de l'hyperandrogénie et par conséquent de l'anovulation. À l'inverse, l'absence d'hyperandrogénie dans le SOPK est associée à une fréquence moindre de l'obésité et des troubles métaboliques (17). Bien que difficile à évaluer en pratique clinique en dehors des formes sévères qui s'accompagnent d'un acanthosis nigricans (aspect grisé de la peau aux zones de frottement), l'IR est le meilleur critère différenciant SOPK ovulatoire et anovulatoire. S'il n'y a pas de consensus sur les dosages biologiques à utiliser pour diagnostiquer l'IR, le terrain métabolique peut facilement être reconnu par l'existence d'un rapport taille hanche > 0,85, l'existence d'antécédents personnels de diabète gestationnel ou de macrosomie fœtale ou l'existence d'antécédents familiaux de diabète. Dans l'ensemble, toute ethnie, tout poids et âge confondus, 50 à 70 % de des femmes SOPK sont insulino-résistantes (18) et les femmes SOPK sont plus IR que les contrôles de même poids. Le SOPK est donc une véritable maladie métabolique avec 60 % d'obésité, 30 à 35 % d'intolérance aux hydrates de carbone et 7 à 10 % de diabète patent. L'aspect métabolique du syndrome n'est bien souvent pas suffisamment pris en compte, bien qu'il conditionne non seulement les risques de complications pendant la grossesse (19), mais aussi les risques d'échecs ou de complications des traitements inducteurs de l'ovulation. En effet, l'IMC est un facteur de risque de résistance au citrate de clomiphène (absence d'ovulation malgré l'augmentation des doses) et est lié à l'augmentation des doses de citrate de clomiphène (20) ou de gonadotrophines (21) nécessaire pour induire une croissance folliculaire. L'hyperandrogénie est liée, quant à elle, au risque de réponse multifolliculaire (22). Le premier objectif de la prise en charge du SOPK (23) est de réduire l'hyperandrogénie et l'insulinorésistance par l'obtention d'une perte de poids. L'amélioration des troubles ovulatoires est obtenue rapidement en deux à quatre semaines (24) même pour des pertes

de poids faible de 5 à 10 % du poids initial et même si l'IMC reste anormal à la fin de l'étude (25).

En dehors des troubles de l'ovulation liés au SOPK où le rôle du poids dans l'anovulation et l'infertilité qui en découle est prépondérant, de nombreuses femmes obèses n'ont aucune difficulté pour devenir enceinte et avoir des enfants. Néanmoins, chez les femmes fertiles qui ont conçu spontanément, le poids est responsable d'un allongement du délai nécessaire à la conception (6, 7, 26). Chez les femmes ovulatoires et hypofertiles, une augmentation de 1 point de l'IMC au-delà de 39 kg/m² diminue les taux de grossesse spontanée à 1 an de 4 % (27). Le poids est aussi associé à une augmentation du risque de fausses couches spontanées (FCS) précoces OR 1,67 (IC à 95 % : 1,25-2,25) pour un IMC > 25 (28) et également de FCS itératives. Chez les femmes traitées en AMP par FIV/ICSI, la méta-analyse de 12 études montre qu'un IMC > 25 diminue les chances de grossesse OR 0,71 (IC à 95 % : 0,62-0,81), nécessite plus forte doses de gonadotrophines : différence moyenne pondérée + 210 UI (IC à 95 % : 149-271), augmente le risque de FCS OR 1,33 (IC à 95 % : 1,06-1,68) (29). L'effet de l'IMC est cependant plus marqué sur le taux de succès des femmes jeunes que des femmes de plus de 36 ans où l'altération qualité ovocytaire devient le facteur prédominant d'échec (30). Enfin, le don d'ovocytes constitue un modèle particulièrement intéressant pour étudier les effets extra-ovariens du poids, c'est-à-dire indépendants de la réponse à la stimulation et de la qualité ovocytaire puisque les ovocytes de donneuses sont transférés après fécondation dans l'utérus de receveuses. Les études dans ce modèle suggèrent un rôle du poids sur l'endomètre et le développement embryonnaire précoce. En effet, le taux de grossesse évolutive des receveuses en surpoids ou obèses est significativement diminué comparé à celui des receveuses de poids normal ou en sous-poids (31).

Au total, l'effet du poids sur la reproduction féminine est bien documenté avec un effet prépondérant sur l'ovulation dans les conditions de faible poids, ou de surpoids sur un terrain prédisposé, mais aussi chez les patientes normo-ovulatoires en augmentant le délai de conception et le risque de FCS précoces. Quant aux patientes infertiles, la prise en charge des problèmes de poids est un préalable indispensable avant la mise en route du traitement de l'infertilité, non seulement pour améliorer son efficacité, mais aussi prévenir les complications de la grossesse.

Rôle de la nutrition sur la fertilité féminine

Si l'impact du poids sur la fertilité est bien documenté, le rôle de la nutrition sur la fertilité des

femmes en âge de procréer non obèses et en bonne santé est bien moins exploré. Pourtant, certains troubles de l'ovulation sont liés à des pathologies métaboliques (IR, Diabète, galactosémie) suggérant que des facteurs diététiques pourraient jouer un rôle étiologique dans certaines formes d'infertilité. Il y a néanmoins assez peu d'études disponibles à ce jour sur le rôle des différents nutriments sur la fertilité avec souvent de petits effectifs et des résultats discordants. La plupart des données proviennent d'une étude épidémiologique sur un sous-groupe de la *Nurses' Health Study* constitué de 18 555 femmes mariées sans antécédent d'infertilité suivies prospectivement entre 1991 et 1999 et ayant désiré ou obtenu une grossesse sur cette période de suivi de huit ans. Parmi ces femmes, 438 ont rapporté une infertilité liée à des troubles de l'ovulation isolés ou associés à d'autres causes d'infertilité. Dans une étude préliminaire, le diagnostic d'infertilité par anovulation rapporté par les patientes a été confirmé par l'analyse des dossiers médicaux dans 95 % des cas. L'alimentation a été évaluée dans cette population à deux reprises grâce à un questionnaire de fréquence de consommation de plus de 130 types d'aliments et de boissons différents avec neuf options de fréquence allant de jamais ou moins d'une fois par mois à six fois ou plus par jour. Ce type de questionnaire a été validé et fournit une estimation valide des apports en différents nutriments, vitamines, minéraux et fibres. L'étude analyse l'association entre différents facteurs diététiques et l'existence d'une infertilité liée à une anovulation. En plus de leur rôle étiologique, les facteurs diététiques pourraient jouer un rôle thérapeutique non négligeable. Cependant, chez les femmes infertiles, les études sur l'impact de la répartition des différents nutriments dans le régime alimentaire sont encore peu nombreuses et insuffisantes pour donner des recommandations diététiques spécifiques pour améliorer la reproduction.

Glucides

De nombreuses études tant épidémiologiques que cliniques ont montré que le régime alimentaire influence l'homéostasie du glucose. La quantité et le type d'hydrates de carbone ingérés conditionnent la glycémie postprandiale et la réponse insulínique associée, et ont conduit à établir un index glycémique des différentes sources de glucides. Or l'insulinorésistance est un des facteurs majeurs impliqués dans les troubles de l'ovulation. De plus, le taux d'hémoglobine glyquée s'est avéré être un marqueur potentiel d'infertilité dans une étude prospective (32).

Sur la cohorte de la *Nurses' Health Study*, une analyse ajustée pour l'âge, le poids, la parité, le tabagisme, l'activité physique, la consommation éner-

gétique totale et les autres variables diététiques a montré que le risque relatif d'infertilité par anovulation comparant le quintile le plus élevé et le plus bas de consommation totale d'hydrates de carbone était de 1,91 (IC à 95 % : 1,27-3,02). Le risque relatif correspondant pour la charge glycémique (charge glycémique = index glycémique x quantité d'hydrates de carbone) de la diète est très proche de 1,92 (IC à 95 % : 1,26-2,92). En revanche, l'index glycémique de la diète n'est corrélé à l'infertilité par anovulation que chez les femmes nullipares et la consommation en fibres n'est pas associée au risque d'infertilité par anovulation (33).

L'alimentation des pays industrialisés est riche en produits laitiers. Le lactose, principal hydrate de carbone du lait et des autres produits laitiers, est clivé dans l'intestin en glucose et galactose qui sont ensuite absorbés et métabolisés. Or, les femmes qui présentent une galactosémie par anomalie congénitale du métabolisme du galactose développent souvent une insuffisance ovarienne prématurée. Des données similaires chez l'animal suggèrent qu'une consommation élevée de produits laitiers pourrait augmenter le risque d'infertilité par anovulation. Mais à l'inverse, il a aussi été montré que la consommation de produits laitiers était associée à un risque plus faible d'insulinorésistance. Ceci pourrait expliquer les résultats contradictoires d'études antérieures sur la consommation de lait et le risque d'infertilité féminine. De plus, tous les produits laitiers n'ont pas forcément le même rôle sur la fertilité en fonction de leur teneur en matières grasses. Dans l'analyse de la *Nurses' Health Study*, la consommation totale de lactose, de calcium, de phosphore et de vitamine D n'est pas associée à l'infertilité par anovulation. Par contre, une consommation de plus de deux portions par jour de produits laitiers pauvres en matières grasses augmente le risque d'infertilité par anovulation par 1,85 (IC à 95 % : 1,24-2,77) par rapport à une consommation de moins de 1 portion par semaine. À l'inverse, une consommation de plus de 1 portion par jour de produits laitiers riches en matières grasses diminue le risque d'infertilité par anovulation par 0,73 (IC à 95 % : 0,52-1,01) par rapport à une consommation de moins de 1 portion par semaine (34).

Lipides et AG

L'association entre un régime pauvre en matières grasses totales ou saturées et des perturbations du cycle menstruel comme un allongement de la longueur des cycles ou de la phase folliculaire a été mise en évidence dans plusieurs études avec de petits effectifs. Cependant, l'interprétation de ces études est délicate car l'analyse doit prendre en compte la modification de la consommation énergétique totale qui en découle, de même que la modification de la

consommation en protéines et du ratio entre les graisses saturées, monoinsaturées et polyinsaturées. Néanmoins, d'autres arguments plaident en faveur d'un rôle des AG sur la fonction ovulatoire. Chez les patientes atteintes de SOPK, l'utilisation d'agents sensibilisant à l'action de l'insuline comme les glitazones, qui se lient aux récepteurs nucléaires PPAR- γ , permet d'améliorer le profil métabolique et de restaurer l'ovulation. Or, certains AG sont capables de se lier aux récepteurs PPAR- γ avec des effets qui diffèrent pour les isomères *cis* ou *trans*. Une consommation élevée d'AG insaturés *cis* (communément retrouvés dans les huiles végétales non hydrogénées et les sauces de salades) apporte une amélioration des caractéristiques métaboliques et endocrines chez les femmes SOPK (35) alors qu'à l'inverse une consommation de graisses *trans* (retrouvées dans les produits frits) aggrave l'insulinorésistance. Dans l'analyse de la *Nurses' Health Study*, la consommation totale de graisses, de cholestérol et de la plupart des acides gras n'est pas associée à l'infertilité par anovulation. Par contre, les AG insaturés *trans* augmentent le risque d'infertilité par anovulation. En effet, après ajustement sur les facteurs de risque connu d'anovulation, toute augmentation de 2 % de la part des AG *trans* dans la consommation énergétique totale augmente le risque d'infertilité par anovulation de 1,73 (IC à 95 % : 1,09-2,73) si cette augmentation a lieu aux dépens des hydrates de carbone, de 1,79 (IC à 95 % : 1,11-2,89) si cette augmentation a lieu aux dépens des AG poly-insaturés et de 2,31 (IC à 95 % : 1,09-4,87) si cette augmentation a lieu aux dépens des AG mono-insaturés (36).

Protéines

L'augmentation de la part des protéines dans le régime alimentaire améliore l'IR dans le DNID et l'intolérance aux hydrates de carbone. Or, nous avons vu que la sensibilité à l'insuline est un déterminant important de la fonction ovulatoire en particulier chez les patientes SOPK. De plus, l'augmentation modérée de la part des protéines dans le régime alimentaire a l'avantage d'augmenter la satiété donc de réduire la prise alimentaire, d'augmenter la thermogénèse postprandiale et le métabolisme de base, et de préserver la masse maigre dans la perte de poids. Cependant, deux études chez des femmes SOPK obèses recevant un régime d'une durée de un à trois mois contenant soit 15 ou 30 % de protéines et 55 ou 40 % d'hydrates de carbone respectivement, avec une part fixe de 30 % de lipides, n'ont pas montré de différence entre les deux régimes dans la perte de poids et l'amélioration de la fonction de reproduction (37, 38). Néanmoins, on observait une réduction plus importante de la glycémie postprandiale et une amélioration plus prolongée de l'hyperandrogénie avec

le régime riche en protéines. Ceci laisse donc penser qu'il est possible que la quantité et la source des protéines du régime alimentaire puissent influencer la fonction ovulatoire. L'étude de la *Nurses' Health Study* a montré que les femmes qui avaient la consommation la plus importante en protéines avaient un risque plus élevé 1,41 (IC à 95 % : 1,04-1,91) d'infertilité d'origine ovulatoire comparé au quintile de consommation le plus faible. Cette association était surtout marquée pour la consommation de protéines d'origine animale en particulier les viandes comme le poulet et la dinde. À l'inverse, la consommation de protéines végétales tend à diminuer ce risque 0,78 (IC à 95 % : 0,54-1,12). Consommer 5 % de ses apports en énergie en protéines végétales plutôt qu'en hydrates de carbones ou qu'en protéines animales diminue le risque d'infertilité d'origine ovulatoire de 50 et 42 % respectivement (39).

Fer

Le fer est un élément important du métabolisme humain. Tout déséquilibre dans le sens d'une carence ou d'une surcharge a des conséquences sur le fonctionnement cellulaire. Il est en premier lieu nécessaire pour l'érythropoïèse mais intervient également dans de nombreuses réactions enzymatiques pour la synthèse d'ADN. De plus, la transferrine et son récepteur sont présents au niveau des cellules de la granulosa et de l'ovocyte suggérant son implication dans les phénomènes de reproduction. L'hémochromatose est en effet une cause connue d'hypogonadisme hypogonadotrope et la maladie coeliaque qui s'accompagne d'un déficit en fer et en autres micronutriments est responsable d'infertilité dont l'origine reste mal comprise. De plus, la carence en fer est l'un des déficits nutritionnels les plus répandus et touche environ 20 % des femmes en âge de procréer. Une étude pilote sur 30 patientes a montré qu'une supplémentation en fer (40) permettait d'améliorer les taux de grossesses de femmes infertiles traitées sans succès jusqu'alors. De même, l'analyse de la *Nurses' Health Study* montre que les femmes qui consomment des suppléments alimentaires riches en fer ont une diminution du risque d'infertilité ovulatoire 0,60 (IC à 95 % : 0,39-0,92). Dans cette étude, les femmes qui ont la consommation la plus importante de fer non héminique (contenu dans les aliments d'origine végétale, les œufs et les produits laitiers, et peu biodisponible) ont un risque d'infertilité ovulatoire diminué de 40 % (IC à 95 % : -8 à -61 %) alors que la consommation de fer sous forme héminique (apporté dans l'alimentation par la viande, les poissons et les produits d'origine animale) n'est pas associée au risque d'infertilité ovulatoire (41). De plus, la consommation de fer est associée à une diminution du risque de fausse couche (42). Bien que

ces résultats demandent à être reproduits dans des études prospectives, étant donné que la supplémentation en fer est recommandée en cas de grossesse et que plusieurs semaines de traitement sont nécessaires au rétablissement des stocks, il semble opportun de supplémenter les femmes infertiles avant la mise en route du traitement de leur infertilité.

Folates

Les folates appartiennent au groupe des vitamines B et doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation (légumes verts, etc.) ou sous forme de suppléments. Si leur rôle en période périconceptionnelle et au cours de la grossesse est bien connu dans la prévention des anomalies de fermeture du tube neural et les autres malformations congénitales (43), leur implication dans la fertilité féminine est de plus en plus étayée par des études récentes. En effet, les folates interviennent dans la synthèse des bases pyrimidiques et puriques et donc de l'ADN en faisant intervenir une enzyme clé, la MTHFR (fig. 1). Or, cette enzyme intervient également dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine et un déficit de l'activité de cette enzyme (par carence d'apport en folates ou du fait d'un polymorphisme notamment C677T) produit une accumulation d'homocystéine néfaste au fonctionnement cellulaire.

Chez le rat, une carence en folates entraîne une inhibition de l'ovulation et, chez le primate, un régime carencé en folates entraîne des perturbations du cycle et une augmentation de l'atrésie folliculaire. Chez la femme, les arguments en faveur d'un rôle de la carence en folates dans les troubles de l'ovulation tiennent au fait que l'hyperhomocystéinémie est plus fréquemment observée chez les patientes SOPK obèses ou non, alors que le polymorphisme de la MTHFR n'est pas plus fréquent chez ces patientes que chez les contrôles (44). Les déterminants de cette élévation de l'homocystéine restent incertains et font débat entre les partisans et les opposants d'un lien entre hyperhomocystéinémie et IR. Il est à noter que le traitement de ces patientes par des agents insulinosensibilisateurs, telle la metformine, entraîne une augmentation de l'homocystéinémie malgré la diminution de l'insulinorésistance et pourrait être expliqué par un déficit en folates induit par la metformine. Par ailleurs, l'analyse de la *Nurse Health Study* montre que l'utilisation régulière de suppléments vitaminiques réduit le risque d'infertilité d'origine ovulatoire 0,59 (IC à 95 % : 0,46-0,75) pour une utilisation quotidienne par rapport à l'absence de suppléments vitaminiques (45). Ce sont les vitamines B et en particulier l'acide folique contenu dans les suppléments vitaminiques qui expliquent la majeure partie de l'association observée.

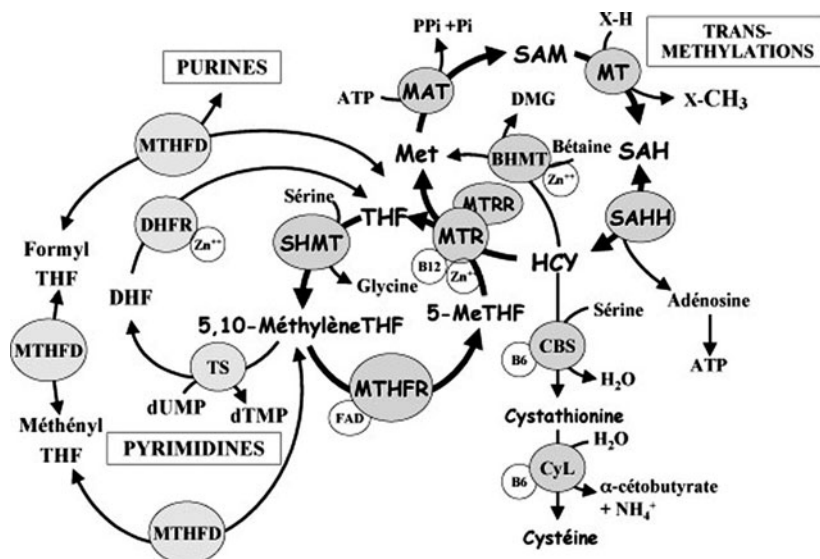


Fig. 1. – Métabolisme des folates.

Le cycle des folates alimente d'un côté les synthèses de purines et pyrimidines, et donc celles des acides nucléiques, de l'autre côté le cycle de l'homocystéine, permettant la reméthylation de celle-ci en méthionine, source directe de S-adenosylméthionine, le donneur universel de groupements méthyl dans les réactions de transméthylation.

THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthétase ; Met : méthionine ; HCY : homocystéine ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MAT : méthionine adénosyltransférase ; MT : méthyltransférases ; X : substrat à méthyler ; SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolase ; dUMP : désoxyuridine 5'-monophosphate ; dTMP : désoxythymidine 5'-monophosphate ; TS : thymidylate synthase ; DHFR : dihydrofolate réductase ; MTHFD : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase ; CBS : cystathionine-bêta-synthétase ; CyL : cystathionine lyase.

Chez les patientes traitées en AMP, plusieurs études ont analysé l'impact du polymorphisme de la MTHFR sur la réponse à la stimulation, la qualité embryonnaire et les taux de succès avec des résultats contradictoires ne permettant pas de dégager de conclusions très claires. Néanmoins, une étude prospective randomisée (46) chez des patientes présentant une hyperhomocystéinémie, ayant une première tentative de FIV, montre une augmentation des taux de grossesses et d'implantation dans le groupe supplémenté en folates.

Enfin, l'hyperhomocystéinémie et des taux bas de folates sont des facteurs de risque reconnus de fausses couches précoces à répétition mais par contre, pas le polymorphisme de la MTHFR. Néanmoins, une méta-analyse de 17 études randomisées ne montrait pas d'efficacité d'une supplémentation vitaminique pour réduire le risque de fausse couche (47) alors que des études épidémiologiques (42, 48) montrent l'intérêt d'une supplémentation en folates dans cette situation.

En pratique clinique, le dosage de l'homocystéine pourrait avoir un intérêt pour dépister les femmes présentant une hyperhomocystéinémie afin de les supplémenter en acide folique jusqu'à normalisation de celle-ci en vue d'améliorer leur fertilité. Cette supplémentation serait d'autant plus importante chez les femmes homozygotes C677T.

Antioxydants

L'apport par l'alimentation – comme la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine A (caroténoïdes), le zinc, le sélénium... – joue un rôle important et complémentaire à celui des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et réductase) dans le maintien ou le rétablissement de la balance oxydant et antioxydant au sein des tissus. Tout état de déséquilibre aboutit à l'accumulation de dérivés actifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* : ROS) incluant les radicaux hydroxyles, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique qui peuvent altérer l'ADN, les protéines et les membranes cellulaires entraînant la mort cellulaire par apoptose. Or, de nombreuses études (49) ont montré que le stress oxydatif joue un rôle physiopathogénique complexe dans la folliculogénèse, la maturation ovocytaire et l'ovulation, la fécondation et le développement embryonnaire. Il semble aussi largement impliqué dans les mécanismes de l'infertilité liée aux hydrosalpinx, à l'endométriase, au SOPK, au vieillissement ovarien et certains cas d'infertilité apparemment idiopathique. Il y a encore peu de données chez la femme sur l'impact de la supplémentation en antioxydants sur la fertilité. Il semble cependant que la consommation

d'un supplément nutritionnel puisse améliorer les taux de grossesse tant pour les patientes fertiles que infertiles.

Au total, il semble bien exister un régime alimentaire favorable à la fertilité avec une consommation de glucides à faible charge glycémique, une consommation d'AG mono-insaturés plutôt que de graisses *trans*, des protéines d'origine végétale plutôt qu'animale, une supplémentation en fer et en multivitamines. L'adhérence à ce type d'alimentation est associée à un risque plus faible d'infertilité par troubles de l'ovulation. La combinaison d'au moins cinq facteurs de faible risque incluant ces comportements alimentaires, le contrôle du poids et la pratique d'une activité physique régulière diminue de 69 % le risque d'infertilité (50).

Conclusion

La nutrition tant par les apports énergétiques que par la composition en nutriment du régime alimentaire semble jouer un rôle non négligeable sur la fonction ovulatoire, la qualité ovocytaire et l'implantation embryonnaire. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour mieux comprendre ces interactions et permettre d'établir des recommandations de régime alimentaire et de style de vie dans le but de prévenir certaines causes d'infertilité ou d'améliorer l'efficacité des traitements de l'infertilité.

Références

1. ObEpi-Roche (2006) 4^e enquête épidémiologique nationale sur l'obésité et le surpoids en France
2. Étude nationale nutrition santé (ENNS) (2006) Unité de surveillance et d'épidémiologie nutritionnelle (Usen) – Situation nutritionnelle en France en 2006 selon les indicateurs d'objectif et les repères du Programme national nutrition santé (PNNS). Institut de veille sanitaire, Université de Paris 13, Conservatoire national des arts et métiers, 2007. 74 p. Disponible sur www.invs.sante.fr
3. ESHRE (2006) Nutrition and reproduction in women. Human Reprod Update 12: 193-207
4. Homan GE, Davies M, Norman R (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. Human Reprod Update 13: 209-23
5. Rich-Edwards JW, Spiegelman D, Garland M *et al.* (2002) Physical activity, body mass index and ovulatory disorder infertility. Epidemiology 13: 184-90
6. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA *et al.* (2007) Subfertility in overweight and obese couples. Hum Reprod 22: 1634-7
7. Hassan MA, Killick SR (2004) Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. Fertil Steril 81: 344-51
8. Jokela M, Kiviniemi M, Elovainio M *et al.* (2007) Body mass index in adolescence and number of children in adulthood. Epidemiology 18: 599-606

9. Jokela M, Elovainio M, Kivimäki M (2008) Lower fertility associated with obesity and underweight with US National Longitudinal Survey on Youth. *Am J Clin Nutr* 88: 886-93
10. Nohr EA, Vaeth M, Rasmussen S *et al.* (2009) Waiting time to pregnancy according to maternal birthweight and pre-pregnancy BMI. *Hum Reprod* 24: 226-32
11. Crow SJ, Thuras P, Keel PK, Mitchell JE (2002) Long-term menstrual and reproductive function in patients with bulimia nervosa. *J Psychiatry* 159: 1048-50
12. Kouba S, Hallstrom T, Lindholm C, Hirschberg AL (2005) Pregnancy and neonatal outcome in women with eating disorders. *Obstet Gynecol* 105: 255-60
13. Veleza Z, Tiitinen A, Vilska S *et al.* (2008) High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Hum Reprod* 23: 878-84
14. Pasquali R (2006) Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 54: 363-71
15. Zaadstra BM, Seidell JC, Van Noord PA *et al.* (1993) Fat and female fecundity: prospective study of body fat distribution on conception rates. *Br Med J* 306: 484-7
16. Franks S (2006) Genetic and environmental origins of obesity relevant to reproduction. *Reprod Biomed Online* 12: 526-31
17. Moran L, Teede H (2009) Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 15: 477-88
18. Ovalle F, Azziz R (2002) Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 77: 1095-105
19. Boomsma CM, Eijkmans MJ, Hughes EG *et al.* (2006) A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reprod Update*, 12: 673-83
20. Imani B, Marinus JC, Eijkmans MJ *et al.* (2002) A monogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligomenorrheic infertility. *Fertil Steril* 77: 91-7
21. van Wely M, Fauser BC, Laven JS *et al.* (2006) Validation of a prediction model for the follicle-stimulating hormone response dose in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86: 1710-15
22. Mulders AG, Eijkmans MJ, Imani B, Fauser BC (2003) Prediction of chances for success or complication in gonadotrophin ovulation induction in normogonadotropic anovulatory infertility. *Reprod Biomed Online* 7: 170-8
23. The Thessaloniki ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2008) Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Human Reprod* 23: 462-77
24. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM *et al.* (2006) Short-term meal replacements followed by dietary macronutrient restriction enhance weight loss in polycystic ovary syndrome. *J Clin Nutr* 84: 77-87
25. Norman RJ, Noakes M, Wu R *et al.* (2004) Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. *Human Reprod Update* 10: 267-80
26. Gesink Law DC, Maclehorse RF, Loncke MP (2007) Obesity and time to pregnancy. *Human Reprod* 22: 414-20
27. van der Steeg JW, Steures P, Eijkmans MJC *et al.* (2008) Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Human Reprod* 23: 324-8
28. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC (2008) Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril* 90: 714-26
29. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S (2007) Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. *Hum Reprod Update* 13: 433-44
30. Sneed ML, Uhler ML, Grotjan HE *et al.* (2008) Body mass index: impact on IVF less appears age-related. *Human Reprod* 23: 1835-9
31. Bellver J, Melo MA, Bosh E, Sera V *et al.* (2007) Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril* 88: 446-51
32. Hjollund NHI, Jensen TK, Bonde JPE *et al.* (1999) Is glycosylated haemoglobin a marker of fertility? A follow-up study of first pregnancy planners. *Human Reprod* 14: 1478-82
33. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2009) A prospective study of dietary carbohydrate quantity and quality in relation to risk of ovulatory infertility. *Eur J Clin Nutr* 63: 78-86
34. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2007) A prospective study of dairy foods intake and anovulatory infertility. *Human Reprod* 22: 1340-7
35. Kasim-Karakas SE, Amario RU, Gregory L *et al.* (2004) Metabolic and endocrine effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 615-20
36. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2007) Dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility. *Am J Clin Nutr* 85: 231-7
37. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM *et al.* (2003) Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 812-19
38. Stamets K, Taylor DS, Kunselman A *et al.* (2004) A randomized trial of the effects of two types of short-term hypocaloric diets on weight loss in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 630-7
39. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2008) Protein intake and ovulatory infertility. *Am J Obstet Gynecol* 198: 210-17
40. Westphal LM, Polan ML, Trant AS, Mooney SB (2004) A nutritional supplement for improving fertility in women: a pilot study. *J Reprod Med* 49: 289-93
41. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2006) Iron intake and risk of ovulatory infertility. *Obstet Gynecol* 108: 1145-52
42. Maconochie N, Doyle P, Prior S, Simmons R (2007) Risk factors for first trimester miscarriage—results from a UK-population-based case-control study. *BJOG* 114: 170-86
43. Goh YI, Ballano E, Einarson TR, Koren G (2006) Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynecol Can* 28: 680-9
44. Bagos PG (2009) Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 15: 19-26
45. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2008) Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of ovulatory infertility. *Fertil Steril* 89: 668-76
46. Pacchiarotti A, Mohamed MA, Micara G *et al.* (2007) The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 24: 459-62
47. Rumbold A, Middleton P, Crowther CA (2005) Vitamin supplementation for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* CD004073
48. Hasan R, Olshan AF, Herring AH *et al.* (2009) Self-reported vitamin supplementation in early pregnancy and risk of miscarriage. *J Epidemiol* 169: 1312-8
49. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB (2008) Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reprod Update* 14: 345-57
50. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC (2007) Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. *Obstet Gynecol* 110: 1050-8

N. Sermondade, C. Faure,
S. Herberg, S. Czernichow
et R. Lévy

Nutrition et fertilité : aspects masculins

Introduction

Une diminution de la qualité du sperme a été observée dès 1980, confirmée par les méta-analyses de Carlsen et de Swan, puis pondérée par la prise en compte de différents facteurs méthodologiques (standardisation des techniques, délai d'abstinence, etc.) et environnementaux (géographie, saison, génétique, ethnie, tabac et toxiques, etc.) (1). Parallèlement, le pourcentage d'adultes, mais aussi d'enfants, en surpoids ou obèses, croît de façon importante. Selon les données de l'ENNS, 57 % des hommes et 41 % des femmes étaient en surpoids ou obèses (index de masse corporelle $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) avec une prévalence de l'obésité (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) de 17 % (2). Ces valeurs sont amplifiées par l'étude MONA LISA (Monitoring national du risque artériel, 2005-2007) qui retrouve 67 % d'hommes de 35-74 ans en surpoids, dont 20,6 % obèses (3). De fait, plus d'un homme sur deux (54 %) en âge de procréer (35-44 ans) apparaît en surpoids ou obèse. Quant au pourcentage d'enfants en surpoids ou obèses, il atteignait 3 % en 1965, 16 % en 2000 et approche actuellement 20 %.

Empreinte nutritionnelle

Les origines développementales des maladies de l'adulte (*Developmental Origins of Human Adult Diseases* ou DOHAD) ont été mises en évidence par les effets à long terme de la malnutrition maternelle durant la période fœtale sur la descendance, incluant des effets sur la fertilité. Il a été récemment montré que les conditions nutritionnelles et l'environnement maternel durant la période préconceptionnelle jouent aussi un rôle majeur dans la programmation de la susceptibilité de la descendance à des maladies métaboliques. Cette « empreinte nutritionnelle » conditionne la programmation du fœtus, ainsi que sa réponse adaptative prédictive à son environnement qui se manifesterait ultérieurement par la survenue de pathologies (4). La manipulation/maturation des gamètes et la culture de l'embryon préimplantatoire *in vitro*, dans le cadre

des techniques d'assistance médicale à la procréation, pourraient constituer un stress précoce supplémentaire, à l'origine de futurs problèmes de santé (5).

En ce qui concerne la fertilité masculine, l'empreinte nutritionnelle modifierait le nombre et/ou la fonction des cellules de Sertoli, conditionnant ainsi la production spermatique future.

La littérature illustre de différentes façons cette hypothèse. Une ration alimentaire maternelle réduite se traduit, chez l'agneau nouveau-né, par une diminution du nombre de cellules de Sertoli (6). La cohorte danoise de Ramlau-Hansen (7) retrouve une tendance à une corrélation négative entre le poids de la mère avant grossesse et la qualité du sperme chez les fils à l'âge adulte. La consommation régulière de viande de bœuf par la mère, pendant la grossesse, (> 7 repas/semaine) est associée à une moindre concentration spermatique chez le fils adulte : 68,3 M/mL *versus* 85,0 M/mL (8). L'hypothèse d'une imprégnation hormonale de la viande consommée a été retenue par les auteurs. Par ailleurs, une déficience en vitamine B12 pendant la grossesse affecte la spermatogenèse du rat pendant la période embryonnaire et se traduit, chez l'adulte, par des anomalies spermatiques réversibles (9). Or, plus d'un tiers des hommes de couples infertiles présente une déficience en cobalamine : parmi eux, 39 % des hommes ont une anomalie spermatique (10). Enfin, les IMC extrêmes de l'adolescent (sous-poids ou obèses) semblent associés à un mauvais pronostic en termes de nombre d'enfants à l'âge adulte et de vie de couple (*the US National Longitudinal Survey of Youth*) (11).

Poids et indice de masse corporelle

La relation entre poids (et/ou indice de masse corporelle ou IMC) et fertilité a fait l'objet de nombreuses études chez la femme, mais a longtemps été négligée chez l'homme. Deux publications mentionnent l'impact négatif d'un IMC < 20 ou < 18,5 kg/m^2 sur la concentration spermatique (12, 13). Les conséquences d'un IMC élevé sur la

fertilité masculine et/ou la concentration spermatique ont fait l'objet en 2008 d'une revue critique de la littérature (14).

Trois études épidémiologiques de grande envergure se sont intéressées au lien entre l'IMC et la fertilité masculine. Sallmen *et al.*, en étudiant 1 329 couples américains, ont ainsi retrouvé un lien entre surpoids et infertilité (OR = 1,12 ; IC95 % = 1,01-1,25) avec un plateau pour les IMC supérieurs à 32 (15). Sur 49 957 couples danois avec naissance vivante, Ramlau-Hansen *et al.* ont également mis en évidence une augmentation de l'hypofertilité pour les hommes en surpoids (OR = 1,15 ; IC95 % = 1,09-1,22) et pour les hommes obèses (OR = 1,49 ; IC95 % = 1,34-1,64) (7). Nguyen *et al.* ont confirmé ces résultats chez 26 303 couples norvégiens avec grossesse (OR = 1,20 ; IC95 % = 1,04-1,38 pour les hommes en surpoids et OR = 1,36 ; IC95 % = 1,13-1,63 pour les hommes obèses), avec un plateau au-delà d'un IMC à 35 (16). Au total, ces trois publications, non dépourvues de biais, retrouvent donc une relation dose-effet entre l'IMC et l'hypofertilité masculine, ainsi qu'un effet plateau au-delà d'un IMC de 35 kg/m².

Les études portant sur les couples infertiles indiquent également une relation entre poids et/ou IMC et fertilité. Ainsi, chez 72 couples, l'incidence de l'obésité masculine serait trois fois plus élevée lorsqu'il existe un facteur masculin d'infertilité (17). Le poids des hommes infertiles présentant une oligozoospermie est significativement plus élevé que celui des hommes fertiles à sperme normal dans une étude concernant 80 couples (18). L'interaction entre obésité et fertilité masculine semble être régulée par la leptine, hormone peptidique produite et sécrétée par le tissu adipeux (18).

Des études récentes ont analysé les paramètres spermatiques en fonction de l'IMC (tableau I). Bien que les populations étudiées soient peu comparables et les effectifs souvent réduits, la plupart observent une altération des paramètres spermatiques associée à l'IMC, avec souvent un plateau observé pour des IMC élevés (> 30 kg/m²) ou très élevés (35 kg/m²) : diminution de la concentration ou de la numération totale en spermatozoïdes (12, 17, 19, 20), diminution du nombre de spermatozoïdes mobiles (20-22), augmentation des formes atypiques de spermatozoïdes, voire augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (19, 22). À l'inverse, pour d'autres auteurs, il n'existe aucune relation entre poids et paramètres spermatiques ou infertilité (23).

Différentes hypothèses physiopathologiques ont été émises afin d'expliquer le lien entre obésité et infertilité masculine. La première hypothèse est une atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence une diminution significative de la testostérone totale et libre et de la *sex hormone binding globulin* (SHBG) chez les hommes obèses, associée à une diminution de l'amplitude des pulses de *luteinizing hormone* (LH), et à une diminution de la production de *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) par l'augmentation des endorphines. De plus, un hypogonadisme hypogonadotrope hyperestrogénique est observé chez l'homme obèse par aromatisation des stéroïdes en estrogènes dans les tissus périphériques. Certains auteurs ont également suggéré que l'obésité pourrait avoir un rôle direct dans l'altération de la spermatogenèse et de la fonction sertolienne (24). L'observation d'une diminution des niveaux d'inhibine B plus sévère que la diminution de la *follicle stimulating hormone* (FSH) conforterait l'hypothèse d'une

Tableau I – Principales publications évaluant les relations entre poids et/ou IMC et paramètres spermatiques.

	Population étudiée	N	Résultats
Jensen, 2004 (12)	Hommes sains	1558	Diminution concentration et numération totale si IMC > 25 ou < 20
Fejes, 2005 (20)	Hommes de couples infertiles	81	Corrélation négative numération totale et mobilité avec poids, TT, TH
Magnusdottir, 2005 (17)	Hommes de couples infertiles	72	Corrélation négative concentration et IMC dans population subfertile idiopathique ou facteur féminin Plus de 3 fois plus obésité dans population subfertile avec facteur masculin
Kort, 2006 (22)	Hommes de couples infertiles	520	Diminution nombre de spz mobiles et augmentation fragmentation ADN si surpoids ou obésité
Hammoud, 2008 (21)	Hommes de couples infertiles	526	Plus d'OAT si surpoids ou obésité RR OAT = 3,3 si obésité
Chavarro, 2009 (19)	Hommes de couples infertiles	483	Diminution numération totale et augmentation fragmentation ADN si IMC > 35
Qin, 2007 (13)	Hommes fertiles	990	Diminution concentration, numération totale et formes typiques si IMC < 18
Aggerholm, 2008 (23)	Fertiles + infertiles	2139	Pas de lien sperme et IMC (concentration, numération totale, mobilité)

IMC : index de masse corporelle ; TT : tour de taille ; TH : tour de hanche ; OAT : oligoasthénotératospermie.

atteinte testiculaire initiale. La troisième hypothèse implique l'augmentation de la température scrotale, par accumulation de graisse au niveau des hanches et de l'abdomen, qui entraînerait des perturbations de la spermatogenèse. L'accumulation préférentielle, dans les tissus graisseux, de substances toxiques et de perturbateurs endocriniens liposolubles majorerait, en outre, ces perturbations comme l'indiquent les niveaux sériques d'organochlorines corrélés à l'IMC et à l'infertilité (17). Enfin, la présence de dysfonction érectile et éjaculatoire chez les hommes obèses est une hypothèse controversée. Certains auteurs retrouvent une diminution de la qualité de vie sexuelle chez les hommes obèses avec une diminution de la fréquence des rapports et un risque augmenté de dysfonction érectile. Ces données ne sont pas confirmées par d'autres auteurs, qui ne mettent pas en évidence de diminution de la fréquence des rapports (21), ou suggèrent que la diminution de la fonction érectile est liée à l'augmentation des facteurs de risque vasculaires, plus qu'à l'obésité elle-même.

Syndrome métabolique

La Fédération internationale du diabète estime que le syndrome métabolique (SM) atteint environ 25 % des adultes dans le monde. Elle a proposé récemment une nouvelle définition dite de « consensus » (2005) selon laquelle un homme a un syndrome métabolique s'il présente une obésité abdominale (considérée comme un pré-requis et définie, dans la population caucasienne, par un tour de taille ≥ 94 cm chez l'homme) et, en plus, au moins deux autres facteurs de risque parmi : a) une élévation des concentrations de triglycérides à jeun $\geq 1,50$ g/L (1,7 mmol/L) ; b) une diminution du taux de cholestérol HDL $< 0,4$ g/L (0,9 mmol/L) chez l'homme ; c) une augmentation de la pression artérielle (TAS ≥ 130 ou TAD ≥ 85 mmHg) ; et d) une élévation de la glycémie à jeun ≥ 1 g/L (5,6 mmol/L). Il s'agit d'une définition dont les seuils sont plus drastiques que ceux retenus par la classification nord-américaine Adult Treatment Panel III (ATP III). Les liens entre SM et fertilité masculine ont fait l'objet d'une revue récente (25). Ces troubles métaboliques sont de plus associés à des complications sévères, en particulier de type maladies cardio-vasculaires et cancers, pouvant par elles-mêmes avoir un impact négatif sur la fertilité.

Hypertension artérielle

Les liens entre hypertension artérielle (HTA) et paramètres spermatiques ou fertilité sont très

mal connus. En revanche, de nombreuses publications associent HTA et hypogonadisme et mettent en évidence une relation inverse entre tension artérielle et testostérone totale ou testostérone libre ou SHBG. Cette relation est mal comprise, certains auteurs suggérant que l'hypogonadisme serait une cause plutôt qu'une conséquence de l'HTA.

Dyslipidémie

Peu de publications suggèrent un lien entre les troubles du métabolisme lipidique et la fertilité. Il existe une altération des paramètres spermatiques chez les hommes dyslipidémiques, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des anomalies lipidiques dans le sous-groupe des patients présentant une azoospermie chez les hommes infertiles (26). De plus, dans une série de 106 couples infertiles, 65 % des hommes seraient atteints de dyslipidémie, sans corrélation aux paramètres spermatiques (27). L'hypothèse physiopathologique la plus probable implique le stress oxydatif induit par l'hypercholestérolémie au niveau des voies génitales et des testicules.

Diabète de type 2

D'anciennes études rapportent une altération des paramètres spermatiques en cas de diabète, notamment une diminution de mobilité et de volume. Récemment, un lien entre diabète de type 2 et infertilité a également pu être objectivé dans la population Qatari (28). Une littérature abondante vient illustrer le lien entre l'hypogonadisme et l'insulinorésistance. Selon certaines études épidémiologiques, l'hypogonadisme constitue un facteur de risque pour le diabète de type 2 ; inversement une fréquence accrue de l'hypogonadisme est aussi retrouvée en cas de diabète de type 2. Le traitement par la testostérone semble d'ailleurs être bénéfique sur le contrôle glycémique mais inhibe la spermatogenèse, limitant ainsi ses indications. Les hypothèses physiopathologiques suggérées impliquent des anomalies de la microvascularisation testiculaire, ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, liée à l'accumulation de produits terminaux de glycation avancée dans les voies génitales masculines entraînant stress oxydatif et dommages cellulaires subséquents. Enfin, de nombreux auteurs soulignent le lien entre diabète et dysfonctions érectile et éjaculatoire (29). Ces dysfonctions d'origine vasculaire et neurologique participeraient à la diminution de la fertilité chez les hommes diabétiques.

Alcool

Les effets de l'alcool sur la fertilité masculine restent controversés. Bien que certaines publications ne retrouvent pas de différence significative portant sur les paramètres spermatiques entre les hommes consommateurs ou non consommateurs d'alcool, la plupart des études suggèrent que l'intoxication alcoolique chronique affecterait la fertilité masculine, avec une altération des paramètres spermatiques tels que diminution du volume de sperme, diminution de la concentration spermatique, diminution de la mobilité et/ou altération de la morphologie spermatique. L'impact sur les paramètres spermatiques apparaît indépendant de l'état nutritionnel ou d'une éventuelle maladie hépatique associée. Quelques cas d'azoospermie réversible après sevrage alcoolique ont été rapportés (30). Histologiquement, l'arrêt de maturation est l'aspect le plus fréquemment observé chez les consommateurs d'alcool, suivi du *Sertoli cell only syndrome* (SCOS). Les facteurs impliqués dans la détérioration des paramètres spermatiques au cours de l'intoxication alcoolique chronique massive sont mal connus. L'alcool interférerait avec la fonction des trois niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. La majorité des auteurs insistent surtout sur l'hypogonadisme hypergonadotrope lié à une atteinte toxique directe des cellules de Leydig et de Sertoli, par l'éthanol lui-même ou par ses produits de dégradation. Des facteurs de prédisposition génétique pourraient expliquer les grandes variations interindividuelles observées et l'hétérogénéité des conséquences de l'intoxication sur les paramètres spermatiques. Enfin, certains effets de l'alcool, tels que baisse de la libido, gynécomastie, atrophie testiculaire, baisse de la testostérone ou augmentation des estrogènes sont bien connus et participeraient à la diminution de la fertilité masculine en cas d'intoxication alcoolique chronique massive.

Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres, ou espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Les spermatozoïdes sont concernés par le « paradoxe de l'oxygène » (pour revue voir (31)). En effet, un faible niveau d'ERO est nécessaire pour que le spermatozoïde acquière son pouvoir fécondant et les radicaux libres sont aussi impliqués dans l'interaction gamétique. Cependant, en cas de déséquilibre entre pro- et antioxydants, les lésions de peroxydation qui en résultent altèrent le pouvoir

fécondant des spermatozoïdes, avec notamment une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. Les ERO ont aussi un effet délétère sur l'ADN du spermatozoïde, ce qui peut avoir, en l'absence de correction, un impact négatif après la fécondation.

Métaux

Zinc

Le zinc est présent principalement dans les huîtres, les céréales complètes, le fromage et le chocolat. Il s'agit d'une métalloprotéine, cofacteur pour les protéines de liaison à l'ADN (protéines en doigt de zinc) et pour de nombreuses métalloenzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN. Le zinc a aussi des propriétés anti-apoptotiques. Le zinc, oligoélément essentiel pour la spermatogenèse, est sécrété par la prostate. Sa concentration dans le plasma séminal est plus élevée que dans les autres tissus. Le zinc exerce un rôle important dans le développement testiculaire et conditionne certaines caractéristiques des spermatozoïdes (concentration, mobilité et vitalité) ainsi que leurs fonctions (réaction acrosomique, décondensation de la chromatine). Il a un effet protecteur (antioxydant-like) contre les anions superoxydes. La concentration séminale en zinc influence la qualité du sperme (concentration, mobilité) chez les hommes fertiles et infertiles ; elle serait plus faible chez les hommes infertiles. La carence en zinc est associée à un hypogonadisme. L'insuffisance d'apport en zinc réduit les défenses antioxydantes, compromettant le mécanisme de réparation de l'ADN. À l'inverse, de fortes concentrations en zinc libre dans le plasma séminal sont associées à une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. De nombreuses études rapportent un effet bénéfique de la supplémentation en zinc dans le traitement d'hommes infertiles : augmentation du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes et amélioration de l'intégrité membranaire.

Cuivre

Les aliments riches en cuivre sont les crustacés, le foie et les légumes secs. Le cuivre intervient dans de nombreux processus métaboliques, surtout en sa qualité de cofacteur enzymatique. Il protège les spermatozoïdes de la peroxydation car il intervient comme antioxydant dans l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). La concentration séminale en cuivre est corrélée positivement à la numération des spermatozoïdes, leur mobilité et leur morphologie. Elle est également corrélée à une

concentration élevée en SOD et à une meilleure qualité du sperme. Chez l'animal, une carence expérimentale en cuivre induit une diminution du volume de l'éjaculat, de la concentration en spermatozoïdes et de leur mobilité avec une diminution de la testostéronémie et une hypospermatogénèse. La carence en cuivre est également associée à une diminution de la libido. À l'inverse, un niveau très élevé en cuivre peut être délétère, induisant une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. La concentration en cuivre est plus élevée dans le plasma séminal d'hommes infertiles et, sous sa forme ionique Cu^{2+} , le cuivre serait toxique pour les spermatozoïdes. Quelques études de supplémentation en cuivre dans l'alimentation retrouvent une amélioration de la qualité du sperme.

Sélénium

Le sélénium se trouve essentiellement dans les viandes, les poissons ainsi que dans l'ail et le poivre. Le sélénium a un rôle essentiel dans l'organisme, notamment parce qu'il entre dans la composition des sélénoenzymes. Il est présent dans les testicules des mammifères en concentration élevée et joue un rôle important dans la spermiogénèse. Plusieurs études ont montré une relation entre le contenu en glutathion peroxydase (GPX4, sélénoenzyme) dans les spermatozoïdes humains et les paramètres spermatiques, et un contenu abaissé en GPX4 a été observé chez les patients infertiles. Chez l'homme, une carence en sélénium serait à l'origine d'infertilité et de perturbations de la fonction testiculaire. Sont ainsi observés un retard de croissance des testicules avec diminution de leur poids, un hypogonadisme ainsi qu'une altération de la morphologie et de la mobilité des spermatozoïdes par cassure du flagelle. La supplémentation en sélénium améliore la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes, diminue leur peroxydation et aurait un impact positif sur la fertilité.

Fer

Le fer existe sous deux formes : le fer héminique, majoritaire dans l'organisme, et le fer non héminique, pour les réserves et le transport. Le fer héminique, le plus biodisponible, se trouve dans les viandes et les poissons alors que le fer non héminique est majoritairement présent dans les céréales, les fruits et les légumes secs. Il existe peu de données sur le rôle du fer dans la fonction de reproduction chez l'homme. La concentration en fer serait plus élevée dans le plasma séminal d'hommes infertiles. À l'inverse, il existerait une corrélation positive entre le fer séminal et la concentration en spermatozoïdes.

Plomb

Le plomb contamine principalement les fruits de mer, l'eau et l'alcool. Certaines pollutions environnementales au plomb (émission de plomb par les automobiles ou les industries) ou empoisonnement (peintures ou canalisations) peuvent avoir un effet toxique sur le système reproducteur et la libido. La toxicité du plomb sur les testicules et la spermatogénèse est reconnue avec une diminution dose-dépendante de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes. Cette toxicité est observée uniquement à de très fortes doses et sur une longue durée. En revanche, il n'a été observé aucun changement de la qualité du sperme après une exposition prolongée à des doses « physiologiques » de pollution au plomb.

Cadmium

L'exposition au cadmium entraîne des effets néfastes sur le système reproducteur. Le cadmium séminal peut être augmenté par la cigarette, la pollution industrielle et par l'alimentation (champignons, mollusques). Plusieurs publications rapportent une corrélation négative dose-dépendante entre la concentration de cadmium, dans le sang ou le sperme, et la qualité du sperme. L'administration d'une dose élevée de cadmium chez des souris mâles induit une nécrose des tubules séminifères, avec une diminution de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes.

Molybdène

Le molybdène est un contaminant présent dans les légumes et les végétaux à feuilles, l'eau de boisson et de nombreux compléments alimentaires. Il agit comme antagoniste du cuivre : une concentration élevée de molybdène entraîne une carence en cuivre, et par conséquent une diminution du volume de l'éjaculat, de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes. Le molybdène a également un effet toxique sur les tubules séminifères dans différents modèles animaux.

Minéraux

Calcium

Le calcium est présent dans plusieurs aliments de consommation courante : produits laitiers (source principale), mais également eau de boisson,

amandes, persil, figues, cresson, cacao, graines de sésame et épinards. La concentration en calcium est plus élevée dans le plasma séminal que dans le sang. Afin de réguler le calcium intracellulaire, la membrane plasmique des spermatozoïdes contient de nombreux canaux calciques membranaires ainsi que des pompes antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Le calcium et les ions Ca^{2+} ont un rôle majeur dans la reproduction : ils conditionnent la mobilité des spermatozoïdes, interviennent dans la capacitation et la réaction acrosomique. La littérature fait état d'une association entre une faible concentration de calcium (et plus précisément ions Ca^{2+}) et l'infertilité. Par ailleurs, l'exposition *in vitro* du sperme à de faibles concentrations en calcium augmente sa capacité fécondante. Enfin, le calcium protège contre les effets néfastes du cadmium.

Magnésium

Les principales sources de magnésium sont l'eau, les céréales, la farine et les coquillages. Bien que le magnésium soit impliqué dans un grand nombre d'activités enzymatiques essentielles, son rôle dans la spermatogenèse n'est pas encore totalement élucidé. Le magnésium est présent à une concentration élevée dans la prostate et sa concentration séminale est 4 à 5 fois plus élevée que dans le sang. L'impact de la concentration séminale en magnésium sur la fertilité masculine demeure controversé. Chez le rat, une carence en magnésium conduit à des altérations morphologiques des spermatides ainsi qu'à une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires. Enfin, il existerait une relation significative entre une faible concentration en magnésium dans le plasma séminal et une éjaculation précoce. Le magnésium est le supplément alimentaire le plus populaire. Cependant, une seule étude de supplémentation en magnésium a été réalisée chez des hommes infertiles : les auteurs n'observent aucune différence au niveau des paramètres spermatiques entre les groupes contrôle et placebo, mais les concentrations en magnésium dans le sperme de ces patients étaient déjà élevées avant le traitement.

Acides gras polyinsaturés

Les acides gras composent plus de 30 % de notre prise alimentaire journalière. Parmi eux, les acides gras polyinsaturés (AGPI) se caractérisent par la présence de doubles liaisons dans leur structure et sont classés en trois sous-groupes selon la position de la 1^{re} double liaison : oméga 3 ($\omega 3$), oméga 6 ($\omega 6$) et oméga 9 ($\omega 9$). Les mammifères sont incapables

de synthétiser les $\omega 3$ et $\omega 6$ car ils ne possèdent pas l'enzyme désaturase appropriée. Les $\omega 3$ (majoritairement acide α -linoléique) et les $\omega 6$ (majoritairement acide linoléique) essentiels doivent être apportés par l'alimentation, car ils sont indispensables à de nombreux processus biologiques, dont la reproduction. Les $\omega 3$ essentiels sont apportés par les graines et huiles de lin, soja et chanvre. Ses dérivés peuvent aussi être directement apportés par les poissons gras comme le saumon, les sardines ou le thon blanc. Les $\omega 6$ se trouvent dans les graines et huiles végétales (maïs, noix, tournesol, carthame, colza, pépin de raisins, etc.).

La place des AGPI dans la reproduction chez l'homme a fait l'objet d'une revue récente (32). Les $\omega 6$, et principalement l'acide arachidonique, sont impliqués dans la stéroïdogenèse. Il existe une influence directe de la composition alimentaire en AG sur la composition en AG de la membrane des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes humains sont riches en AGPI, incorporés préférentiellement aux AGS, au niveau des phospholipides membranaires. La membrane plasmique du spermatozoïde humain contient ainsi une concentration élevée en AGPI ($\omega 3$, acide docosahexanoïque en majorité) qui lui confère la fluidité nécessaire aux différentes phases de la fécondation, notamment la réaction acrosomique et la fusion gamétique (32). Mais les AGPI sont vulnérables à l'attaque des espèces réactives de l'oxygène (ERO), déclenchant la cascade de peroxydation lipidique qui peut compromettre l'intégrité membranaire et nucléaire des cellules. Une production accrue d'ERO, dose-dépendante de la quantité d'AGPI dans le spermatozoïde, est susceptible d'altérer sa capacité fécondante.

De plus, une corrélation positive a été établie entre la consommation d' $\omega 3$ et certains paramètres spermatiques (concentration et mobilité). Ainsi, les taux séminaux d'AGPI sont significativement inférieurs en cas d'asthénospermie, avec notamment une diminution du rapport $\omega 3/\omega 6$ et de la concentration en acide docosahexanoïque. Ces différences semblent liées à un trouble du métabolisme des AG, et pas à une carence alimentaire, puisque les taux plasmatiques sont comparables quels que soient les paramètres spermatiques. Une carence en AGPI $\omega 3$ est souvent observée en cas d'infertilité masculine (33). À l'inverse, un excès de consommation d'AGPI peut déclencher des mécanismes d'oxydoréduction excessifs néfastes pour la fertilité (34), en particulier chez des hommes infertiles disposant d'une faible capacité antioxydante. Le rapport $\omega 6/\omega 3$ recommandé est de 5 (contre 11 dans l'alimentation occidentale). Une supplémentation en $\omega 3$ a un effet bénéfique sur la qualité du sperme, en particulier sur sa mobilité ; à l'inverse il faut veiller à éviter un apport trop élevé en $\omega 6$ chez l'homme infertile.

Vitamines

Vitamine A (rétinol)

La forme active est le rétinol, ou acide rétinoïque, présent dans les graisses animales (beurre et œufs) et dans le foie où il est stocké. L'alimentation est également riche en précurseurs de vitamine A, comme le β -carotène, la lutéine ou le lycopène, que l'on trouve majoritairement dans les carottes, les abricots, le persil et les tomates. La carence sévère en vitamine A reste rare dans les pays industrialisés où l'alimentation est équilibrée. Un apport insuffisant peut cependant être constaté chez certaines personnes en cas de régime avec diminution des apports en graisses animales. Il existe une forte implication de la vitamine A (rétinol) et de son principal dérivé biologiquement actif, l'acide rétinoïque, dans la régulation de la fonction testiculaire chez le rongeur et dans la fertilité masculine. Plusieurs études ont ainsi noté une concentration plus faible en vitamine A dans le plasma séminale d'hommes infertiles avec oligozoospermie sévère. La vitamine A intervient dans la différenciation du tractus génital mâle, de la prostate et des vésicules séminales. Elle induit la production de testostérone, joue un rôle indispensable dans le maintien des jonctions serrées dans les cellules de Sertoli, et régule les principales étapes de la spermatogenèse (35). D'autre part, une carence en vitamine A entraîne une diminution de l'activité des activateurs de l'acrosine et du plasminogène, enzymes protéolytiques essentielles à l'induction de la réaction acrosomique. Cette diminution est réversible après supplémentation en vitamine A.

Dans un modèle souris knock out, une carence en vitamine A induite se manifeste par un tableau progressif de blocage de la spermatogenèse avec arrêt de la différenciation des spermatogonies. Ces effets sont réversibles puisqu'une administration systémique d'acide rétinoïque peut restaurer la spermatogenèse. À l'inverse, une hypervitaminose A peut être observée lors de la prise de suppléments vitaminiques ou lors d'un traitement par rétinoïdes de synthèse (hyperrétinoïdémie thérapeutique dans le traitement de certains cancers, de l'acné ou du psoriasis). L'excès de vitamine A induit des atteintes testiculaires et perturbe la spermatogenèse. À très fortes doses, on observe un arrêt complet de la spermatogenèse. La vitamine A est donc indispensable à la fertilité masculine, mais peut s'avérer néfaste à fortes doses. Il est donc nécessaire de respecter les apports nutritionnels conseillés (ANC) (homme adulte : 800 μ g ER/j).

Vitamines du groupe B

Vitamine B9 (folates)

Les folates sont apportés par l'alimentation, en consommant des légumes verts, des fruits, des fromages affinés, des laitages ou du foie. Éléments clés de la synthèse nucléotique et puissants antioxydants, les folates sont aussi impliqués dans la méthylation de l'ADN et le processus d'empreinte, en permettant la reméthylation de l'homocystéine et méthionine. Les vitamines B12 (cobalamine) et B6 (pyridoxine) sont des cofacteurs également impliqués dans le cycle de la méthionine (voir la figure 1 dans « Nutrition et fertilité : aspects féminins » de I. Cédricin *et al.*).

La méthyltétrahydrofolate-réductase (MTHFR) permet la conversion de la vitamine B9 en sa forme active, le 5-méthyltétrahydrofolate. Or, le polymorphisme C677T de la MTHFR, fréquent chez les Caucasiens (40 % d'hétérozygotes et 10 % d'homozygotes), augmente la thermolabilité et diminue l'activité spécifique de l'enzyme. La recherche de corrélation entre les différents polymorphismes du gène *MTHFR* et l'infertilité masculine fournit des données contradictoires, probablement liées à l'hétérogénéité des populations étudiées et de leur statut nutritionnel, ainsi qu'à l'interférence d'autres polymorphismes (36).

Une carence en l'une des vitamines du groupe B conduit à une hyperhomocystéinémie, aboutissant à de sévères dysfonctions cellulaires touchant l'expression des gènes, les fonctions protidiques et lipidiques, la croissance cellulaire et la fragmentation de l'ADN, menant à l'apoptose (37). Il existe une corrélation entre la concentration séminale en folates, la concentration sanguine et la numération des spermatozoïdes. L'apport en folates a un rôle essentiel dans la spermatogenèse. Une faible concentration séminale en folates est ainsi associée à des altérations de l'ADN des spermatozoïdes chez des hommes infertiles (38). De même, une relation inverse entre l'apport alimentaire en folates et l'aneuploïdie spermatique a récemment été mise en évidence (39). Des études de supplémentation montrent un effet bénéfique de l'acide folique sur la qualité du sperme chez des hommes infertiles (40).

Vitamine B12 (cobalamine)

La vitamine B12 se trouve dans les produits carnés et les produits laitiers. La carence est rare, souvent due à un déficit du facteur intrinsèque gastrique. La vitamine B12 intervient dans la reméthylation folate-dépendante de l'homocystéine en tant que

cofacteur de la méthionine synthase, mais elle influence également la maturation des spermatozoïdes. La carence en vitamine B12 provoque une hyperhomocystéinémie altérant la fonction de reproduction. La concentration séminale en cobalamine est directement corrélée à sa concentration sérique. Chez l'animal, la carence en vitamine B12 *in utero* est associée à une diminution du nombre de spermatogonies (9). Plus d'un tiers des hommes de couples infertiles présentent une carence en cobalamine (10) et plusieurs études retrouvent une corrélation positive entre le taux de cobalamine dans le plasma séminal et la concentration en spermatozoïdes (38). Il semble exister un effet positif d'une supplémentation en cobalamine chez des hommes subfertiles.

Vitamine B6 (pyridoxine)

On trouve de la vitamine B6 dans les produits carnés, les œufs et les choux. La pyridoxine passe difficilement la barrière hémato-testiculaire ou est rapidement dégradée dans le plasma séminal. Peu d'études ont analysé le rôle de la vitamine B6, en particulier sa carence, sur la fertilité. Il semble exister un effet négatif d'un excès de pyridoxine sur la fertilité masculine. En effet, chez l'animal, de fortes doses de pyridoxine altèrent la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes, diminuent leur nombre, entraînent une réduction du poids des testicules et de l'épididyme, ainsi qu'une dégénérescence de l'épithélium germinal.

Vitamine C (acide ascorbique)

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, présente dans les fruits et légumes, mais aussi dans les abats. Les ANC sont de 80 mg par jour. La vitamine C, facilement oxydable, est un antioxydant majeur pour les spermatozoïdes. Elle est retrouvée à un niveau élevé dans le fluide épидидymaire et le plasma séminal, en concentration 8 à 10 fois plus élevée que dans le plasma sanguin. Cette concentration séminale élevée protège les spermatozoïdes des ERO en évitant les lésions de leur ADN. La vitamine C a été largement utilisée afin d'optimiser la fertilité des animaux d'élevage. Chez l'animal, de faibles niveaux d'acide ascorbique sont associés à des performances reproductives réduites et à une dégénérescence de l'épithélium testiculaire germinal. À l'inverse, une supplémentation en vitamine C a un effet positif sur la croissance des gonades et la fonction des spermatozoïdes. Chez l'homme, une carence, ou une faible concentration en acide ascorbique, est associée à une diminution du nombre de

spermatozoïdes et de leur mobilité, une augmentation des formes atypiques et la présence d'agglutinats dans l'éjaculat. Un faible niveau de vitamine C séminale est associé à une diminution de son action antioxydante augmentant la peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes. De nombreuses études de supplémentation montrent un effet positif de l'acide ascorbique sur la qualité du sperme : augmentation du nombre de spermatozoïdes, amélioration de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. La supplémentation en vitamine C serait aussi efficace chez les fumeurs. Cet effet bénéfique est essentiellement lié à la réduction des radicaux libres et à la diminution des altérations endogènes de l'ADN des spermatozoïdes.

Vitamine D

Les aliments les plus riches en vitamine D sont les aliments gras d'origine animale : huile de foie de morue, poissons gras (saumon, sardine, etc.), jaune d'œuf et les matières grasses animales. Il existe également une synthèse endogène épidermique sous l'action des UV. Chez l'homme adulte, l'ANC en vitamine D est de 5 µg/j soit 200 UI/j. Les variations du statut en vitamine D sont associées aux variations saisonnières (luminosité) qui ont un impact reconnu sur la reproduction dans différentes espèces. Plusieurs études ont montré le rôle de la vitamine D dans la fertilité chez l'homme et chez l'animal. Chez le rat, la carence expérimentale en vitamine D est associée à une diminution massive de la fertilité avec une spermatogenèse incomplète et des anomalies du développement. Chez la souris, la mutation du récepteur de la vitamine D entraîne une insuffisance gonadique et une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes. La vitamine D a un rôle indirect sur la fertilité masculine, en régulant le taux de calcium dans les tissus reproducteurs, en particulier le testicule. Des récepteurs à la vitamine D ont été identifiés sur les cellules de Sertoli (contrôle de l'homéostasie du cholestérol cellulaire) et sur les spermatozoïdes, principalement au niveau de la pièce intermédiaire (contrôle des mouvements de calcium). La vitamine D et ses récepteurs semblent jouer un rôle important dans la survie du spermatozoïde et l'acquisition de son pouvoir fécondant (41).

Vitamine E (tocophérol)

La vitamine E se trouve principalement dans les huiles végétales, les graines de plantes et les margines. Antioxydant majeur, elle inactive les ERO,

mais interagit aussi directement avec les composants des membranes. Elle est traditionnellement appelée vitamine « anti-stérilité ». Une faible concentration en vitamine E dans le sperme se traduit par l'altération de l'ADN des spermatozoïdes. Chez l'animal, la carence en vitamine E entraîne une dégénérescence testiculaire avec déplétion en cellules germinales. À l'inverse, l'excès de vitamine E dans l'alimentation conduit à l'augmentation de la concentration d' α -tocophérol dans le sperme qui, à son tour, a une influence négative sur les paramètres spermatiques : diminution du nombre total de spermatozoïdes et augmentation du nombre de spermatozoïdes atypiques. L'injection sous-cutanée de fortes doses de vitamine E induit une diminution du poids des testicules et perturbe la spermatogenèse chez le rongeur. De nombreuses études chez l'animal et chez l'homme infertile rapportent un effet bénéfique de la supplémentation en vitamine E sur la qualité du sperme : diminution des marqueurs de la peroxydation des lipides et amélioration de tous les paramètres spermatiques.

Régimes

Trois études récentes ont établi un lien entre alimentation et qualité du sperme. En Espagne, Mendiola *et al.* ont utilisé des questionnaires pour évaluer les habitudes alimentaires de 61 patients suivis pour infertilité : les hommes ayant des paramètres spermatiques normaux consommaient plus de coquillages, tomates, laitues alors que les hommes avec des paramètres spermatiques très altérés consommaient plutôt des produits carnés et des pommes de terre (42). En Hollande, Vujkovic *et al.* retrouvent une association entre alimentation et qualité du sperme chez des patients suivis en ICSI : le régime réfléchi (fruits, légumes, poissons) était inversement corrélé au taux d'homocystéine dans le sang et le plasma séminal, positivement corrélé à la vitamine B6 plasmatique, avec un impact sur la qualité de l'ADN. Le régime traditionnel hollandais à base de viandes et pommes de terre, était positivement corrélé aux folates érythrocytaires et à la concentration spermatique (43). Enfin, Chavarro *et al.* observent chez l'homme une corrélation négative entre la consommation de soja et isoflavones et la concentration spermatique (44). L'étude fait le bilan de la prise d'une quinzaine de produits à base de soja pendant trois mois par 99 patients suivis pour infertilité. Les hommes dont l'alimentation était la plus riche en soja présentaient une concentration spermatique significativement inférieure par rapport à ceux qui n'en avaient pas mangé (72 M/mL *versus* 106 M/mL).

Toutefois, il faut préciser que cet effet délétère, controversé, s'exerce surtout pour les sujets en surpoids et obèses, et pour les concentrations très élevées en spermatozoïdes.

Supplémentation

De nombreux nutriments (vitamines, minéraux, métaux ou AGPI) sont donc impliqués dans la fonction de reproduction masculine. Ces nutriments agissent seuls, mais le plus souvent de manière synergique. De nombreux essais d'intervention de type supplémentation, avec une ou plusieurs substances associées, ont été effectués, chez l'animal mais également chez l'homme, souvent de manière empirique, avec des cibles variées. Un effet positif sur la qualité du sperme a pu être observé dans certains cas.

Ainsi, l'association « folates et zinc » (5 mg d'acide folique et 66 mg de zinc par jour durant 26 semaines) augmente de façon significative la concentration en spermatozoïdes, mais uniquement chez les sujets subfertiles, suggérant un rôle synergique du zinc et de l'acide folique dans la spermatogenèse (40). Par ailleurs, les hommes dont l'alimentation contient une grande quantité d'antioxydants (en particulier vitamines C, E et sélénium) ont une meilleure qualité de sperme (en termes de concentration et mobilité des spermatozoïdes) (45). Chez l'homme infertile, en cas d'oligospermie, la supplémentation en antioxydants induit une augmentation du nombre total de spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes normaux après embolisation d'un varicocèle (46). La supplémentation en antioxydants et minéraux chez des hommes infertiles durant 3 mois permet une amélioration de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et une diminution de la quantité d'ERO dans le plasma séminal (47).

Enfin, quand l'OAT s'associe à une leucocytose, une supplémentation en β -glucan, papaye, lactoferrine, vitamines C et E améliore la qualité du sperme et diminue le nombre de leucocytes en traitant l'inflammation par une action synergique de modulateurs d'immunité et d'antioxydants (48).

L'association AGPI et antioxydants n'a été évaluée que chez l'animal. Par exemple, chez le verrat, une supplémentation pendant 24 semaines associant AGPI (dans le but d'améliorer l'apport en ω 3) et antioxydants (vitamines E, C et sélénium afin de limiter la peroxydation lipidique) améliore la qualité du sperme : augmentation du nombre de spermatozoïdes, meilleure résistance de la membrane des spermatozoïdes aux chocs osmotiques, diminution de la peroxydation des lipides par augmentation de l'activité SOD et augmentation de la concentration séminale en antioxydants.

Autres

D'autres aliments ou substances ont été étudiés pour leurs effets positifs sur la fertilité masculine. On trouve notamment la grenade, source d'antioxydants et de polyphénols (anthocyanine, punicalagine, punicaline, acide ellagique et acide gallique), dont la consommation induirait une augmentation du nombre de spermatozoïdes, de leur mobilité ainsi que de l'activité antioxydante (diminution de l'index de peroxydation). Les myrtilles auraient, elles aussi, un effet protecteur contre la peroxydation des lipides. Elles contiennent des composants phénoliques et anthocyanine qui agissent comme piègeurs d'ERO. La consommation de myrtilles est ainsi associée à la diminution de la concentration des *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) dans le plasma séminal. On trouve aussi toutes sortes de substances, comme le pycnogenol contenu dans l'écorce de pin maritime, qui amélioreraient la capacitation et réduirait la réaction inflammatoire, ou l'huile de lin riche en AGPI et lignanes, qui améliorerait la qualité et la quantité du sperme. Enfin, la Maca (*Lepidium meyenii*), appelée aussi « Viagra péruvien », augmenterait la libido et la fertilité. Chez l'homme, une seule étude retrouve une augmentation du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité après 4 mois de traitement. Cependant, l'AFSSA a émis un avis défavorable quant à sa consommation en France du fait de sa possible toxicité.

Conclusion

L'impact du poids de l'homme sur la fertilité et sur la qualité du sperme, longtemps négligé, fait l'objet d'un nombre croissant de publications. Les données sont cependant souvent peu informatives, en raison d'effectifs restreints, ou controversées. Ces controverses peuvent s'expliquer en partie par l'hétérogénéité des populations (ethnie, niveau socio-économique, etc.) et les nombreux facteurs de confusion possibles (rôle de l'activité physique, du stress, du sommeil, du tabac, etc.). L'impact des nutriments, vitamines, métaux ou minéraux, sur l'infertilité masculine et la qualité du sperme a fait l'objet de nombreuses publications, parfois déjà anciennes. Toutes ces études soulignent l'importance d'une alimentation équilibrée et les effets délétères d'une carence ou d'un excès sur la spermatogenèse. Les études d'observation prennent en compte le rôle du poids et de la nutrition sur la fertilité du couple, sur les différents paramètres spermatiques, l'ADN du spermatozoïde, voire sur le pouvoir fécondant. Certains régimes alimentaires semblent associés à une meilleure fertilité.

Quant aux compléments alimentaires, prescrits souvent de façon empirique, ils n'ont, à ce jour, fait la preuve ni de leur efficacité, ni de leur innocuité (49).

En conclusion, l'observance d'un régime alimentaire équilibré et de règles hygiéno-diététiques simples, conformes au Plan National Nutrition et Santé (50), semble favorable à la fertilité masculine. Il est désormais nécessaire de disposer de données précises sur l'état nutritionnel des couples en âge de procréer, avant de proposer des études d'intervention prospectives bien ciblées, randomisées en double aveugle contre placebo.

Références

1. Jouannet P, Wang C, Eustache F *et al.* (2001) Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 109: 333-44
2. Castetbon K, Vernay M, Malon A *et al.* (2009) Dietary intake, physical activity and nutritional status in adults: the French nutrition and health survey (ENNS, 2006-2007). *The British journal of nutrition* 2: 1-11
3. Étude MONA LISA, Monitoring National du Risque Artériel (2005-2007)
4. Chavatte-Palmer P, Al Gubory K, Picone O, Heyman Y (2008) Maternal nutrition: effects on offspring fertility and importance of the periconceptional period on long-term development. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 920-9
5. Rinaudo PF, Lamb J (2008) Fetal origins of perinatal morbidity and/or adult disease. *Semin Reprod Med* 26: 436-45
6. Alejandro B, Perez R, Pedrana G *et al.* (2002) Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14: 333-7
7. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA *et al.* (2007) Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 22: 1634-7
8. Swan SH, Liu F, Overstreet JW *et al.* (2007) Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. *Hum Reprod* 22: 1497-502
9. Watanabe T, Ebara S, Kimura S *et al.* (2007) Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 47: 9-15
10. Pront R, Margalioth EJ, Green R *et al.* (2009) Prevalence of low serum cobalamin in infertile couples. *Andrologia* 41: 46-50
11. Jokela M, Elovainio M, Kivimäki M (2008) Lower fertility associated with obesity and underweight: the US National Longitudinal Survey of Youth. *Am J Clin Nutr* 88: 886-93
12. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N *et al.* (2004) Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 82: 863-70
13. Qin DD, Yuan W, Zhou WJ *et al.* (2007) Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian J Androl* 9: 827-34
14. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM *et al.* (2008) Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 90: 897-904
15. Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA *et al.* (2006) Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 17: 520-3

16. Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD (2007) Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod* 22: 2488-93
17. Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S *et al.* (2005) Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 20: 208-15
18. Hanafy S, Halawa FA, Mostafa T *et al.* (2007) Serum leptin correlates in infertile oligozoospermic males. *Andrologia* 39: 177-80
19. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL *et al.* (2009) Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*
20. Fejes I, Koloszar S, Szollosi J *et al.* (2005) Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia* 37: 155-9
21. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M *et al.* (2008) Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 90: 2222-5
22. Kort HI, Massey JB, Elsner CW *et al.* (2006) Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27: 450-2
23. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G *et al.* (2008) Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 90: 619-26
24. Winters SJ, Wang C, Abdelrahman E *et al.* (2006) Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? *J Androl* 27: 560-4
25. Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE (2008) The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 29: 251-9
26. Padron RS, Mas J, Zamora R *et al.* (1989) Lipids and testicular function. *Int Urol Nephrol* 21: 515-9
27. Ramirez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M (2000) High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol Obstet Mex* 68: 224-9
28. Bener A, Al-Ansari AA, Zirir M, Al-Hamaq AO (2009) Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus? *Int Urol Nephrol*
29. Glenn DR, McClure N, Lewis SE (2003) The hidden impact of diabetes on male sexual dysfunction and fertility. *Hum Fertil (Camb)* 6: 174-9
30. Vicari E, Arancio A, Giuffrida V *et al.* (2002) A case of reversible azoospermia following withdrawal from alcohol consumption. *J Endocrinol Invest* 25: 473-6
31. Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59: 2-11
32. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ (2007) Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 77: 190-201
33. Tavilani H, Doosti M, Abdi K *et al.* (2006) Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia* 38: 173-8
34. Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN *et al.* (2006) Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4154-63
35. Ghyselinck NB, Vernet N, Dennefeld C *et al.* (2006) Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Dev Dyn* 235: 1608-22
36. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM *et al.* (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13: 225-38
37. Tamura T, Picciano MF (2006) Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 83: 993-1016
38. Boxmeer JC, Smit M, Utomo E *et al.* (2008) Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril*
39. Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM *et al.* (2008) The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum Reprod* 23: 1014-22
40. Eibisch IM, Pierik FH, De Jong FH *et al.* (2006) Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl* 29: 339-45
41. Aquila S, Guido C, Perrotta I *et al.* (2008) Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. *J Anat* 213: 555-64
42. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM *et al.* (2008) Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online* 16: 842-50
43. Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR *et al.* (2009) Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 24: 1304-12
44. Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R (2008) Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod* 23: 2584-90
45. Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP *et al.* (2005) Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl* 26: 550-6
46. Paradiso Galatioto G, Gravina GL, Angelozzi G *et al.* (2008) May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? *World J Urol* 26: 97-102
47. Tunc O, Thompson J, Tremellen K (2009) Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 18: 761-8
48. Piomboni P, Gambera L, Serafini F *et al.* (2008) Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl* 10: 201-6
49. Herberg S, Ezzedine K, Guinot C *et al.* (2007) Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *J Nutr* 137: 2098-105
50. Herberg S, Chat-Yung S, Chaulia M (2008) The French National Nutrition and Health Program: 2001-2006-2010. *Int J Public Health* 53: 68-77

M. Canis, S. Matsuzaki,
X. Tran, N. Bourdel,
R. Botchorishvili,
B. Rabischong, K. Jardon,
J.-L. Pouly et G. Mage

Physiologie péritonéale et fertilité

Introduction

La situation intrapéritonéale de l'ovaire et la communication établie grâce à la trompe entre le milieu péritonéal et le tractus génital expliquent l'intérêt de la connaissance de la physiologie péritonéale pour la compréhension de la fertilité. Le péritoine, la cavité péritonéale et le liquide qu'elle contient sont des organes originaux dont les rôles physiologiques sont multiples et de ce fait étudiées par des spécialistes très divers : gynécologues, chirurgiens, néphrologues, pneumologues, immunologistes... Malgré ces travaux très nombreux, la physiologie péritonéale normale reste mal connue du fait de la difficulté, en situation normale, d'accéder à cette cavité profonde.

La physiologie péritonéale peut interférer avec la fertilité par plusieurs mécanismes :

- rôle physiologique du liquide péritonéal (1) et conséquences des modifications induites par des circonstances pathologiques comme l'endométriose ;
- cicatrisation anormale, à la suite d'un traumatisme, chirurgical, infectieux ou endométriosique, ce qui conduit à la formation d'adhérences.

Pour savoir interpréter les connaissances qui apparaîtront au cours des prochaines années, il faut connaître des notions de bases concernant le péritoine qui est un véritable organe du fait des potentialités très importantes des cellules mésothéliales et du tissu sous-péritonéal sous-jacent (2).

ularisation et une innervation de type somatique. Cette différence est capitale dans la compréhension de la douleur.

La surface péritonéale proche de la surface corporelle est de 1,5 à 2 m² chez l'adulte, Albanese *et al.* ont mesuré une surface d'environ 14 000 cm² (3).

À la notion de surface géométrique, il faut préférer les notions de surface fonctionnelle :

- si l'on place 2 litres de liquide dans la cavité péritonéale d'un individu de 60 à 80 kg, seulement 0,55 ± 0,04 m² entrent en contact avec le liquide utilisé (4) ;
- dans les échanges ioniques, la surface des capillaires de l'interstitium est la surface d'échange utile entre le milieu sanguin et le liquide péritonéal (5) ;
- si les microvillosités de la surface des cellules mésothéliales sont prises en compte, la surface péritonéale est de plus de 40 m².

Le travail d'Albanese permet aussi de connaître la surface de chaque organe ou groupe d'organe. Ainsi, la surface du cul-de-sac de Douglas qui correspond à la moitié de celle de l'utérus et des ligaments larges et à celle du rectum est d'environ 200 cm². Cette zone anatomique est très hétérogène sur le plan microscopique. Les surfaces de l'utérus de la trompe de l'ovaire et du rectum sont très différentes en microscopie électronique (6, 7). Aux longs sillons réguliers de la surface de la trompe, il faut opposer les vallées tortueuses et irrégulières de la surface de l'utérus et les plaines de la surface rectale et vésicale (8, 9).

Anatomie

Nous ne décrivons pas l'embryologie péritonéale, indispensable, mais décrite en détail dans de nombreux traités d'anatomie. On distingue le péritoine viscéral qui reçoit une innervation de type splanchnique et le péritoine pariétal qui reçoit une vas-

Histologie

La structure de la membrane péritonéale comporte une assise de cellules mésothéliales, une membrane basale, puis un tissu interstitiel décrit plus loin (5, 6).

Stoma

Les stoma sont une autre caractéristique de la membrane péritonéale. Dans ces zones, la membrane basale située en dessous des cellules mésothéliales est absente et la cavité péritonéale est en contact direct avec les lacunes lymphatiques. Ces stoma présents au niveau du péritoine de la portion musculaire du diaphragme sont aussi présents au niveau du péritoine pariétal, du grand épiploon et du péritoine pelvien. Ces stoma sont des structures dynamiques, dont le nombre et l'apparence se modifient en fonction des circonstances physiologiques ou pathologiques (5, 6).

Cellules mésothéliales

On observe des cellules mésothéliales de plusieurs formes : cubique, aplaties et des aspects intermédiaires entre les deux. On trouve des cellules cubiques, qui font saillie dans la cavité péritonéale, sur la rate, le rectum, l'utérus et la vessie. On les retrouve en groupe dans la périphérie des stoma, dans les zones en cours de cicatrisation, sur le péritoine pariétal antérieur, sur les *milky spots* du grand omentum et le péritoine du ligament large. Dans les autres zones, ces cellules sont isolées. Les cellules aplaties moins saillantes dans la cavité péritonéale sont reliées sur de grandes distances par des processus cytoplasmiques ; leur appareil microvillositaire est moins développé que celui des cellules cubiques. Ces cellules recouvrent une partie beaucoup plus importante de la surface péritonéale. L'équipement endocellulaire, réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de Golgi est beaucoup plus développé dans les cellules cubiques qui sont beaucoup plus « actives ».

Le contact entre les cellules mésothéliales est très important dans la mesure où cette membrane ne comporte qu'une seule assise cellulaire. Les zones de chevauchement simples sont fréquentes. Il existe aussi des zones de jonction et d'adhérences intercellulaire (*tight junction*, desmosomes, zona occludens) capitaux pour le développement de la polarité cellulaire (7).

La surface des cellules mésothéliales comporte des microvillosités dont le nombre, la taille et la répartition varient en fonction des localisations anatomiques et de la région cellulaire. Surtout, ces microvillosités représentent une structure dynamique dont le nombre et l'aspect va varier en fonction de circonstances physiologiques ou pathologiques. Ce phénomène est sûrement capital en physiologie si on tient compte du fait que la surface péritonéale est multipliée par 20 grâce à la présence de ces microvillosités. À la surface des cellules méso-

théliales, existent également des cils structures environ 5 fois plus longues que les microvillosités dont le rôle physiologique est mal connu (5, 6).

Les cellules mésothéliales ont des propriétés originales. Ces cellules épithéliales peuvent prendre une apparence de fibroblaste, l'expression de cyto-kératines typiques des cellules épithéliales est alors remplacée par des vimentines typiques des cellules mésenchymateuses. Ceci apporte un éclairage différent sur l'origine des cellules qui participent à la cicatrisation péritonéale. On sait maintenant qu'il existe des cellules souches dans le mésothélium et que la cavité péritonéale peut être utilisée pour la fabrication de tissus nouveaux comme des greffons vasculaires ou même de la paroi d'organes tels que la vessie (8, 9).

Jonction épithélium tubaire mésothélium

Récemment, Yaniz *et al.* ont montré que, chez le porc, la jonction entre la muqueuse tubaire et le mésothélium s'étale sur une distance de quelques millimètres. On note la présence de cellules de l'épithélium tubaire sur le versant mésothélial. Ces cellules subissent des variations cycliques avec prédominance de cellules ciliées pendant la phase folliculaire et de cellules sécrétoires pendant la phase lutéale (10).

Surfactant péritonéal

La surface du péritoine n'est pas « mouillable » comme en témoigne l'angle de raccordement des gouttes de sérum physiologique à la surface du péritoine. Ces angles varient de 35° à 60° alors qu'il devrait être voisin de 0° si la surface était mouillable (2). La surface des cellules mésothéliales est recouverte d'un glycocalyx formé de glycoaminoglycanes, essentiellement de l'acide hyaluronique et de protéoglycanes (11). Ces glycoaminoglycanes et protéoglycanes forment un revêtement chargé négativement à la surface des cellules mésothéliales. C'est sur ces molécules que s'organisent les phospholipides (phosphatidylcholine) chargés positivement au niveau de leur pôle hydrophile. Les cellules mésothéliales possèdent un appareillage cellulaire identique à celui qui permet aux pneumocytes de sécréter le surfactant présent dans les alvéoles. Le rôle de ce surfactant dans l'interaction des gamètes n'est pas connu, mais ce système de lubrification est considéré comme un des plus efficaces que l'on connaisse (5). Cette surface à laquelle les cellules ne peuvent pas adhérer pourrait faciliter la captation de l'ovocyte par le pavillon si cette captation est indirecte. Cette surface non mouillable pourrait aussi contribuer à répartir le

liquide présent dans le cul-de-sac de Douglas sur l'ensemble de la surface de cette zone.

Tissu sous-mésothélial

En dessous des cellules mésothéliales, on trouve des fibres collagène et des fibres élastiques, qui expliquent la rétraction importante que l'on observe après avoir excisé une pastille de péritoine. Puis on trouve le tissu interstitiel, qui comporte une matrice extracellulaire, des cellules musculaires, des capillaires sanguins, des lymphatiques, des fibroblastes des mastocytes, des cellules immunes dont des macrophages et des cellules dendritiques (5, 12). Les capillaires sanguins sont nombreux, les lymphatiques forment un réseau vaste et complexe (5).

Liquide péritonéal

La cavité péritonéale contient physiologiquement un faible volume de liquide que l'on considère comme étant un transsudat d'origine plasmatique et un exsudat d'origine ovarienne (13-15). Le volume exact est difficile à préciser dans des conditions physiologiques parce qu'il est rare d'aborder le péritoine dans ces circonstances. Chez l'homme, le volume serait de l'ordre de 1 à 2 mL. Chez la femme, ce volume est corrélé à l'activité ovarienne et à la phase du cycle menstruel variant de 3 à 5 mL en début de phase proliférative jusqu'à 20 à 40 mL en période périovulatoire (fig. 1). Cette évolution serait due à une modification de la perméabilité vasculaire locale. La concentration protéique varie peu au cours du cycle, elle est d'environ 60 % de la concentration plasmatique, Koninckx *et al.* ont proposé que ce liquide soit un exsudat d'origine ovarienne. La légère augmentation des concentrations protéiques observées en fin de phase folliculaire et en début de phase lutéale témoignerait du fait qu'il s'agit d'un exsudat, la perméabilité vasculaire étant augmentée du fait des concentrations hormonales plus élevées. Les concentrations d'hormones stéroïdes sont plus élevées dans le liquide péritonéal que dans le plasma. Le ratio liquide péritonéal plasma suit une courbe parallèle à celle du volume du liquide. Les concentrations de 17β E2 augmentent brutalement au moment de l'ovulation, les concentrations étant à ce moment-là 100 fois plus élevées que dans le plasma. Les taux de *sex binding globuline* sont plus faibles que dans le plasma. Il est probable que la rupture folliculaire a un rôle dans les volumes de liquide retrouvés dans la cavité péritonéale (2). Plus récemment, un travail de Ciconelli *et al.* montre que les concentrations de pro-

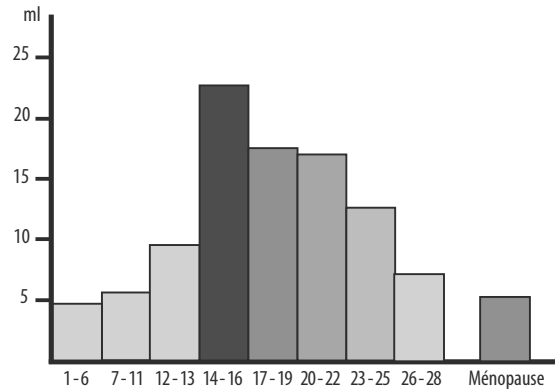


Fig. 1 – Volume du liquide retrouvé dans le cul-de-sac de Douglas pendant le cycle menstruel.

gestérone sont 4 fois plus élevées à proximité du corps jaune que dans les autres régions du pelvis. Cette notion nouvelle doit être confirmée, mais elle pourrait être importante dans la compréhension de la physiologie de la reproduction (16).

Les concentrations en solutés et en protéines du liquide péritonéal dépendent également des propriétés de perméabilité de la membrane péritonéale qui sont discutées par ailleurs. Schématiquement, les solutés et les molécules de faibles poids moléculaires diffusent facilement alors que pour les protéines de poids moléculaire élevé le passage est moins important.

Le liquide péritonéal contient de très nombreuses autres protéines. Parmi celles-ci, il faut citer les cytokines et chémokines (IL1, TNF, IL6, IL8, IL10, IL 13, MCP-1, MCSF, interféron gamma). L'activité angiogénique du liquide péritonéal est due à la présence de TGF β et de VEGF. De nombreux autres éléments ont été retrouvés : facteurs de croissance (PDGF, IGF, etc.), protéines de la matrice extracellulaire, phospholipides, leptines. Cette liste n'est pas exhaustive (17, 18).

Ce liquide contient également des éléments cellulaires, cellules mésothéliales, des macrophages et autres cellules immunocompétentes sur lesquelles nous reviendrons. Chez la femme, on trouve aussi des érythrocytes et des cellules endométriales qui proviennent du reflux menstruel phénomène quasi physiologique qui existerait chez 90 % des femmes (17, 18).

Circulation du liquide dans la cavité péritonéale

Le volume du liquide péritonéal est faible probablement en raison des grandes capacités de résorption du liquide de la cavité péritonéale. Si on laisse du sérum physiologique ou du Ringer lactate dans la cavité péritonéale, il est absorbé au rythme de

35 mL/heure (2). Ainsi, un volume de 0,5 litre est absorbé en moins de 24 heures. Ces données ont été confirmées par des études utilisant le déclampage d'un drainage postopératoire ou l'échographie postopératoire (2). Ces données expliquent l'inefficacité de l'hydroflottation avec des cristalloïdes simples dans la prévention des adhérences postopératoires.

La question reste de savoir si ces flux observés sont dus au fait qu'un grande quantité de liquide a été instillée et qu'elle doit être éliminée ou si les volumes qui circulent sont les mêmes dans des situations physiologiques. On peut supposer que l'augmentation de pression intrapéritonéale qui fait suite à l'instillation d'une grande quantité de liquide influe sur les flux de circulation de liquide dans la cavité péritonéale, mais cela reste à confirmer. Ces notions seraient importantes pour comprendre à quelle vitesse le liquide que l'on trouve dans le cul-de-sac de Douglas se renouvelle. S'il existe vraiment un flux péritonéal constant aussi important, le liquide péritonéal retrouvé dans le cul-de-sac de Douglas en deuxième partie de cycle n'est pas uniquement dû à la rupture du follicule. En effet, si cela était le cas, la quantité de liquide devrait décroître en quelques heures et non pas de manière progressive au cours de la deuxième partie du cycle. Si l'on considère ce flux de liquide péritonéal, on suppose aussi que l'ovocyte doit probablement être capté directement par le pavillon plutôt que « repêché » par la pompe tubaire dans le liquide du cul-de-sac de Douglas. Le flux varie-t-il en fonction du cycle menstruel pour faciliter la fécondation ? On voit que les questions les plus simples restent encore souvent sans réponse.

La circulation des liquides dans la cavité péritonéale a été étudiée au cours de travaux expérimentaux, ou avec des techniques de péritonéographie (2). Il existe des compartiments péritonéaux, le méso-côlon transverse et le mésentère sont des barrières importantes dans la circulation du liquide péritonéal. Une revue récente de la littérature réalisée par Bricou *et al.* montre que ces flux intrapéritonéaux expliquent probablement la topographie des lésions d'endométrieose (19). Ces flux ont été décrits en détail précédemment (2). Ces notions souvent anciennes n'ont pas été étudiées de nouveau plus récemment. Il faut retenir que la dépression sous diaphragmatique explique le flux de liquide en direction du diaphragme et le rôle essentiel des mouvements respiratoires dans ces phénomènes physiologiques.

La circulation dans la cavité péritonéale est modifiée dans des circonstances pathologiques, adhérences, infection ou tumeur ; ou lorsque les conditions de pression intrapéritonéale sont modifiées par exemple par un drainage.

Filtration péritonéale

Les mécanismes d'échange entre la cavité péritonéale et la circulation sont complexes. Les échanges peuvent se faire dans les deux directions (plasma, péritoine et péritoine plasma).

Mésothélium

Le mésothélium ne constitue pas une barrière fonctionnelle significative aux échanges (20). En effet, il existe des espaces intercellulaires, et l'ablation mécanique du mésothélium ne modifie pas le transfert de liquide induit par une solution hypertonique qui contient 4 % de mannitol (20). La barrière plasma-cavité péritonéale comporte essentiellement le tissu interstitiel et l'endothélium des capillaires sanguins, et la paroi des lymphatiques (4, 20).

Tissu interstitiel

Le tissu interstitiel est une autre partie essentielle de la barrière d'échange. Si l'on sait que la loi de Starling régit les échanges à travers la membrane capillaire, on connaît moins bien les mécanismes qui régissent les échanges entre le milieu interstitiel et la cavité péritonéale. Son rôle a été confirmé par plusieurs études. Chez le rat, des molécules de la taille du sucrose, marquées au C14, diffusent jusqu'à une profondeur de 500 à 800 microns, alors que l'épaisseur du mésothélium n'est que de 25 microns. La clairance de gaz inertes à partir de la cavité péritonéale vers le flux sanguin est différente d'un simple transfert transcapillaire, différence due au tissu interstitiel (4, 20).

Le tissu interstitiel intercellulaire comporte des zones plus « fluides » et des plus « solides ». En effet, le tissu interstitiel est constitué de macromolécules (glycoaminoglycanes, glycoprotéines sulfatées d'héparine, de chondroïtine, de kératine) et de fibres collagènes. Ces fibres ancrées aux cellules par les intégrines (4) forment une structure qui limite l'espace dans lequel les solutés peuvent diffuser. On estime que les protéines ne peuvent diffuser que dans 50 % du tissu interstitiel dont l'importance varie en fonction des zones (4). Par exemple, dans les zones où l'espace interstitiel comporte des cellules musculaires (environ 20 % de la surface), le tissu interstitiel représente seulement 12 à 20 % de l'espace interstitiel et la zone de diffusion des protéines seulement 6 à 10 % de l'ensemble du tissu sous-mésothélial. Ces zones moins fluides limitent aussi la diffusion des solutés de faible poids moléculaires comme le mannitol. Les cellules musculaires sont reliées entre

elles par des fibres collagènes et des intégrines avec assez peu de gel intercellulaire entre elles. Pendant la dialyse péritonéale, ces cellules musculaires soumises à un gradient de concentration de l'agent osmotique sont capables de réguler leur volume grâce à des molécules d'aquaporines de type 4. Cela pourrait permettre à l'eau de se rapprocher de la cavité péritonéale en traversant des cellules successives.

Les propriétés de ce tissu interstitiel sont modifiées par les variations de la pression intrapéritonéale. Lorsque la pression dépasse un seuil (2 mmHg chez le rat), les capacités de résorption par les lymphatiques sont dépassées et le liquide s'accumule dans le tissu interstitiel. Cette modification des propriétés du tissu interstitiel améliore la pénétration des solutés dans le tissu interstitiel, et peut être objectivée en mesurant les variations de concentration de l'acide hyaluronique dans le tissu sous-péritonéal (4, 20). Ces conditions de pression sont remplies dans les situations de dialyse péritonéale qui utilisent de grands volumes (environ 2 litres).

Le soluté peut être extrait du tissu interstitiel par plusieurs mécanismes : la liaison aux cellules ou aux constituants de la matrice extracellulaire, le métabolisme et le passage dans les capillaires sanguins et/ou lymphatiques. Ces mécanismes diminuent la concentration d'un soluté dans le tissu interstitiel et expliquent qu'un produit puisse ne pas avoir d'effet à distance de la surface de la séreuse péritonéale. Le rôle de ces mécanismes a été confirmé expérimentalement. Si on fait varier la pression intrapéritonéale au-delà d'un seuil (2 mmHg chez le rat), le flux lymphatique n'augmente plus et reste égal à 2 mL/h, la quantité de liquide qui quitte la cavité continue d'augmenter en fonction de la pression, mais la concentration en protéines marquées dans la paroi augmente. Les concentrations tissulaires d'IgG élevées, au cours de ces expérimentations, suggèrent une liaison des protéines aux tissus de la barrière. Cela confirme que le liquide qui passe dans le tissu interstitiel quitte cette zone à travers la paroi des capillaires et pas seulement par voie lymphatique. Il est probable que le tissu interstitiel joue un rôle de barrière osmotique, qui doit encore être précisé.

Capillaires sanguins

Les capillaires sanguins représentent, avec leur membrane basale, le principal filtre entre la cavité péritonéale et la circulation sanguine. Les capillaires concernés se situent à une profondeur qui varie de 25 à 800 microns. Quantitativement, les capillaires les plus importants sont les capillaires musculaires situés dans la paroi digestive, dans

le diaphragme et dans la paroi abdominale antérieure (4). Cette « barrière » capillaire comporte trois types de pores.

Les pores intracellulaires ont un diamètre < 0,5 nm, ils permettent le passage de l'eau induit par un agent osmotique comme un soluté hypertonique. Ces « canaux intracellulaires » sont constitués par des protéines appelées aquaporines. Leur existence a été confirmée par les travaux qui montrent que, chez des souris génétiquement modifiées qui ne sécrètent pas d'aquaporine 1, la filtration transpéritonéale est diminuée de 50 à 60 % (21).

On distingue deux types de pores intercellulaires. Les pores de petit diamètre, 5 nm, permettent le passage de molécules de faible poids moléculaire (inuline), limitent considérablement le passage des protéines et représentent environ 90 % de la surface des pores. Les pores de grande taille, > 15 à 20 nm, permettent le transport des protéines mais ne représentent que 3 à 5 % de la surface de filtration.

Cette théorie des trois types de pore semble devoir être revue en tenant compte de la présence d'un glycocalyx présent à la surface des cellules endothéliales dans la lumière capillaire. La reconnaissance tardive du rôle de ce revêtement formé de polysaccharides est due au fait qu'ils sont souvent détruits par les méthodes de fixation en vue d'étude en microscopie électronique. Si l'intérêt d'introduire un nouveau paramètre dans la théorie des trois pores est contesté (22), il semble que cela permet de mieux de comprendre l'influence de certains facteurs sur le transport transpéritonéal.

Lymphatiques

Ces lymphatiques comportent aussi des espaces intercellulaires qui permettent de drainer de la lymphe à partir du tissu interstitiel (5).

Ce système présent dans le tissu interstitiel joue un rôle essentiel dans le retour des macromolécules vers la circulation sanguine. Le flux lymphatique ne dépend pas de la pression hydrostatique (4). L'importance de ce drainage lymphatique reste très discutée dans le cadre de la dialyse péritonéale. Les mesures du flux lymphatique sont indirectes. La mesure de l'apparition dans le plasma de macromolécules injectées dans la cavité péritonéale sous-estime le flux lymphatique péritonéal (23). On admet qu'il y a deux voies de drainage lymphatique :

- les canaux lymphatiques qui comporte principalement deux systèmes, le système transdiaphragmatique et qui se draine dans les canaux lymphatiques parasternaux qui accompagnent les vaisseaux mammaires internes vers le canal lymphatique droit et le système lymphatique mésentérique vers le canal thoracique ;

– le passage de liquide vers le tissu interstitiel de la membrane péritonéale sous l'effet de la pression intrapéritonéale. Cette deuxième fraction est l'objet de discussions animées entre les spécialistes de la dialyse péritonéale. Une partie de ce liquide du tissu interstitiel retourne probablement dans les lymphatiques, mais une partie plus importante passe dans les capillaires sanguins.

Mécanismes de transport à travers la membrane péritonéale

Le transfert d'une molécule à travers la membrane péritonéale est la résultante de plusieurs mécanismes.

La diffusion correspond au mouvement des molécules de zones à haute concentration vers des zones à basse concentration. Elle dépend du gradient de concentration entre les deux zones ou pression osmotique. La diffusion est le principal mécanisme pour les solutés de faible poids moléculaire. La constante de diffusion d'une molécule varie en fonction de l'inverse de la racine carrée du poids moléculaire de la substance. Il est important de savoir que la pression oncotique est la part de la pression osmotique attribuable aux protéines. Cette constante ne varie pas en fonction de la région péritonéale étudiée. La diffusion est plus rapide si la molécule est liposoluble. Les diminutions du flux sanguin influencent peu le transfert transpéritonéal. Le passage transpéritonéal est directement proportionnel à la surface de péritoine en contact avec la substance, d'où la notion de surface péritonéale fonctionnelle.

La convection est le processus par lequel le soluté est entraîné par le flux du solvant qui, dans l'organisme, correspond au flux de l'eau. Ce transfert dépend du gradient de pression hydrostatique. Ce mécanisme est le plus important pour le transfert des protéines dont l'absorption augmente d'un facteur 5 ou 6 quand la pression hydrostatique varie de 0 à 10 mmHg (4). La plupart des transferts de protéines se déroulent à travers les pores de grands diamètres (4).

Le passage à travers les espaces intercellulaires est modifié par le glycocalyx endothélial qui limite le passage des solutés et modifie les données de l'équation de Starling (20). La quantité totale des échanges dépend bien sûr de la surface totale d'échange et de la présence plus ou moins importante de pores de grande taille perméables aux protéines. Cette notion théorique a été récemment confirmée par Numata *et al.* qui montrent que le taux de transport d'un soluté est corrélé à la surface relative des microvaisseaux, mesurée sur des biopsies de péritoine pariétal, en particulier chez

les patients qui ont une dialyse péritonéale depuis plus de 60 mois (24).

Il est probable que ces règles d'échanges sont modifiées dans des circonstances pathologiques qui modifient la circulation générale (choc par exemple) ou la paroi des capillaires (péritonites, carcinose, voire traumatisme chirurgical). On sait peu de chose à propos de l'influence de circonstances pathologiques rencontrées dans le cadre de l'infertilité comme l'endométriозe, les lésions tubaires ou les stimulations de l'ovulation. De même, on a peu de notion sur les conséquences de gestes chirurgicaux simples ou supposés peu invasifs comme la coelioscopie. Au niveau des pores, la pression hydrostatique est le principal mécanisme. Dans la mesure où la pression intracapillaire est supérieure à la pression du tissu interstitiel, les protéines passent de la circulation vers le tissu interstitiel. Elles retournent vers la circulation par voie lymphatique. La pression dans la cavité péritonéale est basse, ce qui favorise la filtration en direction de la cavité péritonéale. La situation est différente lors de dialyse péritonéale du fait des modifications induites par le volume et les propriétés osmotiques du liquide utilisé. Les mécanismes peuvent être intriqués ; un gradient osmotique et un gradient de pression hydrostatique peuvent être présents en même temps. La circulation pourrait différer en fonction de la région péritonéale du fait de variations dans la présence des pores de la paroi capillaire et des stomas de la membrane mésothéliale.

Immunité péritonéale

Le système immunitaire du péritoine est complexe et original, en raison du rôle des cellules mésothéliales, de populations cellulaires spécifiques, de l'intrication avec le système immunitaire du tube digestif (2, 25), du rôle de mécanismes non immunologiques comme la circulation du liquide péritonéal. Mais ce système essentiel est impliqué dans la formation d'adhérences postopératoires et dans le pronostic du cancer invasif de l'ovaire.

Populations cellulaires du péritoine

Ces populations cellulaires sont étudiées lors de coelioscopies réalisées chez les femmes jeunes, sur les liquides recueillis en fin de dialyse péritonéale, sur les liquides prélevés lors d'interventions chirurgicales non gynécologiques, et sur les liquides d'ascite. Les notions les plus proches de la normale sont obtenues chez les femmes jeunes qui subissent une coelioscopie, mais chez lesquelles le reflux menstruel et les saignements périovulatoires sont

fréquents. Les notions obtenues dans le cul-de-sac de Douglas ne sont peut-être pas exactement le reflet des populations présentes dans les autres régions du péritoine. Les proportions respectives des populations cellulaires varient beaucoup selon les études.

Les études restent peu nombreuses dans les situations pathologiques. Olszewski *et al.* ont récemment confirmé qu'il existe des modifications des populations péritonéales dans les stades précoces de cancers intrabdominaux (26). Cette notion est importante. Les chirurgiens sous-estiment probablement les modifications cellulaires d'un péritoine macroscopiquement normal.

Macrophages

Les macrophages représentent la principale population cellulaire du liquide péritonéal, leur proportion varie selon les études de 40 à 90 % (25, 27, 28). Leur nombre varierait de 10^3 – 10^4 à 5×10^6 (27–29), chez des femmes normales qui subissent une stérilisation tubaire (29). À ces macrophages du liquide péritonéal, il faut ajouter des macrophages situés en dessous de la membrane basale du mésothélium, cellules numériquement nombreuses dont certaines ont une morphologie de cellule dendritique (30). Dans les péritoines exposés à des stimuli inflammatoires persistants, on observe des sous-populations correspondant à des macrophages immatures. Les données obtenues à partir de macrophages collectés chez la femme montrent que les macrophages péritonéaux paraissent activés, que leur activation varie en fonction des phases du cycle menstruel, et mettent en évidence la grande variété des populations macrophagiques du péritoine qui comportent des cellules de petite taille proche des monocytes et des cellules de plus grande taille. Ces notions obtenues, dans un contexte qui comporte reflux menstruel et l'ovulation, suggèrent l'existence d'un renouvellement continu des macrophages péritonéaux. Leur activation paraît comme « arrêtée » si on la compare à l'activation de macrophages recueillis dans des situations pathologiques. Plus récemment, Bacci *et al.* ont montré que les macrophages que l'on retrouve chez les patientes contrôles ont un phénotype inflammatoire (M1), alors que ceux que l'on retrouve chez des patientes endométriosiques ont un phénotype dit de réparation (M2) (31).

Les macrophages sont considérés comme la première ligne de défense du péritoine. L'intervention précoce des macrophages est suggérée par les niveaux élevés de TNF α que l'on observe avant l'apparition de la péritonite. Chez la souris, il existe une population de cellules péritonéales qui se différencient en cellules dendritiques *in vitro* en

présence de concentration adéquate de Gm-CSF et de TNF α . Cette notion n'a pas été confirmée chez l'homme. Les macrophages ont un rôle dans l'initiation de la réaction inflammatoire du péritoine. Ce rôle supposé depuis de nombreuses années a été confirmé récemment (32).

Cellules dendritiques

Des cellules dendritiques ont été identifiées dans le liquide péritonéal à l'état physiologique, elles représenteraient 6 % des cellules du liquide péritonéal, leur capacité de présentation d'antigène est très supérieure à celles des macrophages (12). Ces cellules ont été identifiées par différentes équipes avec des anticorps différents témoignant du fait qu'il existe probablement différentes sous-populations de cellules dendritiques. On suppose que ces cellules dendritiques partagent les propriétés fonctionnelles des autres cellules dendritiques mais cela doit être confirmé. L'origine des cellules dendritiques péritonéales n'est pas connue, il s'agit soit de la migration de cellules immatures en provenance du sang périphérique, soit de la différenciation de précurseurs présents dans la cavité péritonéale.

Ces cellules ne sont plus seulement considérées comme des cellules présentatrices d'antigène mais comme des arbitres de la réponse immunitaire dans son ensemble. En particulier, on sait que le microenvironnement dans lequel les cellules dendritiques se différencient et interagissent avec les cellules T conditionne le type de cellules T qui prédomine pendant la réponse immunitaire.

Polynucléaires

Le pourcentage de polynucléaires neutrophiles serait de 8 % dans la population contrôle et de 20 à 30 % dans la population atteinte d'endométriose. Le rôle de ces polynucléaires et des monocytes dans le transport d'antigène de cellules tumorales entre la cavité péritonéale et les organes lymphoïdes secondaires a été rapporté (33).

Cellules mésothéliales (2, 27, 34)

Les cellules mésothéliales ont probablement un rôle essentiel dans la réaction inflammatoire, et dans la présentation d'antigène. En effet, ces cellules numériquement très nombreuses sont celles qui vont entrer en contact en premier avec les agents pathogènes. Les cellules mésothéliales ont un rôle dans l'initiation, l'amplification et la résolution des phénomènes inflammatoires par le biais d'une sécrétion adaptée des chémokines, IL8

(interleukine 8) et MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), qui permet le contrôle du phénotype des cellules recrutées dans la cavité péritonéale. L'interaction germes cellules mésothéliales induit une sécrétion d'IL8 et la création d'un gradient d'IL8 de chaque côté d'une couche monocellulaire de cellules mésothéliales et induit une migration de leucocytes. L'interaction avec les macrophages majore ces phénomènes, les cytokines produites par les macrophages amplifient la synthèse des cellules mésothéliales. Sous l'influence de l'interféron gamma, les cellules mésothéliales diminuent leur sécrétion d'IL8 et augmentent leur sécrétion de MCP-1, ce qui conduit à une diminution du flux de polynucléaires neutrophiles et à une augmentation de la population de macrophages, que l'on observe lors de la phase de résolution de l'inflammation.

Les cytokines peuvent se lier aux glycoaminoglycanes situées à la surface ou au niveau de la membrane basale des cellules mésothéliales (11). Ces glycoaminoglycanes ont un rôle dans le contrôle de la fonction des chémokines, en les protégeant de la protéolyse ou en induisant une oligomérisation qui aboutit à une forme plus active de la molécule.

Les cellules mésothéliales auraient aussi une fonction de phagocytose et de cellules présentatrice d'antigène ; elles expriment des molécules HLA-DR après traitement par l'interféron gamma. Par ailleurs, elles sécrètent de l'IL15, activateur des cellules T (2).

Fibroblastes

Longtemps considérés comme principalement impliqués dans la synthèse et le remodelage de la matrice extracellulaire, les fibroblastes ont aussi un rôle de sentinelle et sont impliqués dans le déroulement et la résolution de la réaction inflammatoire (35). Les fibroblastes sécrètent des prostanoïdes, des cytokines et des chémokines, IL8 et MCP-1, avec des cinétiques proches de celles observées pour les cellules mésothéliales. Le profil de sécrétion observé dépend du tissu d'origine des fibroblastes. Le rôle des « fibroblastes péritonéaux » ne doit pas être sous-estimé, on sait que leur population peut augmenter de manière très significative du fait de la possibilité de la transition des cellules mésothéliales, cellules épithéliales qui peuvent acquérir un phénotype de cellule mésenchymateuse (7, 8).

Lymphocytes (2, 27, 28, 30, 36, 37)

Les lymphocytes représentent de 10 à 40 % des cellules péritonéales. En plus des phénotypes rencontrés dans le sang, on rencontre des phénotypes

rare dans d'autres tissus. Le péritoine est un des organes où se produit une différenciation extrathymique des lymphocytes en particulier au niveau de l'épiploon. La majorité de ces lymphocytes sont des lymphocytes T, la proportion de cellules B est en effet plus basse 2,3 % dans le péritoine contre 12 % dans le sang. Parmi les lymphocytes T, le ratio CD4/CD8 (helper/suppresseur) est de 0,5 à 0,9 alors qu'il est de 1,7 à 2,0 dans le sang périphérique. De même, parmi ces T lymphocytes, la proportion de cellules mémoire est plus élevée (90 % des CD4 et 73 % des CD8) que dans le sang périphérique (50 % des CD4 et 30 % des CD8).

La majorité des cellules CD8 + sécrèterait des cytokines de type Th1 (IL2, interféron gamma) mais certaines sécrètent des cytokines de type Th2 (IL4, IL5) et stimulent la différenciation de cellule B et la sécrétion d'IgG et IgA. De la même manière, il existe deux sous-populations de lymphocytes helpers (Th1 et Th2). La signification de ces différences et le rôle physiologique des lymphocytes péritonéaux ne sont pas bien connus.

Les cellules NK représentent une part plus importante des lymphocytes péritonéaux (26 % de lymphocytes CD3-) que des lymphocytes périphériques (10 % de cellules CD3-).

Les lymphocytes B comportent différentes sous-populations, parmi lesquels on distinguait les lymphocytes B-1a peu communs dans d'autres organes et qui se développeraient à partir de progéniteurs présents dans l'épiploon. Des lymphocytes B1-b et B2 sont également présents. Les lymphocytes B1-b sont ceux parmi lesquels on retrouve, après stimulation par le LPS, un grand nombre de cellules productrices d'IgA (38, 39).

L'association entre les lymphocytes péritonéaux et le système lymphoïde du tractus digestif est établie (28). Une immunisation intrapéritonéale induit une réponse importante en IgA. Ce phénomène serait expliqué par la migration des lymphocytes B du péritoine vers la muqueuse digestive. On retrouve également des cellules présentatrices d'antigènes (granulocytes, macrophages cellules dendritiques) d'origine péritonéale dans les plaques de Peyer de la paroi intestinale (28).

Dans la littérature, les pourcentages relatifs de chaque type de lymphocyte sont variables. Sorensen *et al.* ont comparé récemment les populations lymphocytaires du liquide péritonéal et de l'épiploon (40). Ces notions obtenues chez la souris devront être confirmées chez l'homme.

Le péritoine paraît être un organe lymphoïde secondaire. Chez l'animal, certaines des cellules impliquées dans la destruction de tumeur située au niveau d'un membre seraient formées dans le péritoine. Ces notions sont confirmées par des notions plus récentes concernant l'épiploon, et discutées plus loin (41).

Épiploon

L'épiploon, formé par une double assise de cellules mésothéliales et composé essentiellement d'adipocyte, n'est le siège d'aucun mouvement spontané (2, 34, 40). Ses « déplacements » sont la conséquence des mouvements péristaltiques de l'intestin et des mouvements respiratoires du diaphragme. Le rôle de l'épiploon ne se limite pas à un rôle d'adhérence et d'exclusion des zones anormales. Son rôle immunitaire tient aux taches laiteuses identifiées par Ranvier en 1874. Ces « milky spots » sont le siège de concentrations de cellules immunes comportant des éléments lymphoïdes et des éléments myéloïdes. Ces structures dynamiques peuvent à la suite de stimuli inflammatoires augmenter en taille et en nombre et produire de plus nombreux leucocytes. Il s'agit de la principale source de macrophages péritonéaux, et d'un site de différenciation des populations lymphocytaires du péritoine. Les populations cellulaires des taches laiteuses « au repos » se composent de 70 % de macrophages à différents stades de leur différenciation, de 10 % de cellules T, 10 % de cellules B et de mastocytes. Plus récemment, Carlow *et al.* ont montré la présence de cellules B1, B2, de mastocytes et de cellules dendritiques (42). Sorensen a rapporté une analyse détaillée des populations leucocytaires retrouvées dans l'épiploon de souris (40). Ces populations sont peu différentes de celles retrouvées dans la cavité péritonéale en dehors d'une augmentation du pourcentage de CD4. L'étude d'activation de ces cellules montre que l'épiploon contient un pourcentage de CD4 et CD8 activé plus important que dans d'autres sites tels que les ganglions ou la rate (40).

Lors des états de stimulation et en particulier d'inflammation, on assiste à une augmentation du nombre et de la taille des taches laiteuses au sein desquelles les zones de production de cellules B et T peuvent alors être distinguées. Il a été montré récemment que, chez le rat, l'activation de l'épiploon par un corps étranger induit une multiplication par 15 ou 20 du poids des « milky spots » et du nombre de vaisseaux sanguins. Les lymphocytes provenant des taches laiteuses rejoignent la cavité péritonéale grâce aux stoma présents à la surface des taches laiteuses. Les lymphocytes sanguins pouvaient rejoindre soit l'épiploon, soit directement la cavité péritonéale. Le passage dans l'épiploon serait plus rapide que dans la cavité péritonéale. Il existe de plus un passage entre l'épiploon et la cavité péritonéale et un passage en sens inverse. Carlow *et al.* rapportent la présence dans l'épiploon de cellules dendritiques qui peuvent induire une activation rapide de cellule T. Dans l'épiploon, les lymphocytes vont rencontrer des cellules myéloïdes. Cet organe pourrait être un site privilégié et proche de

présentation d'antigène et se comporte comme un organe lymphoïde secondaire qui permet le développement d'une immunité vis-à-vis d'antigènes apparus dans le péritoine (43).

Gerber *et al.* et Sorensen *et al.* suggèrent que les agrégats immuns de l'épiploon sont un siège privilégié de métastases et de croissance tumorale en raison de la présence d'un réseau capillaire, siège à l'état basal d'une activité angiogénique importante qui peut être expliquée par le fait qu'une partie des macrophages et des cellules mésothéliales de ces îlots est soumise à une hypoxie (44).

Mécanismes de défense anti-infectieuse

En cas d'infection bactérienne du péritoine, la disparition des bactéries de la cavité péritonéale débute avant l'afflux des cellules phagocytaires. Plusieurs mécanismes interviennent dans cette étape.

Afflux rapide de liquide dans le péritoine

L'afflux rapide de liquide dans le péritoine du fait d'une augmentation de la perméabilité vasculaire induite par la sécrétion de substances vaso-actives (histamine, prostaglandines) par les cellules mésothéliales et par les macrophages (45).

Afflux de liquide exsudat riche en protéines

Cet afflux de liquide qui est un exsudat riche en protéines permet :

- un « lavage » de la cavité péritonéale vers les stoma du diaphragme où les bactéries peuvent être absorbées, ce qui implique la mise en œuvre du système immunitaire systémique ;
- la formation de caillots et d'abcès (du fait de la présence de fibrinogène et de la disparition de l'activité fibrinolytique) avec en particulier la possibilité « d'adhérence » de l'épiploon sur le site de l'infection ;
- la mise en œuvre de mécanismes immunologiques, activation du complément, opsonisation dont les conséquences sur la phagocytose, l'amplification de la réaction inflammatoire, le rôle chimiotactique et la lyse cellulaire sont connus.

Rôle des macrophages résidents

Les macrophages résidents ont un rôle de phagocytose soit après opsonisation, soit sans opsonisation pour certains germes tels que *Escherichia coli* (2). L'action de phagocytose des macrophages dépend de la localisation de la bactérie, il semble que la phagocytose des bactéries adhérentes aux cellules mésothéliales ne soit pas possible. Les macrophages ont un rôle dans la sécrétion d'interleukines (IL1, TNF alpha, etc.) et de facteurs

chimiotactiques (IL8, etc.). Leur rôle a été confirmé par le travail de Cailhier *et al.* (32).

Afflux des polynucléaires

Le traumatisme péritonéal est suivi d'une modification rapide des populations cellulaires du péritoine dont le nombre augmente de 1 à 10, avec afflux très rapide de polynucléaires. En une heure, les macrophages résidents semblent « disparaître » des liquides recueillis. Les modifications des populations cellulaires sont expliquées par les phénomènes suivants.

Rôle des cellules mésothéliales

Le rôle des cellules mésothéliales dans ce flux de polynucléaire est suggéré par plusieurs arguments nous l'avons déjà décrits plus haut.

L'importance relative des différents moyens de défense du péritoine a été évaluée. Dunn *et al.* ont montré, chez l'animal, après injection d'un inoculum d'*Escherichia coli* que la moitié des bactéries était éliminée mécaniquement par l'afflux de liquide et les stoma du diaphragme et que un tiers sont phagocytées par les macrophages résidents. Puis le nombre de bactéries augmente à nouveau jusqu'à l'afflux de polynucléaire et leur intervention dans la phagocytose (46). Au-delà de cette phase, l'afflux des monocytes sanguins qui se différencient en macrophages survient vers le 4^e ou 5^e jour et joue un rôle essentiel dans la résolution de l'inflammation. Une contamination péritonéale bactérienne préalable à l'infection augmente la formation d'abcès et diminue la mortalité (47). Le rôle des différents médiateurs impliqués dans le recrutement et l'activation des leucocytes a été revu récemment (48).

Cicatrisation péritonéale

La cicatrisation péritonéale ne se fait pas à partir de la périphérie de la lésion. Plusieurs arguments expérimentaux justifient cette conclusion. La cicatrisation survient dans les mêmes délais pour des lésions de 2 x 2 cm et de 0,5 x 0,5 cm (2, 49). L'ensemble de la surface lésée est épithélialisée en même temps. La cicatrisation péritonéale physiologique se fait sans adhérences, dans un délai de 5 à 8 jours.

Les étapes du processus de cicatrisation sont connues. À la suite du traumatisme, la réaction inflammatoire locale conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire, à la formation d'un exsudat inflammatoire puis d'une matrice de fibrine qui permet l'adhésion éventuelle des deux surfaces péritonéales. Pour la plupart des auteurs, la différence entre les phénomènes physiologiques

et pathologiques tient dans la différence de cinétique de la dégradation de la fibrine. Si le processus de dégradation de la fibrine se produit dans des délais normaux, la cicatrisation se produit sans adhérences. Si la dégradation de la matrice de fibrine ne survient pas assez rapidement, la fibrine est colonisée par des fibroblastes puis la formation de collagène et de vaisseaux conduit à des adhérences définitives.

En fait, de nombreuses questions persistent dans la compréhension de ces phénomènes.

Diminution ou insuffisance de l'activité fibrinolytique ?

Habituellement, on considère que l'insuffisance de l'activité fibrinolytique est la résultante d'une diminution de l'activité de tPA et d'une augmentation de PAI-1. Ce modèle a été contesté par des travaux qui suggèrent que l'activité fibrinolytique serait insuffisante, vu l'augmentation très importante de la production de fibrine, plutôt que réellement diminuée (50).

Chronologie d'apparition des adhérences

Cette chronologie a été étudiée chez l'animal (50) avec un modèle de biopsie ovulaire à l'emporte-pièce du mésothélium et des couches musculaires sous-jacentes. Le pourcentage de la surface du défaut péritonéal recouvert par les adhérences était de 33 % ± 47 % à 2 heures, 44 ± 37 % à 4 heures, 75 ± 38 % à 8 heures et de 83 ± 24 % à 72 heures. Dans un autre travail réalisé avec le même modèle, les résultats étaient de 89,6 ± 5,1 % à 1 jour, 93,8 ± 6,8 % à 3 jours et de 75 ± 13 % à 1 an.

D'où viennent les cellules mésothéliales ?

S'agit-il des cellules fusiformes retrouvées dans la couche profonde, de cellules qui divisent en périphérie et qui flotteraient ensuite dans le liquide péritonéal, de cellules provenant de surfaces situées en regard de la zone traumatisée ? S'agit-il plus simplement de la différenciation de cellules souches présentes dans ce tissu ou du changement de phénotype de cellules mésothéliales (2, 8, 9, 27) ?

Formation des adhérences, le rôle du patient

Holmdahl *et al.* ont suggéré que le patient semble avoir un rôle dans la formation des adhérences postopératoires. Lors de réinterventions, chez les patients porteurs d'adhérences sévères, la concentration péritonéale en PAI-1 était 10 fois plus éle-

vée au début de l'intervention que chez les patients qui n'avaient que peu ou pas d'adhérences (51).

Rôle des fibroblastes de l'adhérence

Les travaux de Saed *et al.* suggèrent que les fibroblastes du péritoine normal et les fibroblastes des adhérences ont un comportement différent *in vitro* dans des conditions d'hypoxémie (52). La formation et la récurrence d'adhérences doivent donc faire l'objet de travaux distincts.

Faut-il deux traumatismes pour induire une adhérence ?

Il semble que oui. Chez la souris, entre deux cornes utérines suturées au contact l'une de l'autre, le pourcentage d'adhérences induites était de 13 % lorsqu'une seule corne utérine avait été traumatisée et de 59 % lorsque les deux cornes utérines avaient été traumatisées (53).

Liquide péritonéal et infertilité

Depuis de très nombreuses années, le rôle du liquide péritonéal a été évoqué dans l'étiologie de certaines infertilités en particulier dans le cadre de l'endométriose. Ces modifications du liquide péritonéal peuvent être impliquées dans la croissance du tissu endométrial ectopique et dans l'infertilité que l'on rencontre très souvent chez ces patientes. La grande variabilité des formes cliniques de la maladie et les variations dues au cycle menstruel expliquent les résultats quelquefois contradictoires et les écarts types importants qui ont été rapportés. Par exemple, on ne sait pas clairement si le volume de liquide est plus élevé chez les patientes qui ont une endométriose. L'étude de ces modifications a été entreprise avec des technologies complexes de protéomique. Les premiers résultats sont intéressants mais devront être confirmés par d'autres travaux (54). Le nombre de protéines identifiées chez les patientes endométriosiques et dans le groupe contrôle n'était pas significativement différent. À l'inverse, l'expression de certaines protéines était quantitativement différente dans les deux groupes, en particulier l'expression de certaines protéines impliquées dans la réaction inflammatoire était augmentée. De manière un peu surprenante, ces auteurs ne rapportent pas de modification en fonction de la phase du cycle menstruel (54).

Rares sont les études qui ont étudié le contenu du liquide péritonéal avec des conditions de prélèvements standardisées et surtout en utilisant une

description précise des lésions endométriosiques et en particulier de l'aspect des implants péritonéaux. Un travail très récent qui montre que l'incubation des embryons et des ovocytes dans du liquide péritonéal de patientes endométriosiques induit des dégâts sur les microtubules ovocytaires et augmente l'apoptose dans les embryons décrit les patientes endométriosiques en utilisant que leur nombre (55). Il n'est fait mention ni de l'aspect des lésions péritonéales, ni de la période précise du cycle. Il est cependant intéressant de noter que les effets du liquide péritonéal sur les ovocytes et sur l'embryon peuvent être prévenus en ajoutant de la L-carnitine au liquide péritonéal, effet qui pourrait être dû aux propriétés antioxydantes de ce produit (55).

Le rôle du stress oxydatif du liquide péritonéal dans l'infertilité « péritonéale » des patientes porteuses d'une endométriose a été évoqué par de nombreux auteurs (56). En fait, cette modification du liquide péritonéal n'est que la conséquence de la présence de nombreuses cellules immunes activées et en particulier de macrophages qui produisent des radicaux libres en particulier du NO. Ce composé, impliqué dans la régulation de l'apoptose, perturbe la mobilité de la trompe et des spermatozoïdes et serait toxique pour l'embryon et inhiberait l'implantation. La présence de nombreux polynucléaires leucocytes et macrophages activés conduit à une augmentation de la production de ROS. Même si tous les résultats publiés ne sont pas concordants, un rôle de ce système dans l'infertilité associée à l'endométriose est probable. Ce mécanisme pourrait fournir une nouvelle approche thérapeutique de l'infertilité et a conduit à la mise en place d'essais prospectifs randomisés sur l'utilisation d'immunomodulateurs et d'antioxydants dans la prise en charge post opératoire de l'infertilité (57). De manière intéressante, les antioxydants pourraient avoir un rôle dans le traitement de la maladie comme le suggère le travail publié récemment par le groupe de Chapron (58).

Le rôle précis du liquide péritonéal dans la reproduction physiologique est mal connu (1). L'ovocyte, l'embryon et les spermatozoïdes sont-ils en contact direct avec ce liquide dans tous les cas ? On sait depuis les essais cliniques de fécondation intrapéritonéale menés au début des techniques de PMA que la fécondation dans ce liquide est possible (1). Mais on sait mal si la capture de l'ovocyte par le pavillon se produit au moment de l'ovulation au niveau du stigma d'ovulation ou plus tard après un passage dans le liquide péritonéal. Cette dernière situation est possible puisque l'on connaît des GEU qui surviennent dans la trompe opposée au corps jaune. Mais est-elle possible dans le cas d'une grossesse normale ?

Références

- Hunter RH, Cicinelli E, Einer-Jensen N (2007) Peritoneal fluid as an unrecognised vector between female reproductive tissues. *Acta Obstet Gynecol Scand* 86: 260-7
- Canis M, Botchorishvili R, Rabischong B *et al.* (2002) Péritoine. *Encycl Med Chir (Paris, Elsevier)* 75-A-10, 11 p
- Albanese AM, Albanese EF, Miño JH *et al.* (2009) Peritoneal surface area: measurements of 40 structures covered by peritoneum: correlation between total peritoneal surface area and the surface calculated by formulas. *Surg Radiol Anat* 31: 369-771
- Flessner MF (2009) Peritoneal ultrafiltration: physiology and failure. *Contrib Nephrol* 163: 7-14
- Di Paolo N, Sacchi G (2000) Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 20 (Suppl 3): S5-9
- Michailova KN, Usunoff KG (2006) Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 183: i-vii, 1-14
- Mutsaers SE (2004) The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 9-16
- Herrick SE, Mutsaers SE (2004) Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 621-42
- Herrick SE, Mutsaers SE (2007) The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Int J Artif Organs* 30: 527-40
- Yániz JL, Recreo P, Carretero T, Arceiz E, Hunter RH, López-Gatius F (2007) The peritoneal mesothelium covering the genital tract and its ligaments in the female pig shows signs of active function. *Anat Rec (Hoboken)* 290: 831-7
- Yung S, Chan TM (2007) Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities. *Perit Dial Int* 27 (Suppl 2): S104-9
- McCully ML, Madrenas J (2006) Dendritic cells as arbiters of peritoneal immune responses. *Perit Dial Int* 26: 8-25
- Maathuis JB, Van Look PF, Michie EA. Changes in volume, total protein and ovarian steroid concentrations of peritoneal fluid throughout the human menstrual cycle. *J Endocrinol.* 1978;76:123-33.
- Koninckx PR, Renaer M, Brosens IA (1980) Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 177-83
- Donnez J, Langerock S, Thomas K (1982) Peritoneal fluid volume and 17 beta-estradiol and progesterone concentrations in ovulatory, anovulatory, and postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 59: 687-92
- Cicinelli E, Einer-Jensen N, Hunter RH *et al.* (2009) Peritoneal fluid concentrations of progesterone in women are higher close to the corpus luteum compared with elsewhere in the abdominal cavity. *Fertil Steril* 92: 306-10
- Ramey JW, Archer DF (1993) Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril* 60: 1-14
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH (1999) Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest* 47: 23-33
- Bricou A, Batt RE, Chapron C (2008) Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138: 127-34
- Flessner MF (1999) Changes in the peritoneal interstitium and their effect on peritoneal transport. *Perit Dial Int* 19: S77-S82
- Zakaria ER, Lofthouse J, Flessner MF (1999) In vivo effects of hydrostatic pressure on interstitium on abdominal wall muscle. *Am J Physiol* 276: H517-H529
- Flessner MF (2008) Distributed model of peritoneal transport: implications of the endothelial glycocalyx. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2142-6
- Blake PG (2008) Challenging the three-pore model. *Perit Dial Int* 28: 3-4
- Numata M, Nakayama M, Nimura S, Kawakami M, Lindholm B, Kawaguchi Y (2003) Association between an increased surface area of peritoneal microvessels and a high peritoneal solute transport rate. *Perit Dial Int* 23: 116-2
- Broche F, Tellado JM (2001) Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* 7: 105-16
- Olszewski WL, Kubicka U, Tarnowski W, Bielecki K, Ziolkowska A, Wesolowska A (2007) Activation of human peritoneal immune cells in early stages of gastric and colon cancer. *Surgery* 141: 212-21
- Glik A, Douvdevani A (2006) T lymphocytes: the "cellular" arm of acquired immunity in the peritoneum. *Perit Dial Int* 26: 438-4
- Heel KA, Hall JC (1996) Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg* 83: 1031-6
- Syrop CH, Halme J (1987) Cyclic changes of peritoneal fluid parameters in normal and infertile patients. *Obstet Gynecol* 69: 416-8
- Holmes CJ (1994) Peritoneal host defense mechanisms in peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl* 48: S58-70
- Bacci M, Capobianco A, Monno A *et al.* (2009) Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* 175: 547-56
- Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S *et al.* (2005) Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 174: 2336-42
- Terasawa M, Nagata K, Kobayashi Y (2008) Neutrophils and monocytes transport tumor cell antigens from the peritoneal cavity to secondary lymphoid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 589-94
- Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J *et al.* (2001) Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol* 167: 1028-38
- Witowski J, Thiel A, Dechens R *et al.* (2001) Synthesis of C-X-C and C-C chemokines by human peritoneal fibroblasts: induction by macrophage-derived cytokines. *Am J Pathol* 158: 1441-50
- Kubicka U, Olszewski WL, Tarnowski W, Bielecki K, Ziolkowska A, Wierzbicki Z (1996) Normal human immune peritoneal cells: subpopulations and functional characteristics. *Scand J Immunol* 44: 157-63
- Canis M, Matsuzaki S, Bourdel N *et al.* (2007) Peritoneum and laparoscopic environment *Bull Cancer* 94: 1043-51
- Berberich S, Dähne S, Schippers A *et al.* (2008) Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J Immunol* 180: 2196-203
- Berberich S, Förster R, Pabst O (2007) The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. *Blood* 109: 4627-3
- Sorensen EW, Gerber SA, Sedlacek AL, Rybalko VY, Chan WM, Lord EM (2009) Omental immune aggregates and tumor metastasis within the peritoneal cavity. *Immunol Res* 183 (in press)
- Mitra R, Dharajiya N, Kumari L, Varalakshmi C, Khar A (2004) Migration of antigen presenting cells from periphery to the peritoneum during an inflammatory response: role of chemokines and cytokines. *FASEB J* 18: 1764-6
- Carlow DA, Gold MR, Ziltener HJ (2009) Lymphocytes in the peritoneum home to the omentum and are activated by resident dendritic cells. *J Immunol* 183: 1155-65
- Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM *et al.* (2009) Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 30: 731-43

44. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE *et al.* (2006) Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol* 169: 1739-52
45. Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM, Platell C (1998) The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology* 114: 185-96
46. Dunn DL, Barke RA, Knight NB, Humphrey EW, Simmons RL (1985) Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from the peritoneal cavity. *Infect Immun* 49: 257-64
47. Sawyer RG, Adams RB, Spengler MD, Pruett TL (1991) Preexposure of the peritoneum to live bacteria increases later mixed intraabdominal abscess formation and delays mortality. *J Infect Dis* 163: 664-7
48. van Till JW, van Veen SQ, van Ruler O, Lamme B, Gouma DJ, Boermeester MA (2007) The innate immune response to secondary peritonitis. *Shock* 28: 504-17007
49. Ellis H, Harisson W, Hugh TB. The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br J Surgery* 1965;52:471-476.
50. Hellebrekers BWJ, Trimbo-Kemper TCM *et al.* (2000) Short term effect of surgical trauma on rat peritoneal fibrinolytic activity and its role in adhesion formation. *Thromb Haemost* 84: 876-8
51. Ivarsson ML, Bergstrom M, Eriksson E, Risberg B, Holmdahl L (1998) Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br J Surg* 85: 1549-54
52. Saed GM, Zhang W, Diamond MP (2001) Molecular characterization of fibroblasts isolated from human peritoneum and adhesions. *Fertil Steril* 75: 763-8
53. Haney AF, Doty E (1994) The formation of coalescing peritoneal adhesions requires injury to both contacting peritoneal surfaces. *Fertil Steril* 61: 767-75
54. Ferrero S, Gillott DJ, Remorgida V, Anserini P, Ragni N, Grudzinskas JG (2009) Proteomic analysis of peritoneal fluid in fertile and infertile women with endometriosis. *J Reprod Med* 54: 32-40
55. Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A (2009) The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril* 92: 61-7
56. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A (2008) Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 90: 247-57
57. Lv D, Song H, Li Y, Clarke J, Shi G (2009) Pentoxifylline versus medical therapies for subfertile women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 8: CD007677
58. Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F (2009) Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 175: 225-3

II Épidémiologie et aspects médico-légaux

F. Eustache

Épidémiologie de la fertilité masculine

Évolution de la qualité du sperme au cours des dernières décennies

Introduction

Au cours des dernières décennies, une détérioration de la fonction de reproduction mâle a été rapportée dans de nombreuses espèces (1). La plupart des observations ont été faites dans la faune sauvage. Dans de nombreux cas, il existe un lien avec une pollution de l'environnement. Parmi les milliers de composés chimiques issus des activités humaines, ont particulièrement été mis en cause des composés industriels (phtalates, biphenyls polychlorés (PCB), bisphénol A, etc.) et de l'agriculture (par exemple, le 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) éthane, DDT, de nombreux herbicides et fongicides) qualifiés de xénohormones ou de perturbateurs endocriniens (PE). Des anomalies variées du développement de l'appareil reproducteur et de la fonction de reproduction mâle ont été observées suite à une exposition aux PE chez divers animaux comme les alligators d'un lac de Floride contaminé par du DDT (2) et, dans la même région, les panthères mâles (3), les poissons de plusieurs rivières anglaises (4)...

Comme dans la faune sauvage, il y aurait aussi une possible augmentation des anomalies de l'appareil génital masculin comme l'hypospadias et la cryptorchidie (5). Pour ces deux anomalies, il est difficile de disposer de données incontestables en raison du problème de la fiabilité des différents registres, des critères diagnostiques utilisés pas toujours précisés ou encore, dans le cas de la cryptorchidie, de l'âge auquel a été réalisé l'examen clinique (6). Cependant, concernant la cryptorchidie, une étude récente parfaitement standardisée réalisée au Danemark et en Finlande a montré des différences géographiques de la prévalence, 9,0 % vs 2,4 % à la naissance, et 1,9 % vs 1,0 % à 3 mois, respectivement (7).

L'augmentation de l'incidence du cancer du testicule dans la plupart des pays industrialisés au cours des dernières décennies est une donnée beaucoup moins controversée (8). Il est devenu au cours

des dernières décennies le cancer le plus fréquent observé chez l'homme entre 20 et 40 ans (9). L'augmentation annuelle de l'incidence est de 2 à 5 % par an en Europe occidentale avec des différences géographiques notables, par exemple, 2,5/100 000 en Finlande vs 9,2/100 000 au Danemark (9).

Existe-t-il aussi des anomalies du sperme et de la fertilité des hommes ?

Études rétrospectives

En 1992, une équipe danoise a publié une méta-analyse reprenant les données de 61 articles rapportant les valeurs des caractéristiques spermatiques d'environ 15 000 hommes en bonne santé de 1940 à 1990 (10). Selon les auteurs, il existait une baisse très significative de la concentration moyenne de spermatozoïdes au cours de cette période, $113 \times 10^6/\text{mL}$ en 1940 vs $60 \times 10^6/\text{mL}$ en 1990, soit une baisse de presque 50 % en 50 ans (fig. 1a). Cette étude a suscité de nombreux commentaires scientifiques, des débats médiatiques ainsi que plusieurs réanalyses affinées des données (11-14). De nombreux biais ont été évoqués, par exemple : études réalisées dans des zones géographiques différentes (28 études réalisées aux États-Unis, 17 en Europe, 7 en Asie, 5 en Afrique, 3 en Amérique du Sud et 1 en Australie), hommes fertiles ou consultant pour infertilité, effectifs des différentes études très variables (de 7 à 4 435 hommes), données manquantes dans certaines périodes (la plupart des études étant réalisée entre la fin des années 1970 et 1990), non-prise en compte de certains facteurs connus pour moduler la concentration (délai d'abstinence, méthodes d'analyse du sperme différentes d'un laboratoire à un autre, etc.), inadéquation de la méthodologie statistique.

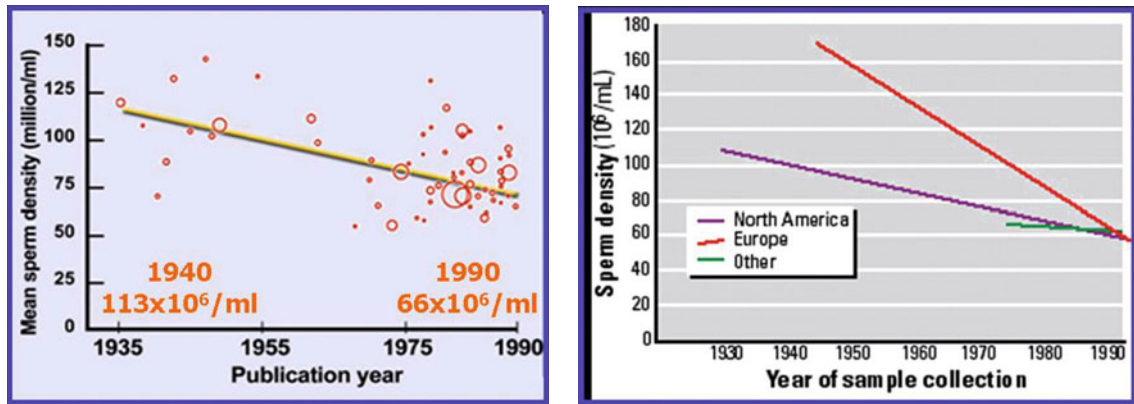


Fig. 1 – Déclin de la concentration spermatique au cours des 50 dernières années. **a.** Étude initiale à partir de 61 publications parues entre 1938 et 1990 rapportant une baisse significative de la concentration de l'ordre de 50 % en 50 ans (données mondiales brutes ; chaque cercle correspond à une publication, la taille est proportionnelle à l'effectif de l'étude), d'après Carlsen *et al.* (10). **b.** Réanalyse de ces données tenant compte de tous les facteurs d'ajustement possibles confirmant les conclusions initiales pour les études nord américaines et européennes, d'après Swan *et al.* (14).

La réanalyse récente des données par Swan *et al.* (14), excluant les études jugées insuffisamment fiables, incluant une vingtaine d'études parues depuis la publication de Carlsen *et al.*, et prenant en compte le plus de facteurs d'ajustement possible, a confirmé la baisse significative de la concentration spermatique, à la fois aux États-Unis et en Europe (fig. 1b).

L'équipe du CECOS de l'hôpital de Bicêtre, transférée depuis à Cochin, faisait partie de ceux qui avaient affiché leur scepticisme suite à la publication danoise, elle a donc entrepris l'analyse des caractéristiques du sperme des hommes qui avaient été candidats à un don de sperme depuis 1973 dans ce centre. L'intérêt de cette approche était de pouvoir étudier une population non sélectionnée et très homogène d'hommes féconds recrutés dans les mêmes conditions au fil des ans et ayant, à peu près, le même âge. Les résultats, aussi surprenant que spectaculaires, ont conclu à une baisse tout à fait significative des caractéristiques du sperme, au moins chez les hommes féconds vivant dans la région parisienne. De 1973 à 1994, la chute de la concentration des spermatozoïdes avait été de l'ordre de 1,6 % par an en moyenne. Le nombre total de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat, qui est un meilleur reflet de la production testiculaire, avait diminué d'un tiers pendant la même période. Enfin, à ces modifications quantitatives s'ajoutaient des modifications qualitatives de la production des spermatozoïdes se manifestant par une diminution de la proportion de cellules mobiles et morphologiquement normales (15). Une vingtaine d'études rétrospectives faites dans un seul centre ont été publiées avec des résultats très contrastés : diminution (15-17) ou absence de modification (18, 19). Toutes ces études étaient réalisées à partir de populations

diverses : candidats au don de sperme, donneurs pour la recherche, partenaires de femmes ayant une stérilité tubaire ou encore hommes infertiles (posant le problème majeur d'un biais de sélection accrue).

Grâce au réseau des CECOS, les variations géographiques de la qualité du sperme d'hommes féconds en bonne santé dans huit villes françaises ont pu aussi être étudiées avec une approche limitant l'impact de plusieurs facteurs de confusion (20). L'analyse a permis de mettre en évidence des différences significatives des caractéristiques du sperme d'un centre à un autre (par exemple, nombre total de spermatozoïdes le plus élevé à Lille, 398×10^6 et le plus bas à Toulouse, 259×10^6).

Une étude dans trois villes des États-Unis utilisant une méthodologie d'analyse proche mais portant sur différents groupes d'hommes a indiqué l'existence de variations importantes de la concentration (21).

L'analyse du sperme : un examen fortement subjectif

Si l'âge ou le délai d'abstinence avant le prélèvement de sperme sont des facteurs modulant les caractéristiques du sperme comme précédemment évoqués, la méthodologie d'analyse du sperme constitue en elle-même un autre facteur de biais souvent évoqué dans les études sur la variation temporelle de la qualité du sperme (22). L'analyse du sperme est subjective par nature car elle repose intégralement sur l'observation microscopique et donc sur le facteur humain. De plus, malgré des efforts importants de standardisation au cours de la dernière décennie (23), elle ne fait toujours pas l'objet de procédures optimales utilisées de manière

universelle. Toutes ces difficultés rendent difficiles les comparaisons entre laboratoires, qu'il s'agisse d'évaluation clinique ou de recherche. Pour ces raisons, le contrôle de qualité de la phase analytique apparaît encore plus nécessaire dans ce domaine que dans tous les autres domaines de la biologie.

Existe-t-il d'autres marqueurs pour évaluer les évolutions temporelles et les différences régionales de la fertilité pouvant dépendre des conditions environnementales et du mode de vie ?

Il n'existe malheureusement pas d'autre indicateur biologique sensible de la fertilité masculine. Par exemple, le dosage plasmatique des hormones sexuelles qui selon le principe de mesure donne des résultats précis et reproductibles est de peu d'utilité car il existe une variabilité interindividuelle importante chez l'homme en bonne santé. L'étude de Jorgensen *et al.* (2002) en population générale avait retrouvé des différences pour la qualité du sperme entre plusieurs villes nordiques sans avoir de différence pour les dosages hormonaux (24).

À côté des indicateurs biologiques de fertilité, le délai nécessaire à concevoir (DNC) se définissant comme le nombre de cycles sans contraception nécessaire à un couple pour concevoir est un indicateur épidémiologique sensible qui a été utilisé dans de nombreuses études. Il reflète la fertilité des deux partenaires et peut être recueilli de manière prospective mais aussi rétrospectivement (chez la femme) jusqu'à une vingtaine d'années en arrière avec une mémorisation satisfaisante (25). Mais son estimation rétrospective exclut souvent les moins féconds, les couples restant sans enfant entraînant un biais et une diminution de la puissance statistique. Les approches prospectives et transversales ne devraient pas avoir ces limites. L'évolution du DNC a été étudiée en Angleterre de 1961 à 1993 : il a été surprenant d'observer que le DNC diminuait avec les années (26). Il a également été utilisé pour comparer la fertilité de populations géographiquement distinctes (27), pour étudier un lien possible avec certains facteurs d'exposition professionnelle de l'homme (28).

Études transversales

Il était donc nécessaire de développer d'autres approches scientifiques. Pour mettre en évidence d'éventuelles modifications de la fonction génitale des hommes liées à l'environnement, il est aussi

possible de chercher s'il existe des variations géographiques de la production des spermatozoïdes et de la qualité du sperme. La première recherche programmée de manière spécifique sur le sujet, a été financée par l'Union européenne. Elle a été menée dans quatre villes européennes : Turku en Finlande, Copenhague, Edimbourg et Paris. Les hommes recrutés étaient tous partenaires de femmes enceintes, donc ayant fait récemment la preuve, en principe, de leur fertilité. Les méthodes d'analyse de sperme utilisées dans les quatre centres étaient standardisées et ont fait l'objet d'un contrôle de qualité. Les principaux facteurs susceptibles de biaiser les résultats, comme l'âge ou le délai d'abstinence sexuelle précédant l'examen, ont pu être pris en compte dans l'analyse. Cette étude a mis en évidence des différences importantes de la quantité des spermatozoïdes, qui était la plus faible à Copenhague et la plus élevée à Turku (fig. 2) (29). En procédant à une analyse détaillée ville par ville, on a trouvé que par rapport à Turku le nombre de spermatozoïdes était significativement plus bas dans les trois autres villes, par contre la mobilité des spermatozoïdes était plus faible à Paris que dans les autres villes. Une variation saisonnière était également rapportée (fig. 2) (29). Une étude similaire a été menée aux États-Unis et elle a montré que la concentration spermatique était significativement plus basse à Columbia (Missouri) qu'à New York, Minneapolis et Los Angeles (30). Il existe donc des arguments solides en faveur d'une variation géographique de la production de spermatozoïdes, mais qu'en est-il de la fertilité ? Dans l'étude européenne, le DNC a pu aussi être mesuré. Il est intéressant de noter que les différences du nombre de spermatozoïdes qui avaient été trouvées ne se sont pas accompagnées de différence similaire du DNC. Seuls les couples parisiens avaient une probabilité de conception significativement plus faible qu'à Edimbourg et Copenhague quand les valeurs

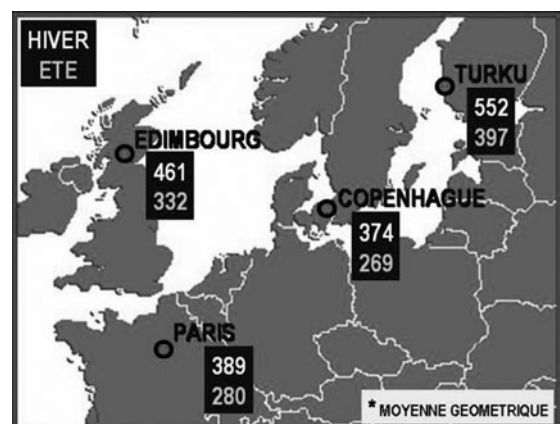


Fig. 2 – Nombre total de spermatozoïdes (10^6) chez un homme de 30 ans avec une abstinence sexuelle de 4 jours dans les quatre villes en hiver et en été.

étaient ajustées en fonction de l'âge, de la parité, de la fréquence des rapports sexuels mais aussi en fonction de plusieurs autres paramètres liées à la fertilité féminine (31).

Il est important de noter que ces études transversales sont souvent caractérisées par un faible taux de participation à l'origine de biais de sélection devant être caractérisé et pris en compte (32).

Les études danoises récentes sur la qualité du sperme reposent sur le recrutement d'hommes jeunes, conscrits, population dans laquelle un biais de sélection dépendant de la fertilité a été écarté (33, 34). Elles indiquent qu'une proportion importante des hommes danois, soit environ 20 %, se présentent avec une qualité spermatique faible (35), à des valeurs où la probabilité de grossesse est affectée. Une telle situation n'est observée ni en Suède, ni en Finlande, pays voisins. Tout ceci renforce l'idée de l'existence d'une hétérogénéité géographique de la qualité du sperme.

Existe-t-il un lien entre la baisse de la qualité du sperme, le cancer du testicule et les autres anomalies du tractus génital ?

S'appuyant sur les données relatives à la baisse de la qualité spermatique, à l'augmentation de la fréquence du cancer du testicule, de la cryptorchidie et de l'hypospadias, l'équipe de Skakkebaek (2001) a proposé l'hypothèse que ces différents symptômes se rapportent tous à une entité fondamentale, le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) (fig. 3) (36).

Facteurs en cause

Parmi les facteurs en cause on distingue les facteurs génétiques, les facteurs biologiques, les facteurs socioculturels (stress), les facteurs physiques et les facteurs chimiques avec notamment les perturbateurs endocriniens (PE). Les sources d'exposition aux PE comme la nature des PE sont multiples. Les PE peuvent être présents dans les différents compartiments de l'environnement (aérien, aquatique, terrestre), mais également dans les aliments (d'origine animale ou végétale) ; ils peuvent provenir des emballages alimentaires, des produits de combustion, des traitements phytosanitaires, des détergents et de l'industrie chimique en général.

L'administration intempestive de diéthylstilbestrol (DES) a conduit de très nombreux enfants à être exposés *in utero* à une molécule à action estrogénique. Les conséquences pour les petites filles et les jeunes femmes sont connues, mais des effets ont

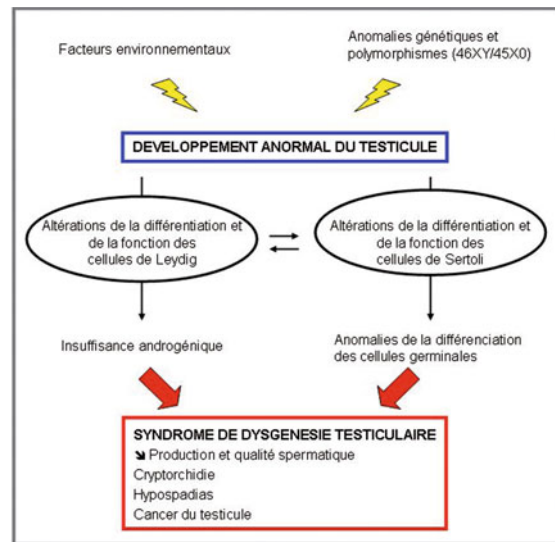


Fig. 3 – Le syndrome de dysgénésie testiculaire.

aussi été rapportés chez les garçons. Aucune baisse de la fertilité n'a été confirmée mais des modifications du sperme et d'autres pathologies génitales ont été observées (37). Des facteurs génétiques pourraient être à l'origine d'une susceptibilité individuelle variable aux hormones exogènes (38). Cependant, des études récentes ont montré que la présence de résidus de pesticides ou de phtalates dans les urines était liée à une plus faible concentration spermatique (39). De plus, les enfants d'ouvriers exposés professionnellement aux pesticides présentaient un risque accru de malformations génitales (40) et aussi dans des zones bien déterminées d'activité agricole intensive, une fréquence notablement augmentée de cryptorchidies (41) était observée. Une étude a reporté l'existence de taux élevés d'organochlorés dans le sang des mères dont le fils était atteint d'un cancer du testicule (42). Dernièrement, la présence de pesticides dans le placenta ou dans le lait maternel a été corrélée à l'existence de malformations urogénitales (43, 44).

Les modalités et les mécanismes précis des effets délétères des PE sur la fonction de reproduction mâle ne sont que partiellement connus. Ils pourraient agir à tous les périodes clés du développement. Toutes les études expérimentales réalisées pour mieux comprendre les mécanismes d'action des PE sont le plus souvent réalisées en étudiant une seule période du développement avec des doses de PE loin des doses environnementales. Récemment, il a été montré qu'une exposition de la conception à l'âge adulte, en utilisant de faible dose et plusieurs PE pouvaient avoir des effets plus importants qu'une seule molécule à plus forte dose (effet additif ?) (45). Si l'exposition aux PE constitue une des pistes majeures pour expliquer

les anomalies de la fonction de reproduction observées chez l'homme, il ne faut pas sous-estimer la multitude d'autres facteurs potentiellement nocifs auxquels l'homme est exposé tout au long de son développement. Des facteurs liés au mode de vie tels que la consommation de tabac, d'alcool ou encore le niveau de stress pourraient constituer d'autres modulateurs de la santé reproductive de l'homme (46) bien qu'il existe encore une controverse sur ces questions (47) qui pourrait dépendre des populations étudiées.

Effets transgénérationnels

Récemment, le suivi des familles des femmes ayant pris du Distilbène® a permis de mettre en évidence un effet de ce composé sur l'existence d'un hypospadias chez les enfants des femmes exposées *in utero* soit les petits enfants des femmes ayant pris le médicament (48). Cette étude est une des premières montrant l'effet d'une exposition sur trois générations.

Sans que la fertilité soit gravement menacée, les signes indiquant que les qualités du sperme se modifient et les pathologies génitales augmentent sont suffisamment nombreux pour que l'on cherche à mieux préciser la réalité du phénomène et ses causes. Bien que les liens de causalité soient trop faibles pour incriminer la responsabilité de produits chimiques présents dans l'environnement, il semble légitime d'adopter des stratégies de précaution cherchant à diminuer voire à supprimer le risque d'exposition à certaines substances potentiellement toxiques. Des mesures de précaution peuvent être prises individuellement par exemple pendant la grossesse, mais aussi collectivement pour une évaluation plus systématique des risques dans le but de les prévenir.

Références

1. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P *et al.* (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect Suppl* 4: 741-801
2. Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR *et al.* (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102: 680-8
3. Facemire CF, Gross TS, Guillette LJ Jr (1995) Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect* 103: 79-86
4. Matthiessen P, Sumpter JP (1998) Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. *EXS* 86: 319-335
5. Danish Environmental Protection Agency. Ministry of Environment and Energy, Denmark. Male Reproductive Health and Environmental Chemicals with Estrogenic Effect. (1995) Miljøprojekt nr 290
6. Toppari J, Kaleva M, Virtanen H (2001) Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 7: 282-6
7. Boisen KA, Kaleva M, Main KM *et al.* (2004) Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 17: 1264-9
8. Adami H, Bergstrom R, Mohnner M *et al.* (1994) Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59: 33-8
9. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P (2003) Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 170: 5-11
10. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-13
11. Bromwich P, Cohen J, Stewart I, Walker A (1994) Decline in sperm counts: an artefact of changed reference range of "normal"? *Br Med J* 309: 19-22
12. Keiding N, Giwercman A, Carlsen E, Skakkebaek NE (1994) Importance of empirical evidence (commentary). *Br Med J* 309: 22
13. Swan SH, Elkin EP, Fenster L (1997) Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105: 1228-32
14. Swan SH, Elkin EP, Fenster L (2000) The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 108: 961-6
15. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the last 20 years. *New Engl J Med* 332: 281-5
16. Adamopoulos D, Pappa A, Nicopoulou S *et al.* (1996) Sperm volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod* 11: 1936-41
17. Irvine DS, Cawood E, Richardson D *et al.* (1996) Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study of 577 men in Scotland over 11 years. *Br Med J* 312: 467-70
18. Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R (1996) Sperm concentration in donor 1977-1992 in Toulouse, France. *BMJ* 312: 471-2
19. Vierula M, Keiski A, Saarinen M, Saarikoski S, Suominen J (1996) High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int J Androl* 19: 11-7
20. Auger J, Jouannet P (1997) Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. *Fédération Française des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod* 12: 740-5
21. Fisch H, Goluboff ET (1996) Geographic variations in sperm counts: a potential bias in studies on semen quality. *Fertil Steril* 65: 1044-6
22. Tummon IS, Mortimer D (1992) Decreasing quality of semen. *BMJ* 14: 1228-9
23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press (1999)
24. Jørgensen N, Carlsen E, Nermoen I *et al.* (2002) East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 17: 2199-208
25. Joffe M, Villard L, Li Z *et al.* (1993) Long-term recall of time-to-pregnancy. *Fertil Steril* 60: 99-104
26. Joffe M (2000) Time trends in biological fertility in Britain. *Lancet* 355: 1961-5
27. Joffe M (1996) Decreased fertility in Britain compared with Finland. *Lancet* 347: 1519-22

28. Joffe M, Bisanti L, Apostoli P *et al.* (2003) Time To Pregnancy and occupational lead exposure. *Occup Environ Med* 60: 752-8
29. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F *et al.* (2001) Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 16: 1012-19
30. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ *et al.* (2003) Study For Future Families Research Group. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 111: 414-20
31. Slama R, Eustache F, Ducot B *et al.* (2002) Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 17: 503-15
32. Eustache F, Auger J, Cabrol D, Jouannet P (2004) Are volunteers delivering semen samples in fertility studies a biased population? *Hum Reprod* 19: 2831-7
33. Richthoff J, Rylander L, Hagmar L *et al.* (2002) Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. *Hum Reprod* 17: 2468-73
34. Andersen AG, Jørgensen N, Andersson AM *et al.* (2000) Serum levels of testosterone do not provide evidence of selection bias in studies of male reproductive health. *Epidemiology* 11: 232-4
35. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E *et al.* (2000) High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 2000 15: 366-72
36. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16: 972-8
37. Swan SH (2000) Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. *APMIS* 108: 793-804
38. Spearow JL, Doemeny P, Sera R *et al.* (1999) Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science* 20: 1259-61
39. Duty SM, Silva MJ, Barr DB *et al.* (2003) Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14: 69-77
40. Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek NE (1998) Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 106: 793-6
41. Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Nogueras-Ocana M *et al.* (1996) Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 104: 1090-5
42. Hardell L, van Bavel B, Lindström G *et al.* (2003) Increased Concentrations of Polychlorinated Biphenyls, Hexachlorobenzene, and Chlordanes in Mothers of Men with Testicular Cancer. *Environ Health Perspect* 111: 930-4
43. Damgaard IN, Skakkebaek NE, Toppari J *et al.* (2006) Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 114: 1133-8
44. Fernandez MF, Olmos B, Granada A *et al.* (2007) Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 115: 8-14
45. Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC *et al.* (2009) Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 117: 1272-9
46. Fenster L, Katz DE, Wyrobek AJ *et al.* (1997) Effects of psychological stress on human semen quality. *J Androl* 18: 194-202
47. Hjøllund NH, Bonde JP, Henriksen TB *et al.* (2004) Reproductive effects of male psychological stress. *Epidemiology* 15: 21-7
48. Palmer JR, Wise LA, Robboy SJ *et al.* (2005) Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Epidemiology* 16: 583-6

J. Belaisch-Allart

Épidémiologie de la fertilité féminine

Introduction

L'infertilité est définie pour l'Organisation mondiale de la santé (OMS) par l'absence de grossesse au bout de 24 mois de rapports sexuels réguliers non protégés chez les couples en âge de procréer (femme âgée de 18 à 45 ans). Après 2 ans, 5 % des couples sont dits infertiles avec un taux de grossesse spontanée proche de zéro (1).

En France, la prévalence de l'infertilité est estimée à 15 %, ce qui signifie qu'un couple sur six consulte au moins une fois dans sa vie pour une difficulté à procréer. Deux à 4 % des couples resteront sans enfant sans le désirer (2).

Le facteur épidémiologique qui ne cesse de prendre de l'importance dans les causes d'infertilité est l'âge des couples désirant un enfant. En Europe, l'âge de survenue de la première grossesse est de 29,5 ans, ce qui représente un recul de 2,5 ans en 20 à 30 ans et est responsable d'une diminution relative de la fertilité et d'une forte augmentation du nombre de couples ayant recours aux techniques d'AMP (3).

L'épidémiologie de la fertilité féminine est en effet dominée par le problème de la chute de la fertilité féminine avec l'âge. Malgré cette chute de la fertilité liée à l'âge, le recul de l'âge du désir d'enfant est un phénomène très général, qui touche toutes les femmes fertiles ou infertiles. Les progrès de la contraception, les études prolongées, le désir de faire carrière, l'instabilité du marché du travail, l'hostilité des employeurs à l'annonce d'une grossesse, tout se conjugue pour que les femmes programment de plus en plus tard leur grossesse. Sans compter celles qui ayant rencontré tôt (trop ?) l'homme de leur vie, à la quarantaine rencontrent un nouveau conjoint. À tous ces facteurs s'ajoutent l'ignorance voire le déni de la chute de la fertilité avec l'âge.

Les femmes, leurrées par le slogan de la contraception « un enfant quand je veux », dont nul ne

leur a donné la vraie interprétation « pas d'enfant tant que je n'en veux pas » repoussent l'âge de la maternité.

Quant à la chute de la fertilité masculine avec l'âge, elle est encore plus méconnue.

Âge et fertilité

Malgré l'existence d'une grande disparité inter-individuelle, la fertilité, qu'elle soit spontanée ou médicalement assistée, chute autour de l'âge de 40 ans, puis s'effondre à partir de 45 ans (4). Chez la femme, le nombre de follicules au repos est définitivement fixé à la naissance. À partir de ce moment et jusqu'à la ménopause, l'effectif de cette « réserve ovarienne » diminue en raison de l'entrée en apoptose des follicules au repos ou de leur entrée en croissance. À partir d'environ 38 ans, l'appauvrissement de la réserve ovarienne s'accélère et se traduit par une chute significative du nombre de follicules en croissance. La chute du nombre de follicules en croissance capables de produire de l'inhibine B conduit, dès l'âge de 35 ans, à une élévation de la FSH circulante. Une croissance folliculaire accélérée et/ou une sélection du follicule préovulatoire plus précoce, probablement due à l'élévation des taux de FSH, semble responsable du raccourcissement de la durée de la phase folliculaire à partir d'environ 40 ans. Lorsque la femme atteint la quarantaine, le taux d'avortements spontanés est augmenté, soit en raison d'une chute de la réceptivité endométriale, soit en raison d'une qualité ovocytaire diminuée, soit des deux (4). Les capacités reproductives cessent souvent des années avant la ménopause qui survient vers 50 ans dans les populations actuelles des pays développés et/ou déclinent fortement bien avant que celle-ci ne soit atteinte (5).

Âge et fertilité spontanée

La chute de la fécondité naturelle est démontrée par la diminution des naissances selon la tranche d'âge de la mère. Le modèle des inséminations artificielles avec donneur élimine tout autre facteur que l'âge de la mère (tel l'âge du père, la fréquence des rapports). Les CECOS avaient, dès 1982, parfaitement mis en évidence la chute des taux des succès en IAD avec l'âge de la femme (6). Le taux de conception cumulé sur 12 cycles était de 73 % chez les femmes de 25 ans ou moins, de 74 % pour les femmes de 26-30 ans, de 61 % pour les femmes de 31-35 ans et de 56 % pour celles de 36-40 ans. Les études les plus récentes basées sur le délai de conception après arrêt de la contraception comme les études historiques plus anciennes, estiment la fécondabilité apparente à 25 % vers 20-30 ans (5). Ces 25 % de probabilité de grossesse par cycle ne sont vrais qu'à 25 ans et les probabilités de conception sont estimées à 12 % à 35 ans et 6 % à 40 ans.

L'effet néfaste de la durée d'infécondité est lui aussi totalement méconnu bien qu'il ait été publié par Schwartz dès 1981 (7). Si la probabilité de concevoir des couples est de 24-25 % par cycle au départ, elle n'est plus que de 8 % à 1 an et 4 % à 2 ans (tableau I).

Leridon (8) vient de démontrer que sur 100 femmes cherchant à concevoir à partir de 30 ans, 91 auront un enfant dans les 4 ans, sans recourir à l'assistance médicale à la procréation (AMP), 3 y parviendront ensuite grâce à l'AMP et les 6 autres resteront sans enfant. Sur 100 femmes cherchant à concevoir à partir de 35 ans, 82 auront un enfant dans les 3 ans, 4 grâce à l'AMP et 14 resteront sans enfant. En cas de début de recherche à partir de 40 ans, 5 réussiront dans les 2 ans, 7 en recourant à l'AMP et 36 resteront sans enfant (tableaux II et III).

Ces données sont trop souvent ignorées des femmes pour qui 25 % de grossesse par cycle restent l'idée communément admise, quels que soient leur âge et leur durée d'infertilité.

Tableau I – Fertilité en fonction de la durée d'infécondité. D'après Scharwtz (7).

Durée d'infécondité	Fécondabilité		
	% de stérile	des fertiles	totale
0	3	25	24
6 mois	11	16	14
1 an	24	12	8
2 ans	52	8	4
5 ans	89	4	0,4

Tableau II – Taux de succès (conceptions-naissances vivantes) sans AMP, selon l'âge de la femme en début de recherche de conception : résultats d'un modèle. D'après Léridon (8).

	Âge de la femme en début de tentative		
	30	35	40
<i>Pour 100 femmes de chaque âge :</i>			
a) Succès : conceptions (NV) en 12 mois	75,4	66,0	44,3
b) Retard : conceptions (NV) en 12-23 mois	10,9	12,3	12,7
c) Retard : conceptions (NV) en 24-35 mois	3,0	3,9	4,7
d) Retard : conceptions (NV) en 36-47 mois	1,4	1,7	2,0
e) Total conceptions (NV) en 4 ans (a + b + c + d)	90,7	83,9	63,7
Total conceptions (NV) vie entière	93,9	85,9	65,1
Au moins 1 fausse couche avant NV (p. 100 NV)	14,4	15,7	16,3
Âge Y de recours à l'AMP (en cas d'échec)*	34 ans	38 ans	42 ans
Pas de conception à l'âge Y (échecs)	9,3	17,8	43,0

* en cas de non-conception, le délai entre l'âge de la femme au début du désir de grossesse et l'âge où elle arrive en AMP est variable. Il est estimé de 4 ans quand la patiente souhaite un enfant à 30 ans, mais seulement de 2 ans si l'âge initial est de 40 ans.

Malgré l'AMP, 35,9 % des femmes qui souhaitent un enfant à 40 ans ne l'obtiendront pas. L'AMP ne compense pas l'effet délétère de l'âge.

Tableau III – Taux de succès (conceptions-NV) avec AMP, selon l'âge de la femme en début d'AMP : résultats d'un modèle. D'après Léridon (8).

	Âge de la femme en début de tentative		
	30	35	40
Âge Y de recours à l'AMP (en cas d'échec)	34 ans	38 ans	42 ans
<i>Pour 100 femmes de chaque âge :</i>			
a) Pas de conception à l'âge Y (échecs)	9,3	17,8	43,0
Conceptions (NV) avec MP :			
Succès : Conception avant 1 an	2,0	3,0	5,1
Retard : conception à 12-23 mois	0,8	1,2	2
b) Nombre total de conceptions (en 2 ans)	2,8	4,2	7,1
c) Taux de succès apparent de l'AMP (%) = 100*b/a	30,1	23,6	16,5
Pas de conception à l'âge Y + 2 (= a - b)	6,5	13,6	35,9
Conceptions qui seraient survenues spontanément (sans AMP)			
d) Nombre total en 2 ans	1,4	2,5	6,7
Taux de succès réel de l'AMP (%) = 100* (b-d)/a	15,1	9,6	0,9

Âge de la femme et résultats des thérapeutiques de l'infertilité

Contrairement aux idées reçues, les effets délétères de l'âge ne sont pas éliminés par l'AMP. L'âge de la femme est en effet le premier facteur de succès quel que soit le traitement d'infertilité envisagé. En insémination intra-utérine (IIU), le taux de succès passe à Sèvres de 15,9 % de grossesse évolutive avant 35 ans à 4,8 % à partir de 40 ans (9). Frederick *et al.* (10) sont encore plus sévères en annonçant sur 77 patientes de plus de 40 ans un taux de naissance par cycle de 1,4 % et par patiente de 3,9 %. Les résultats en IIU sont si mauvais après 40 ans que de nombreuses équipes préfèrent passer directement en fécondation *in vitro* (FIV), parfois même dès 38 ans, en prenant en compte la durée de l'infertilité.

En FIV, la chute des taux de succès qui s'amorce dès 35 ans, s'accroît vers 37 ans et devient catastrophique après 42 ans, le taux d'accouchement par ponction passe de près de 20 % avant 30 ans à 13,1 % à 37 ans et à 6,5 % à 42 ans (tableau IV) (11) ; malgré ces données, l'âge des candidates à la FIV va en augmentant. Il était de 33,3 ans en 1986, il est devenu 34,5 en 2004 (11). Plus grave encore, la proportion de femmes de 40 ans et plus va en augmentant, passant de 12,1 % des candidates FIV en 1993 à 17 % en 2002 (11). Les femmes attendent (où on les fait attendre ?) de plus en plus avant d'avoir recours à l'ultime thérapeutique de l'infertilité.

Ron El *et al.* (12), étudiant 431 cycles FIV/ICSI de femmes de 41 ans et plus, n'ont observé aucun accouchement après 43 ans. De plus, avec l'âge le taux de fausses couches spontanées (FCS) augmente, passant de 14,5 % dans le groupe 25-29 ans à près de 40 % après 42 ans (5). À ces FCS, il faut encore ajouter les interruptions médicales de grossesse liées aux aberrations chromosomiques. L'existence d'une infertilité masculine et le recours aux techniques de fécondation assistée ne modifient pas l'altération des taux de succès avec l'âge. Les travaux de Nikolettos *et al.* (13) démontrent qu'en cas

d'ICSI avec sperme éjaculé le taux de grossesse par cycle après 40 ans n'est que de 9,35 % (avec 50 % de FCS). De même, en cas d'azoospermie, Silber *et al.*, après ICSI avec sperme épидидymaire ou testiculaire, passent de 46 % d'accouchement par cycle entre 20 et 29 ans à 4 % après 40 ans (14).

Les résultats globaux FIVNAT (15) comme les résultats individuels de chaque équipe démontrent bien que la chute réelle des taux de succès débute vers 38-39 ans. L'idéal serait donc que les patientes, qui auront besoin de recourir à la FIV, arrivent à l'AMP avant cette date fatidique, ce qui sous-entend une prise en charge différente du désir d'enfant dès 35 ans.

Entre 38 et 42 ans, l'estimation de l'âge ovarien par les tests de réserve ovarienne est imposée par le guide des bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP. Cette notion d'âge ovarien où plus scientifiquement de réserve ovarienne est un concept récent qui a progressivement pris une place prépondérante dans le bilan d'une infertilité. Entre 38 et 42 ans, si les tests de réserve ovarienne sont favorables, les chances de grossesses sont diminuées mais réelles, il est donc encore logique d'accepter les femmes en AMP. Entre 43 et 45 ans la prise en charge, hors remboursement par la Sécurité sociale, doit rester l'exception (16).

Bilan d'une infertilité

Ce chapitre sera développé par d'autres auteurs, seul l'aspect épidémiologique sera donc traité ici.

La prise en charge des couples infertiles a beaucoup évolué ces dernières années. Il était classiquement admis qu'il ne fallait commencer l'exploration d'un couple infertile qu'après deux ans de rapports sexuels réguliers. Avec le recul de l'âge du désir du premier enfant, une telle attitude devenait dangereuse pour la femme et la Référence médicale opposable (RMO) publiée en août 1998 a clairement autorisé à commencer l'exploration d'un couple souhaitant un enfant après une année de rapports sexuels sans contraception. La RMO sur la stérilité du couple précise bien « qu'il n'y a pas lieu de prescrire ou de pratiquer des explorations pour un bilan de stérilité pour un couple ayant des rapports sexuels réguliers sans méthode contraceptive depuis moins d'un an SAUF SI LA FEMME A PLUS DE 35 ANS... » (*Journal Officiel* du 12-07-1998). Les recommandations de bonne pratique sur les inducteurs de l'ovulation de l'AFSSAPS de juin 2003 et leur actualisation 2007 vont dans le même sens. « La stratégie thérapeutique devra tenir compte de l'âge de la femme, de la durée de l'infécondité et des facteurs associés (grade A). Il

Tableau IV – Taux de grossesses et d'accouchements par ponction selon l'âge de la femme (1998-2002). Source : FIVNAT, 2003.

Âge de la femme (ans)	Grossesses cliniques (%)	Accouchements (%)
30-34	23,7	19,7
35-37	21,3	16,7
38-39	18,2	13,2
40-41	14,9	10,3
42-44	10,0	6,5
45	4,5	1,3
	$p < 0,01$	$p < 0,01$

est recommandé d'une manière générale de promouvoir des mesures préventives : la prévention et le traitement des maladies sexuellement transmissibles des deux partenaires, un arrêt du tabac chez les deux partenaires, une prise en charge nutritionnelle de la patiente pour se rapprocher du poids idéal, un abaissement de l'âge de la première grossesse, par une information sur la diminution de la fertilité avec l'âge (grade C) ».

Une exploration plus rapide peut être engagée si : la femme a plus de 35 ans, les troubles du cycle sont patents, une pathologie de l'appareil génital est connue ou suspectée chez l'homme ou chez la femme.

Il est donc devenu licite de commencer les explorations dès qu'un an d'infertilité avec rapports sexuels réguliers s'est écoulé. La majorité des grossesses survenant dans les 4 premiers mois de désir, Brossens a même proposé de débiter l'exploration dès 6 mois d'infertilité (17).

La première consultation et l'interrogatoire occupent une place fondamentale dans l'exploration d'un couple infertile. L'entretien doit occuper la plus grande partie sinon la totalité de la première consultation, l'interrogatoire mérite et nécessite un long moment. Que la femme soit venue seule ou en couple, l'interrogatoire doit porter sur les deux membres du couple, quitte à reprendre côté masculin lors d'une consultation ultérieure en présence du conjoint. L'âge de la femme et la vraie durée d'infécondité sont deux paramètres essentiels à prendre en compte désormais. Le type de contraception utilisée jusqu'au désir d'enfant est utile à connaître à double titre par ses conséquences éventuelle (dispositif intra-utérin) ou parce qu'il s'agit si peu d'une contraception (méthode Ogino, retrait) que la durée réelle d'infécondité est probablement supérieure à la durée annoncée et qu'il va falloir en tenir compte dans la prise en charge. La profession renseigne sur le mode de vie, la disponibilité et l'exposition éventuelle à des produits toxiques. La prise de médicaments, de toxiques, de tabac ou d'alcool est à rechercher. Les antécédents médicaux et chirurgicaux ne sont pas à négliger. Le poids et la taille sont toujours à noter. Les antécédents gynécologiques et obstétricaux y compris avec un autre conjoint sont toujours à préciser : FCS, grossesse extra-utérine (GEU), accouchement (mode, déroulement de la grossesse), interruption volontaire de grossesse (IVG) (type, terme).

En fin d'interrogatoire lorsque la femme se sentira en confiance, la fréquence des rapports sexuels sera abordée et leur période dans le cycle.

Bien que l'idéal est que le conjoint soit présent et réponde lui-même aux questions, l'interrogatoire indirect par le biais de la conjointe n'est pas à négliger.

L'âge est désormais reconnu comme influant sur la qualité du sperme. Comme pour la femme seront recherchés le mode de vie, la profession (déplace-

ment, produits toxiques), la prise de tabac, alcool, médicaments, les antécédents médicaux, chirurgicaux et génitaux (infection, descente de testicule, traumatisme, etc.).

L'examen clinique apporte peu de renseignements sur la cause de l'infertilité.

À l'issue de la première consultation, il reste logique en 2010 de se conformer à la RMO et de demander d'emblée courbe de température, test post coital, spermogramme et spermocytogramme, contrôle des sérologies, rubéole et toxoplasmose et chlamydiae, s'ils n'ont pas encore été faits. Ceci en l'absence de signes cliniques évocateurs d'une cause précise de stérilité qui conduiraient d'emblée à demander des examens ciblés. L'échographie qui n'était pas citée dans la RMO en 1998 a pris progressivement une place importante et fait partie désormais du bilan initial, recherchant une pathologie ovarienne, tubaire ou utérine.

En seconde intention, viennent l'hystérogaphie et l'hystéroscopie et surtout les explorations hormonales. Les dosages hormonaux sont désormais à pratiquer systématiquement. La notion d'âge ovarien ou plus scientifiquement de réserve ovarienne est un concept récent qui a progressivement pris une place prépondérante dans le bilan d'une infertilité. Différents tests dits de réserve ovarienne ont été proposés pour tenter de cerner au mieux l'âge ovarien, c'est-à-dire la capacité de répondre aux stimulations de l'ovulation et d'obtenir une grossesse. Ces tests seront décrits dans le chapitre exploration, ils seront donc envisagés ici brièvement et en se plaçant sur un plan purement épidémiologique. Le plus ancien est le dosage de la FSH de base, on peut citer le test de Navot (ou test au citrate de clomifène), le test à la FSH exogène, le test aux agonistes du GnRH, le dosage de l'oestradiol en début de cycle, le dosage de l'inhibine B en début de phase folliculaire et plus récemment le dosage de l'hormone antimüllérienne (AMH) et le compte des follicules antraux. (CFA), chacun de ces tests ayant des avantages et des inconvénients. Le dosage de l'inhibine B est actuellement remis en cause. Le dosage de l'AMH, non opérateur-dépendant contrairement au CFA, n'est actuellement pas remboursé. La récente méta-analyse de Broer (18) a montré l'équivalence de l'AMH et du compte des follicules antraux pour la prédiction de la mauvaise réponse ovarienne. La patiente idéale présente une FSH inférieure à 9,5 mu/mL, une inhibine B supérieure à 45 pg/mL et une AMH supérieure à 2 ng/mL. Toutefois, il faut souligner que c'est un faisceau d'arguments et non un test qu'il faut utiliser et surtout qu'ils ne permettent pas de prédire réellement l'obtention ou non d'une grossesse.

Il est souhaitable de dépister les patientes dont la réponse ovarienne est diminuée, afin de les avertir de leurs chances limitées de grossesse et de

savoir les orienter rapidement vers le don d'ovocyte d'emblée ou après quelques essais de stimulation de l'ovulation selon les marqueurs de leur réserve ovarienne. Il faut cependant rappeler avec Sharara *et al.* (19) que ces tests n'ont pas une sensibilité et une spécificité absolue. Hall *et al.* (20) ont étudié les dosages hormonaux de 68 patientes enceintes après FIV. Sur ces 68 patientes, seules 21 (31,3 %) appartenaient au groupe favorable avec FSH basse et inhibine élevée, 13 grossesses (soit 19,4 %) proviennent du groupe défavorable à FSH élevée et inhibine basse et 33 grossesses (49,3 %) proviennent d'un groupe où un des deux facteurs étaient défavorable ! Les patientes à réserve ovarienne perturbées doivent être averties du risque important de réponse insuffisante à la stimulation de l'ovulation et de leurs chances à priori réduites de grossesse. Faut-il cependant les exclure d'emblée de nos traitements ? Si leurs dosages sont très anormaux la question ne se pose pas (d'ailleurs la RMO consacrée à l'infertilité et les recommandations de l'AFSSAPS disent bien qu'il ne faut pas stimuler l'ovulation des femmes dont la FSH est franchement et constamment élevée). Tout le problème est celui des dosages limites. Dans ces cas limites, sur des patientes averties des risques élevés d'annulation, il est parfois légitime de tenter une ou deux stimulations qui permettront à la patiente de faire plus doucement le deuil d'une grossesse avec leurs propres ovocytes, avant de leur proposer adoption et/ou don d'ovocytes. Certains auteurs remettent en cause actuellement l'intérêt même de l'exploration systématique de la réserve ovarienne.

L'hystérogographie est systématiquement à pratiquer sauf à en cas d'infertilité masculine sévère relevant de l'ICSI. Dans ce cas, l'appréciation de la cavité utérine peut se faire par hystéroscopie.

L'hystéroscopie a pris progressivement sa place dans le bilan d'une infertilité. Selon les équipes, elle est proposée sur signe d'appel clinique ou échographique, ou systématiquement.

La coelioscopie doit rester l'examen de dernière intention. La coelioscopie systématique alors que l'HSG est strictement normale, la sérologie Chlamydiae négative et qu'il n'existe aucun signe clinique ou d'interrogatoire, coelioscopie qui a toutes les chances d'être strictement normale, ne s'impose plus selon les recommandations de l'European Society of Human Reproduction (ESHRE).

Aspects épidémiologiques des causes de l'infertilité féminine

Les infections génitales hautes et les maladies sexuellement transmissibles ont longtemps été

accusées d'être les premières responsables de l'infertilité en France jusqu'à l'étude de Thonneau qui date de 1991 (21). Dans cette étude, les troubles de l'ovulation venaient désormais au premier rang des causes d'infertilité (32 %), devant les problèmes tubaires (26 %) et 40 % des infertilités étaient d'origine mixte masculine et féminine. Les infertilités inexpliquées ne représentaient alors que 8 % des cas, ce qui est surprenant puisqu'elles représentent 20 % des indications d'assistance médicale à la procréation (11). L'étude récente de Maheshawari a le mérite de séparer les causes d'infertilité en fonction de l'âge de la femme 7 172 couples infertiles ayant consulté entre le 1^{er} janvier 1993 et le 31 décembre 2006, après au moins un an de rapports réguliers, dans un centre écossais d'infertilité ont été étudié (22). Globalement, les causes d'infertilité se répartissent de la façon suivante : 20 % de troubles de l'ovulation, 34,4 % de problèmes masculins isolés ou associés, 19,5 % de problèmes tubaires, 4,1 % d'endométriose et 22,4 % d'infertilité inexpliquée. La répartition des causes d'infertilité est donnée dans le tableau V.

Les femmes de plus de 35 ans présentent moins de troubles de l'ovulation, souffrent moins d'endométriose, mais présentent plus d'infertilité d'origine tubaire. Qu'il s'agisse d'infertilité primaire ou secondaire, les femmes de plus de 35 ans présentent significativement plus souvent des infertilités inexpliquées (dans les infertilités primaires 30,1 vs 21,8 % ($p < 0,001$) et dans les secondaires 24,8 vs 19,9 % [$p = 0,002$]). Le risque relatif d'avoir un diagnostic d'infertilité inexpliquée entre 35 et 39 ans est de 1,8 par rapport à une femme de moins de 30. Cette étude démontre ce que nous observons de plus en plus dans les consultations d'infertilité à savoir l'augmentation des infertilités inexpliquées avec l'âge de la femme. Ces infertilités sans autre cause que l'âge sont-elles vraiment inexpliquées ou sont-elles dues à des insuffisances ovariennes passées inaperçues comme le suggèrent Gleicher et Barad (23), ceci est un autre problème qui justifie l'étude systématique de la réserve ovarienne dès que la patiente consulte pour infertilité et non après échec des traitements afin de l'orienter au mieux.

Tableau V – Étiologie de l'infertilité selon l'âge de la femme. D'après Maheshawari (22).

	< 35 ans	> 35 ans	
Dysovulation %	23,6	11,4	$p < 0,001$
Endométriose %	4,5	3,1	$p < 0,01$
Infertilité tubaire %	17,6	24,8	$p < 0,001$
Infertilité inexpliquée %	21,0	26,6	$p < 0,01$
Infertilité masculine %	35,0	32,5	$p < 0,05$

Environnement et infertilité féminine

Tabac

L'effet délétère du tabagisme sur la fertilité naturelle et assistée est désormais bien démontré. Le tabagisme augmente le risque d'infertilité (OR = 1,6) (24, 25), diminue la fécondabilité, allonge le délai naturel de conception par rapport à des patientes non tabagiques (26, 27) et augmente le risque de fausses couches spontanées (28). Le tabac augmente également le risque d'insuffisance ovarienne prématurée, avec un âge moyen de ménopause chez les patientes tabagiques inférieur de 2 ans par rapport aux non fumeuses (29). En FIV, malgré une certaine hétérogénéité des études, de nombreux paramètres semblent affectés : taux de FSH, d'estradiol et d'androgènes à j3 du cycle plus élevé, doses de gonadotrophines consommées plus élevées en stimulation ovarienne, diminution du pic d'estradiol le jour du déclenchement, perturbation de la stéroïdogenèse folliculaire, diminution du nombre d'ovocytes recueillis, modification de la maturation ovocytaire, diminution du taux de fécondation altération de la qualité embryonnaire, altération de la réceptivité utérine, diminution des taux d'implantation et des taux de grossesse (24, 25). Les paramètres altérés diffèrent d'une étude à l'autre, ce qui peut être expliqué par les différentes techniques d'évaluation de l'intoxication tabagique utilisées (interrogatoire simple ou dosages variés). Une altération de la stéroïdogenèse folliculaire pourrait expliquer les effets néfastes du tabac sur les différentes étapes de la FIV et la diminution des résultats en termes de taux de grossesse.

Alimentation

L'impact du poids sur la reproduction féminine est bien démontré qu'il s'agisse du faible poids ou du surpoids.

Dans les pays dits développés, la pathologie de la reproduction liée à l'insuffisance d'apports nutritionnels est en rapport avec des troubles du comportement alimentaire (anorexie mentale) ou la pratique intensive d'un sport, responsables d'une aménorrhée liée au poids.

L'obésité est également cause d'infertilité. Dans la population générale, le risque relatif d'infertilité par anovulation augmente avec l'indice de masse corporelle (IMC) jusqu'à $\times 3,7$ pour un IMC > 32 (30). La part du surpoids dans l'infertilité par anovulation est deux fois plus importante que celle de la maigreur (31).

L'obésité altère également les résultats de la prise en charge de l'infertilité quelle qu'elle soit. Elle

est un facteur de risque de résistance au citrate de clomifène (32, 33) et impose une augmentation des doses de gonadotrophines nécessaire pour induire une croissance folliculaire (34, 35). Chez les femmes ovulatoires, le poids est responsable d'un allongement du délai nécessaire à la conception (36-38) et est associé à une augmentation du risque de fausses couches spontanées (39, 40). En FIV/ICSI, la méta-analyse de Maheshwari montre qu'un IMC > 25 diminue les chances de grossesse, nécessite de plus fortes doses de gonadotrophines et augmente le risque de FCS (41).

De nombreux autres facteurs comportementaux de style de vie tels l'exercice physique, la consommation d'alcool et de caféine, le stress psychologique ou l'exposition à des polluants environnementaux sont également susceptibles d'agir sur la fertilité (42), même si la démonstration de leur effet délétère est nettement moins évidente que chez l'homme.

Le principal problème de la fertilité féminine reste la chute de la fertilité avec l'âge, problème accentué actuellement par le désir tardif d'enfant. Si le message passe peu auprès des médecins, il passe encore moins auprès des femmes. Une campagne d'information des femmes est souhaitable car ce sont nos patientes qu'il faut informer et convaincre tout en étant conscient de l'aspect société et politique du problème. Le slogan du planning familial « un enfant quand je veux » a été mal compris. Les femmes l'ont pris au pied de la lettre. Il faudrait lui substituer « un enfant tant que je peux ». Et, dans le même ordre d'idée, pourquoi ne pas écrire sur les contraceptifs « attention, l'abus de contraception est dangereux pour la reproduction. Mesdames, pendant que vous prenez la pilule, vos ovaires vieillissent et vos chances de procréer diminuent ». Pour promouvoir les grossesses à un âge plus jeune, il faut bien entendu des mesures facilitant la vie des jeunes mères de familles.

Il faut faire passer un message optimiste et positif. Le but est d'éviter toutes ces femmes « jeunes dans la vie, âgées pour la reproduction » qui sortent en larmes de nos consultations et dont la vie est gâchée par manque d'information.

Dépister (dans la mesure du possible) les femmes à risque de vieillissement ovarien précoce serait encore plus efficace pour les conseiller au mieux ; 10 % des femmes sont ménopausées à 45 ans et ces 10 % ont donc un risque de vieillissement ovarien prématurée : famille de ménopause précoce, antécédents de chimiothérapie ou de radiothérapie, d'infection pelvienne, d'endométriose sévère ou de tabagisme important. La proposition de cryopréservation d'ovocytes ou de tissus ovariens à toutes les femmes de 25 ans à 30 ans pour garder la possibilité de concevoir à tout âge serait une alternative prônée par les féministes

acharnées. Outre le prix et les résultats actuels de ces techniques qui laissent à désirer, on ne peut que s'interroger sur les excès que pourraient faire naître de telles pratiques « j'attends l'âge de la retraite pour, enfin libre de mon temps, faire mon bébé ».

Que les femmes soient informées de la chute de la fertilité avec l'âge, et orientent ensuite leur vie en toute connaissance de cause, devrait être le but de tous les médecins.

Références

- Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G (2005) Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 20: 1144-7
- Brzakowski M, Lourdé E, Cabry R *et al.* (2009) Épidémiologie du couple infertile. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 38: F 3-7
- Leridon H, Slama R (2008) The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 23: 1312-9
- Gougeon A (2005) The biological aspects of risks of infertility due to age: the female side. *Rev Epidemiol Sante Publique* 53: 2S37-2S45
- Khoshnood B, Bouvier-Colle MH, Leridon H, Blondel B (2008) Impact de l'âge maternel élevé sur la fertilité, la santé de la mère et la santé de l'enfant. *J Gynécologie Obstet Biol Reprod* 37: 733-47
- Schwartz D, Mayaux MJ (1982) La féderation des centres d'étude et de conservation du sperme humain. Female fecundity as a function of age. *N Engl J med* 307: 404-6
- Schwartz D (1981) Importance de la durée d'infécondité dans l'appréciation de la fertilité du couple. *Population* 2: 237-50
- Leridon J (2004) Can assisted reproduction technology compensate for the material decline in fertility with age. *Hum Reprod* 19: 1548-53
- Belaisch-Allart J (2001) Insémination intra-utérine ou fécondation in vitro. Pourquoi choisir l'insémination en premier dans la plupart des situations. *Gynecol Obstet Fertil* 29: 567-8
- Frederick JC, Denkerms Rojas A, Horta I *et al.* (1994) Is there a role for ovarian stimulation and intra uterine insemination after age 40. *Hum Reprod* 9: 2284-6
- FIVNAT (2006) Bilan général 2000-2004. Dossier FIVNAT 2006
- Ron-El R, Raziel A, Strass-Burger D *et al.* (2000) Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41. *Fertil Steril* 74: 471-5
- Nikolettos N, Kupker W, AlHasani S *et al.* (2000) ICSI outcome in patients of 40 years age and ova a retrospective analysis. *European J Gynecol Reprod Biol* 91: 177-82
- Silber S, Nagy Z, Devroey P *et al.* (1997) The effect of female age and ovarian reserve in male infertility: treatment of azoospermia with sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2653-00
- FIVNAT 1997 (1997) Age et AMP. *Contracept Fertil Sex* 25: 503-6
- Frydman R, Righini C (1998) Doit-on prendre en charge en AMP les femmes sans limite d'âge ? *Contracept Fertil Sex* 26: 509-11
- Brossens I, Gordts S, Valkenburg M *et al.* (2005) Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility. *Hum Reprod* 20: 2672-4
- Broer S, ben Willem J, Hendriks D, Broekmans F (2009) The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 91: 705-13
- Sharara F, Scott T, Seifer D (1998) The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol* 179: 804-12
- Hall J, Welt C, Cramer D (1999) Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 14: 409-15
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A *et al.* (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 6: 811-6
- Maheshwari A, Hamilton M and Bhattacharya S (2008) Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum Reprod* 23: 538-42
- Gleicher N, Barad D (2006) Unexplained: does it really exist? *Hum Reprod* 21: 1951-5
- Augood C, Duckitt K, Templeton AA (1998) Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod* 6: 1532-39
- de Mouzon J, Belaisch-Allart J (2005) Consequences on women's fecundity and on assisted reproductive technology. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 34: 3S112-8
- Hull MG, North K, Taylor H *et al.* (2000) Delayed conception and active and passive smoking. The Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. *Fertil Steril* 74: 725-33
- Bolunar F, Olsen J, Boldsen J (1996) Smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol* 143: 578-87
- Winter E, Wang J, Davies MJ, Norman R (2002) Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod* 17: 3220-3
- Jick H, Porter J (1977) Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. *Lancet* 1: 1354-5
- Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC *et al.* (1994) Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 171: 171-77
- Rich-Edwards JW, Spiegelman D, Garland M *et al.* (2002) Physical activity, body mass index and ovulatory disorder infertility. *Epidemiology* 13: 184-90
- Imani B, Eijkman MJ, te Velde ER *et al.* (1998) Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2361-5
- Imani B, Eijkman MJ, de Jong FH *et al.* (2000) Free androgen index and leptine are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomifene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 676-82
- Imani B, Marinus JC, Eijkman MJ *et al.* (2002) A monogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *Fertil Steril* 77: 91-7
- van Wely M, Fauser BC, Laven JS *et al.* (2006) Validation of a prediction model for the follicle-stimulating hormone response dose in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86: 1710-5
- Gesink Law DC, Maclellan RF, Lonnecker MP (2007) Obesity and time to pregnancy. *Human Reprod* 22: 414-20

37. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA *et al.* (2008) Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Human Reprod* 23: 324-8
38. Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC *et al.* (2008) Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Human Reprod* 23: 324-28
39. Lashen H, Fear and Strudee DW (2004) Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Human Reprod* 19: 1644-6
40. Thumb MY, El-Sheikhah A, Faris R *et al.* (2007) The influence of body mass index to in-vitro fertilisation treatment outcome, risk of miscarriage and pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol* 27: 699-702
41. Maheshwari A, Bhattacharya S, Johnson NP (2008) Predicting fertility. *Human Fertil* 51: 242-4
42. Homan GF, Davies M, Norman R (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Human Reprod Update* 13: 209-23

J. de Mouzon

Épidémiologie de l'infertilité

Introduction

L'infertilité est, depuis plusieurs années, considérée par l'Organisation médicale de la santé comme une pathologie à part entière, dans le cadre du concept de santé reproductive qui reconnaît à chaque être humain le droit à la procréation (1). Elle est le siège de nombreux enjeux de société, et tout ce qui la concerne est fortement médiatisé, notamment les facteurs environnementaux et les traitements d'assistance médicale à la procréation. Cependant, ses contours restent souvent flous, sa fréquence difficile à mesurer, ses causes nombreuses. Par ailleurs, elle s'inscrit dans un contexte mondial de diminution des naissances dans lequel il n'est toujours aisé, en ce qui concerne les données démographiques, de séparer l'infertilité involontaire de la diminution volontaire des projets familiaux, mais aussi dans celui de l'augmentation de l'AMP et de l'âge des couples qui cherchent à procréer. L'objectif de ce chapitre sera donc : (1) de rappeler les concepts scientifiques sous-jacents à la mesure de la fertilité et de l'infertilité, (2) de faire le point sur sa fréquence de par le monde et (3) de déterminer les facteurs mis en cause.

Concepts et définitions

Définitions en infertilité

Il faut tout d'abord rappeler que, sur le plan nosologique, la fécondité représente le fait d'avoir obtenu un enfant (2) alors que la fertilité correspond à la capacité à en obtenir un, donc à une potentialité. Dans ce concept, le terme « stérilité » correspond à une fertilité nulle, donc à une incapacité totale à obtenir un enfant. Sauf cause précise et définitive (obstruction tubaire bilatérale ou azoospermie définitive par exemple), il ne devrait être utilisé qu'après la fin de la vie reproductive, pour les couples qui n'ont jamais réussi à concevoir. Le terme qui devrait être employé maintenant est celui d'« infertilité », qui recouvre donc la réalité de la

pathologie des couples, celle de n'avoir pas conçu l'enfant qu'ils désirent, que ce soit par stérilité, hypofertilité ou simple malchance. De plus, et en raison de l'impact du temps (cf. infra), en accord avec les critères de l'OMS (3), le terme d'infertilité ne devrait s'employer, sauf cas précis, que lorsque la recherche infructueuse dépasse un an. Par ailleurs, un certain flou entoure toujours la définition de la fécondité. Ainsi, se définissent une fécondité *totale* – correspondant à toutes les fécondations –, *reconnaissable* – mise en évidence par les tests de grossesse –, *apparente* – reconnue par la femme (retard de règles) –, et *effective* – se traduisant par la naissance d'un enfant, qui représente le but réel de la recherche. Les travaux de Hertig (4) ont permis d'estimer ces divers pourcentages, pour des cycles exposés au risque de grossesse, à 84 %, 69 %, 42 % et 31 %. En fécondation *in vitro*, le taux de fécondation des ovocytes prélevés lors de cycles spontanés a été estimé à 84,5 % (5). Par ailleurs, grâce à des dosages de bêta-HCG, la fécondité reconnaissable a pu être estimée à 60 % (6). Ces diverses définitions de la fécondité sont extrêmement utiles pour mieux comprendre l'infertilité. Elles introduisent cependant une ambiguïté, dans la différenciation des infertilités primaires et secondaires, selon que l'on utilise un début de grossesse ou la naissance d'un enfant. Il manque encore un consensus international

Mesures de la fertilité

Pour un couple donné, seule la fécondité, c'est-à-dire la réalisation concrète de son projet, est réellement objectivable. Ses capacités à concevoir à un moment donné, donc sa fertilité, ne sont actuellement pas mesurables. La mesure de la fertilité n'est en fait réalisable que dans une population, à partir de calculs réalisés sur les couples qui ont cherché à concevoir. Trois indices principaux ont été développés : le délai nécessaire pour concevoir (DNC), les chances de concevoir dans un temps donné, un an par exemple, et la fécondabilité (7, 8), ou probabilité de concevoir à chaque cycle. Le DNC a l'inconvénient de mal prendre en compte les couples

qui n’ont pas conçu, soit en ne les intégrant pas du tout dans les calculs, soit en leur donnant une valeur élevée identique, les deux méthodes biaisent l’estimation de la fertilité. En revanche, il est facile à déterminer chez les couples qui ont conçu, aux erreurs de mémoire près, ce qui explique sa large utilisation. Les deux autres indices sont mesurables pour tous, mais la probabilité de concevoir en un temps donné nécessite que tous les couples aient le même recul, ce qui n’est pas toujours facile à obtenir et peut demander du temps. La fécondabilité permet de s’affranchir de cette contrainte. La distribution de cette fécondabilité a été déterminée à partir de la distribution des taux de grossesses au premier cycle (8) ou de modèles mathématiques faisant intervenir une loi bêta et le taux de grossesses au cours de cycles successifs (9). Un faible pourcentage de couples a une fécondabilité nulle (3 %) ou, au contraire, élevée supérieure à 60 % par cycle (2 %) et la fécondabilité moyenne est environ de 25 % (fig. 1). Ce résultat est cohérent avec l’estimation de Léridon (2), à partir de diverses séries publiées dans la littérature, pour une femme de 25 ans (fécondabilité effective de 25 %), et avec les résultats d’une large enquête prospective chez des couples cherchant à concevoir (10), montrant une fécondabilité au premier cycle de 25 %.

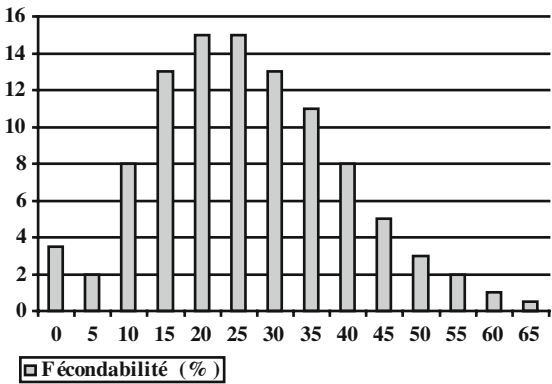


Fig. 1 – Distribution des fécondabilités. D’après Schwartz (8).

Conséquences du concept de fécondabilité

L’hypothèse de base de ce concept définit la fécondabilité comme une constante d’un couple donné (au moins dans un intervalle de temps de quelques mois), mais différente d’un couple à l’autre. Dans ce cadre, l’évolution de la fécondabilité au cours des cycles successifs résulte en fait d’un processus de sélection et non de l’évolution des chances de chacun d’eux : les couples les plus fertiles conçoivent en moyenne plus vite que les autres, ce qui aboutit à sélectionner, dans le groupe restant, des couples de moins en moins fertiles avec le temps. Par ailleurs, les couples stériles prennent une place

relative de plus en plus importante dans l’échantillon puisqu’ils ne peuvent concevoir. Ainsi, après 5 ans d’attente, 89 % des couples qui n’ont pas encore conçu sont stériles, en l’absence de traitement, et la fécondabilité des non stériles n’est que de 4 % par cycle (tableau I). La fécondabilité de l’ensemble des couples sans enfant n’est donc que de 0,4 %. En revanche, au bout d’un an d’attente, la fécondabilité des non stériles est encore de 12 %. Le concept de fécondabilité a aussi comme conséquence la nécessité de prendre en compte le temps dans la prise en charge des couples infertiles. En effet, si, chez des couples à fertilité normale (25 %), le calcul des probabilités permet d’établir que moins de 10 % resteront sans grossesse au bout de 1 an et 0,4 % au bout de 5 ans (tableau II), il permet aussi de constater une évolution favorable avec le temps pour des couples à fécondabilité nettement diminuée. Ainsi, deux tiers des couples dont la fécondabilité ne serait que de 10 % par cycle (comme des couples de moins de 30 ans avec 1 an d’infertilité environ) auront conçu au bout d’une année supplémentaire, et 97 % 3 ans. Le temps est donc clairement un premier traitement de l’infécondité, bien qu’il doive être analysé avec les antécédents du couple et l’âge de la patiente.

Tableau I – Évolution de la fertilité en fonction du temps. D’après Léridon et Spira (11).

Durée d’infécondité	Couples stériles (%)	Fécondabilité (%)	
		des non stériles	Totale
0	3	25	24
6 mois	11	16	14
1 an	24	12	10
5 ans	89	4	0,4

Tableau II – Proportion de couples sans conception selon la fécondabilité et la durée de leur recherche. D’après Léridon et Spira (11).

Durée (ans)	Fécondabilité		
	0,10	0,25	0,40
1	33,5	9,9	5,0
2	14,6	2,9	1,6
3	2,6	0,4	0,3

Prévalence de l’infécondité

L’incidence de l’infécondité (pourcentage de nouveaux couples inféconds apparus dans une unité de temps, généralement une année) est difficile à connaître (11). On connaît un peu mieux sa prévalence, c’est-à-dire le pourcentage de couples confrontés, à un moment donné, à l’infécondité. Celle-ci dépend de la définition utilisée. Dans les enquêtes démographiques, le critère retenu a souvent été la notion de difficultés à concevoir, telle

Tableau III – Évolution de l'infertilité globale au cours du temps, en Angleterre chez des femmes de 40 à 55 ans. D'après Oakley *et al.* (19).

Année de naissance des femmes	Absence de grossesse	Absence de naissance	Naissance après traitement
1945–1949	2,7 (1,8–3,5)	4,1 (3,1–5,2)	2,7 (1,8–3,5)
1950–1954	2,0 (1,4–2,6)	3,7 (2,8–4,5)	3,9 (1,0–4,7)
1955–1959	2,7 (2,0–3,4)	4,6 (4,1–5,9)	4,8 (3,9–5,6)
1960–1962	2,2 (1,5–3,1)	4,2 (2,9–5,4)	6,0 (4,5–7,4)
<i>p</i> pour la tendance	0,35	0,94	0,001

que rapportée par les couples. En 1978, Léridon (12) avait estimé cette proportion à 18,4 %, et cette proportion avait augmenté à 24 % en 1988 (13). Cependant cette définition dépend fortement de l'impatience des couples devant le désir d'enfant (13), et l'augmentation retrouvée n'est probablement que l'effet de l'accroissement de l'impatience. En effet, en ne considérant que les couples ayant eu un délai minimum d'un an avant de concevoir ou n'ayant jamais conçu, le pourcentage de couples présentant des difficultés diminuait à 16,7 % en 1988. Ceci a aussi été rencontré dans d'autres pays (14, 15). Sur le plan médical, on parle d'infécondité lorsque les couples ont attendu suffisamment longtemps, généralement au moins un an (3). Sa prévalence a été estimée en France, en 1989, à 14,1 %, à partir d'une enquête réalisée dans trois régions (16). Ce taux concordait avec les estimations démographiques et ne montrait pas d'évolution claire en France. De nombreuses autres études ont montré des résultats voisins. Ainsi, une étude danoise, sur un échantillon représentatif de 3 743 femmes, de 15 à 44 ans, du Comté de Copenhague (17) a montré une prévalence cumulée d'infécondité (absence de grossesse après un an d'essai) de 15,7 %, donc voisin. Une étude rétrospective européenne (18), dans cinq pays, a montré que, sur l'ensemble des participants, 16 % avaient mis plus d'un an pour concevoir, avec une variation de 10 % à 24 % selon les pays. Très récemment, Oakley *et al.* (19), sur un échantillon représentatif de 6 584 Anglaises de moins de 55 ans ont mis en évidence que 2,4 % de celles âgées de 40 à 55 ans n'avaient pu devenir enceintes et que 1,9 % avaient été enceintes, mais sans obtenir d'enfants. Par ailleurs, 16 % des femmes avaient consulté au moins une fois pour infertilité dont la moitié (8 %) avaient reçu un traitement. Au total, 4,2 % des femmes disaient avoir obtenu au moins une grossesse sous traitement. Boivin *et al.* ont analysé la prévalence de l'infécondité à partir de toutes les études de population publiées depuis 1990 et dont la méthodologie leur paraissait correcte, soit 28 études épidémiologiques (20). Dans les pays développés, 3,5 à 16,7 % des femmes de 20 à 44 ans se plaignaient d'infécondité supérieure à un an au moment de l'étude. La prévalence cumulée (pourcentage de femmes ayant présenté une infécondité au moins égale à un an au cours de leur vie) allait de 6,6 à 26,4 %.

La question de l'évolution de l'infertilité au cours du temps est souvent posée, en raison, notamment, de modifications de l'environnement. Il n'existe que peu de publications sur ce sujet. Cette question a notamment été étudiée sur une cohorte danoise de jumeaux (2 198 hommes et 2 116 femmes) nés de 1931 à 1952 (21), et dont plus de 80 % répondirent au questionnaire. Aucune tendance significative n'a pu être mise en évidence après prise en compte de l'âge, de l'exposition au tabac et de la contraception. En revanche, dans l'étude anglaise (19), si la proportion de femmes sans enfant n'évolue pas dans le temps, le pourcentage de grossesses obtenues après traitement augmentait significativement avec le temps (tableau III), sans que l'on puisse bien définir les parts respectives de l'impatience et de l'infertilité elle-même.

Facteurs d'infertilité

De nombreux facteurs peuvent jouer un rôle sur la fertilité, tant du côté de la femme, que de l'homme ou du couple, notamment endocriniens, mécaniques ou généraux. Dans ce chapitre, seront essentiellement développés les facteurs généraux, notamment l'âge et l'exposition au tabac.

Âge et infertilité

La fertilité de la femme diminue clairement avec l'âge, comme cela a été montré en fertilité naturelle, chez des femmes sans aucune méthode ni volonté contraceptive, sur des données historiques ou dans des sectes refusant le contrôle des naissances, comme les huttérites (22). La fertilité diminue progressivement dès 30 ans, surtout entre 35 et 40 ans, et devient presque nulle à 45 ans. Ces données ont été confirmées en insémination artificielle avec donneur (23) et en fécondation *in vitro* (24), et un point d'inflexion a pu être déterminé entre 37 et 38 ans. Dans l'étude européenne prospective sur la fertilité (18), le risque d'hypofertilité augmentait avec l'âge par rapport à des femmes de 25 à 29 ans. Cette augmentation n'était pas significative pour des femmes de 30 à 34 ans (odds

ratios (OR) = 1,16 ; intervalle de confiance (IC) à 95 % : 0,94–1,44), mais le devenait ensuite, de 35 à 39 ans (OR ; 1,69 ; 1,20–2,37), et de 40 à 44 ans (OR = 6,54 ; 2,69–15,9). Dans une autre étude européenne prospective, portant sur 782 couples de 18 à 40 ans cherchant à concevoir (25), le pourcentage d’infertilité passait de 8 % pour des femmes de 19 à 26 ans, à 13–14 % entre 27 et 34 ans et 18 % entre 35 et 39 ans. Cette diminution de la fertilité est notamment liée à la fois à une diminution de la qualité ovocytaire et donc embryonnaire, comme l’atteste l’augmentation concurrente des avortements spontanés (40 % après 42 ans) et des anomalies chromosomiques. Elle est probablement aussi liée à une baisse de l’implantation, comme l’atteste la diminution du taux de grossesse par embryon transféré en FIV, bien que les données des dons d’ovocytes montrent que le facteur endométrial peut être corrigé. Par ailleurs, en fertilité naturelle, le nombre de cycles anovulatoires atteint 12 % entre 41 et 45 ans (26), et le nombre de cycles avec une phase lutéale courte passe de 7,3 % vers 20–25 ans à 19,6 % entre 40 et 44 ans (27). Enfin, Faddy *et al.* (28) ont montré qu’il existait une diminution du nombre de follicules ovariens chez la femme, avec un point d’inflexion brutal entre 37 et 38 ans.

Si l’effet de l’âge de la femme est bien connu, il a fallu beaucoup plus longtemps pour admettre celui de l’âge de l’homme. Il est vrai que les deux âges sont globalement corrélés et que l’effet de l’âge de l’homme est souvent caché par celui, plus important, de la femme, et nécessite donc une approche particulière. Les deux études européennes déjà citées ont analysé et montré que l’âge de l’homme jouait un rôle indépendant de celui de la femme. Dans l’étude prospective, le taux d’infertilité atteignait 18–28 % entre 35 et 39 ans (25). Dans l’étude prospective, on observait une augmentation nette du risque d’infertilité (tableau IV) selon l’âge de l’homme pour des femmes de même âge (29, 30), retrouvée aussi en AMP (31). Cette diminution s’accompagne aussi d’une augmentation du risque d’avortement spontané (32). Enfin, il a aussi été montré que les caractéristiques du sperme se modifiaient avec l’âge (33).

Tableau IV – Évolution de l’infertilité et des avortements spontanés avec l’âge de l’homme. D’après de Larochebrochard *et al.* (29, 30, 32).

Âge		Infertilité	Avortement
Paternel	Maternel	OR et IC à 95 %	OR et IC à 95 %
≤ 29	≤ 29	1,00	1,00
35-39	35-39	1,23 (0,76-1,98)	3,35 (1,42-7,88)
35-39	40-44	2,88 (1,58-5,25)	7,88 (2,99-20,78)
35-39	45-49	3,00 (0,89-10,11)	9,14 (1,67-50,01)

Ajusté sur : pays, rang, consommation de tabac de la femme et de l’homme, activité sexuelle, antécédents de fausse couche, de GEU, d’IVG (et délai de conception pour risque de fausse couche).

Tabac et infertilité

Un autre facteur souvent mis en cause dans la fertilité est le tabagisme de la femme. Il a pu être montré que celle-ci était diminuée de 15 % chez les fumeuses (10). Dans l’étude collaborative européenne rétrospective (34), le risque d’infertilité était nettement augmenté chez les fumeuses (OR = 1,7 ; 1,3–2,1), que ce soit pour une première grossesse ou pour une grossesse ultérieure, et en tenant compte de l’âge de la femme. Dans une autre étude, les femmes fumant plus de 15 cigarettes présentaient un doublement du délai nécessaire à concevoir (35). L’exposition au tabac est aussi susceptible d’être facteur d’infertilité chez les femmes exposées *in utero* (36, 37), et des arguments existent aussi sur le risque d’oligospermie chez les hommes exposés *in utero* (38). Le tabac semble aussi avoir un impact défavorable sur les résultats de l’AMP (39), peut-être même lorsqu’il s’agit de tabagisme passif (40). Il est difficile de déterminer si l’augmentation de l’infertilité est due à une action directe de la nicotine ou d’autres composants de la cigarette sur l’ovulation, sur la mobilité des trompes, ou si une partie au moins de son action passe par le comportement (augmentation du risque de MST chez les fumeuses).

Maladies sexuellement transmissibles et infertilité

Les maladies sexuellement transmissibles représentent aussi un facteur d’infertilité, bien connu depuis les travaux de Westrom (41). Les MST entraînent des salpingites dans 25 % des cas, elles-mêmes sources d’occlusion tubaire dans 17 % des cas. Cependant, l’évolution de la fréquence des MST, bien que très mal connue, ainsi que de leurs traitements peut avoir d’importantes conséquences sur l’évolution des occlusions tubaires à moyen terme.

Qualité du sperme et infertilité

La fertilité est évidemment liée, chez l’homme, à la qualité de son sperme, ainsi que cela a bien été montré par Bonde *et al.* (42). Dans cette enquête prospective sur 430 couples suivis 6 mois, les auteurs montraient une augmentation des taux de grossesses avec la concentration, surtout jusqu’à 20 millions/mL, avec la mobilité totale, surtout jusqu’à 40 %, et avec la morphologie, sans seuil. Ces données ont été confirmées dans une étude européenne (43), avec des seuils légèrement différents. Un grand débat concerne l’évolution de cette qualité au cours des 50 dernières années, depuis la publication de Carlsen *et al.* (44) qui avait

montré, à partir des études publiées dans la littérature, une diminution de la numération de 113 à 66 millions/mL entre 1938 et 1991. La réalité de cette diminution fait l'objet de nombreux débats, d'autant qu'elle présente une variabilité régionale. Mais cette variabilité même, ainsi que la constatation d'autres pathologies masculines (cancer du testicule et hypospadias) ont abouti au concept de dysgénésie testiculaire, en relation avec l'environnement et les perturbateurs endocriniens que celui-ci comprend (45-47).

Facteurs liés aux couples

La stratégie utilisée dans la recherche d'une conception est certainement liée aux chances de succès. Ainsi, le taux de grossesse peut atteindre 68 % pour Barret (48) et 49 % pour Schwartz (49) lorsque la fréquence des rapports devient quotidienne et le taux de grossesse est plus élevé lorsque les rapports précèdent l'ovulation de 2 jours (50). De même, en IAD, on a pu montrer que les meilleurs résultats étaient observés pour des inséminations 1 et 3 jours avant le nadir (51).

Causes d'infécondité

La détermination de la répartition des causes d'infécondité est plus difficile que la simple mesure de la prévalence de l'infertilité. En effet, cette dernière peut reposer sur la simple déclaration des couples qui, généralement, arrivent à se souvenir de leurs difficultés et du temps mis pour obtenir la grossesse désirée. En ce qui concerne l'origine de celle-ci, il est, au niveau de chaque couple, à la fois nécessaire que l'infertilité ait été diagnostiquée et explorée et que cette exploration ait été complète. Par ailleurs, il n'est pas correct d'utili-

ser les statistiques d'un service d'infertilité dont la clientèle est biaisée tant parce que les couples y accèdent généralement de manière non systématique et après un temps plus ou moins long et que, de plus, ces centres sont souvent plus ou moins spécialisés dans un domaine particulier. Pour véritablement déterminer la répartition des causes, il faudrait disposer d'échantillons non biaisés de couples infertiles, représentatifs de la population, et que ces couples aient pu bénéficier d'un bilan exhaustif. Or, la plupart des enquêtes sur dossiers médicaux ne sont pas réalisées sur un échantillon représentatif et les enquêtes démographiques, bien que représentatives, ne peuvent généralement pas disposer de bilan clinique. Une alternative intéressante est constituée par les enquêtes réalisées au niveau d'un district ou d'une région. Ainsi, en France, on ne dispose actuellement que d'une enquête, déjà ancienne (1988), réalisée sur l'ensemble des couples consultant pour une infertilité d'au moins un an dans trois départements de l'ouest de la France (16). Dans cette enquête, la femme était en cause dans 72 % des cas (tableau V), (seule, dans 34 % seulement), l'homme était en cause dans 58 % des cas (seul, dans 20 %), et les deux membres du couple étaient « responsables » ensemble dans 38 % des cas. Enfin, dans 8 % on ne retrouvait pas de cause (infécondité idiopathique). Parmi les causes elles-mêmes, on retrouvait, chez la femme, des troubles de l'ovulation dans un tiers des cas, une anomalie tubaire dans un quart des cas et des causes diverses dans 16 % (dont 4 % d'endométriose). Chez l'homme, il s'agissait d'une diminution de la concentration, de la mobilité ou des formes typiques isolées ou associées, dans 49 % des cas, et d'une azoospermie dans 9 % des cas. Les deux tiers des azoospermies étaient d'origine non obstructive. La répartition des causes d'infertilité retrouvée dans cette étude épidémiologique était compatible avec celle calculée à partir d'une analyse de

Tableau V – Distribution des causes d'infécondité.

		Origines		Causes	
		Thonneau (16)	Spira (52)	Thonneau (16)	Spira (52)
Femme	Total	72	61	Ovulation	32
	Seule	34	36	Trompes	26
				Endométriose	4
				Glaire	4
				Tractus génital	4
				Prolactine	4
	Association	38	25		
Homme	Total	58	46	Oligo-asthéo-azoospermie	49
	Seul	20	21	Azoospermie sécrétoire	6
				Azoospermie excrétoire	3
Aucun		8	18		

la littérature légèrement plus ancienne (52), et de ceux d'une enquête danoise réalisée sur un échantillon représentatif un peu plus récente (17).

Conclusion

Ainsi, il est généralement admis que la fréquence de l'infertilité, définie par une absence de conception de plus de 12 mois (avec rapports non protégés en zone fertile), se situe autour de 15 %, bien qu'elle puisse varier selon les populations ou les groupes de population. Elle ne semble pas évoluer beaucoup, même si des incertitudes se profilent sur l'évolution de la fertilité masculine. Par ailleurs, la tendance observée depuis de nombreuses années à l'augmentation de l'âge de la maternité pourrait aboutir aussi à une augmentation de l'infécondité involontaire au niveau des populations, liée en fait à une diminution normale de la fertilité avec l'âge et non à une diminution réelle de la fécondabilité. Par ailleurs, il faut aussi rappeler le rôle très nocif de la consommation de tabac sur la fertilité. La prévalence des diverses causes d'infécondité est moins bien connue, surtout en raison des difficultés méthodologiques rencontrées, mais mériteraient de mettre en place des études épidémiologiques. Enfin, on ne peut, non plus, oublier que les couples sont de plus en plus exigeants sur la rapidité de réalisation de leur désir d'enfants, ce qui peut mener à porter un diagnostic d'infécondité et à proposer des traitements à des couples auxquels on aurait simplement proposé d'attendre un peu plus il y a quelques années, comme le montre l'augmentation progressive de la pratique des traitements de l'infertilité.

Références

- Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD (2001) Medical, ethical & social aspects of assisted reproduction. Current practices & controversies in assisted reproduction: Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland
- Léridon H (1973) Aspects biométriques de la fécondité humaine. Paris, PUF
- Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson D *et al.* (2006) The International Committee Monitoring Assisted reproductive Technologies (ICMART) glossary on ART terminology. *Fertil Steril* 86: 16-9
- Hertig AT (1987) The overall problem in man. In: Benvischke, eds. Comparative aspects of reproduction failure. New York, Springer Verlag
- Dubuisson JB, Foulot H, Ranoux C *et al.* (1989) IVF without ovarian stimulation. A simplified protocol applied in 90 cycles. VIth Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Procreation. Jerusalem, April 2-7
- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF *et al.* (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 38: 447-83
- Gini C (1924) Premières recherches sur la fécondabilité de la femme. *Proc Math Congr. Toronto*: 889-99
- Schwartz D (1980) La notion de fécondabilité dans l'approche étiologique, diagnostique et thérapeutique de l'infécondité. *J Gyn Obst Biol Repr* 9: 607-12
- Maruani P, Schwartz D (1983) Sterility and fecundity estimation. *J Theoret Biol* 105: 211-19
- de Mouzon J, Spira A, Schwartz D (1988) A prospective study on the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 17: 378-84
- Léridon H, Spira F (1984) Problems in measuring the effectiveness of infertility therapy. *Fertil Steril* 41: 581-6
- Léridon H (1982) Stérilité, hypofertilité et infécondité en France. *Population* 37: 807-36
- Léridon H (1991) Stérilité et hypofertilité : du silence à l'impatience. *Population* 46: 227-48
- Aral SO, Cates W (1983) The increasing concern with infertility. *J Med Assoc* 250: 2327-331
- Hirsch MB, Mosher WD (1987) Characteristics of infertile women in the United States and their use of infertility services. *Fertil Steril* 47: 618-25
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A *et al.* (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 6: 811-16
- Schmidt L, Münster K, Helm P (1995) Infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 978-84
- Juul S, Karmaus W, Olsen J and The European Infertility and Subfecundity Study Group (1999) Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. *Hum Reprod* 14: 1250-4
- Oakley L, Doyle P, Maconochie N (2008) Lifetime prevalence of infertility and infertility treatment in the UK: results from a population-based survey of reproduction. *Hum Reprod* 23: 447-50
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 22: 1506-12
- Jensen TK, Joffe M, Scheike T *et al.* (2005) Time trends in waiting time to pregnancy among Danish twins. *Hum Reprod* 20: 955-64
- Menken J, Larsen U (1986) Fertility rates and aging. In: Ageing, reproduction and the climacteric. Mastroianni L, Paulsen CA, eds. New York, Plenum Press: 147-66
- Fédération CECOS, Schwartz D, Mayaux MJ (1982) Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2,193 nulliparous women with azoospermic husbands. *N Eng J Med* 306: 404-6
- Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, Spira A (1990) In vitro fertilization: Influence of women's age on pregnancy rate. *Hum Reprod* 5: 56-9
- Dunson DB, Baird DD, Colombo B (2004) Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol* 103: 51-6
- Doring GK (1969) The incidence of anovular cycles in women. *J Reprod Fert* 6: 256-63
- Chiazze L, Brayer FT, Macisco LJ *et al.* (1968) The length and variability of the human menstrual cycle. *JAMA* 20: 377-80
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A *et al.* (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reprod* 7: 1342-6
- De Larochebrochard E, Thonneau P (2003) Paternal age > or = 40 years: an important risk factor for infertility. *Obstet Gynecol* 189: 901-5
- La Rochebrochard (de) E, McElreavey K, Thonneau P (2003) Paternal age over 40 years: the 'amber light' in the reproductive life of men? *J Androl* 24: 459-65

31. De Larochebrochard E, de Mouzon J, Thépot F, Thonneau P and the Fivnat group (2006) Failure to conceive and older fathers: the lessons of IVF in France. *Fertil Steril* 85: 1420-4
32. De Larochebrochard E, Thonneau P (2002) Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage. Results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 17: 1649-56
33. Schwartz D, Mayaux MJ, Guilhard-Moscato ML *et al.* (1983) Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril* 39: 530-5
34. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J and the european study group on infertility and subfecundity (1996) Smoking reduces fecundity: a european multicenter study on infertility and subfecundity. *J Epidemiol* 143: 578-87
35. Hassan MAM, Killick SR (2004) Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 81: 384-92
36. Jensen TK, Henriksen TB, Hjollund NH *et al.* (1998) Adult and prenatal exposures to tobacco smoke as risk indicators of fertility among 430 Danish couples. *J Epidemiol* 148: 992-7
37. Jensen TK, Joffe M, Scheike T, Skytthe *et al.* (2006) Early exposure to smoking and future fecundity among Danish twins. *Int J Androl* 29: 603-13
38. Jensen MS, Mabeck LM, Toft G *et al.* (2005) Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Human Reprod* 20: 2559-66
39. Belaisch-Allart J, El-Akoum S, Mayenga JM *et al.* (2007) Cigarette smoking and the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 76: 227
40. Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG (2005) Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* 20: 2531-5
41. Weström L (1980) Incidence, prevalence and trends of acute pelvic inflammatory disease and its consequences in industrialized countries. *J Obstet Gynecol* 138: 880-92
42. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK *et al.* (1998) Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352: 1172-7
43. Slama R, Eustache F, Ducot B *et al.* (2002) Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 17: 503-15
44. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-14
45. Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-5
46. Sharpe RM (1994) Could environmental, oestrogenic chemicals be responsible for some disorders in human male reproductive development? *Curr Opin Urol* 4: 295-301
47. Sharpe RM, Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 89: e33-8
48. Barret JC (1971) Fecundability and coital frequency. *Population studies* 25: 561-6
49. Schwartz D, Mc Donald PDM, Heuchel V (1980) Fecundability, coital frequency and the viability of the ova. *Population Studies* 34: 397-400
50. Barret JC, Marshall J (1969) The risk of conception on different days of the menstrual cycle. *Population Studies* 23: 455-61
51. Schwartz D, Mayaux MJ, Martin-Boyce A *et al.* (1979) Donor insemination: conception rate according to cycle day in a series of 821 cycles with a single insemination. *Fertil Steril* 31: 226-9
52. Spira A, de Mouzon J (1985) Epidemiological aspects of in vitro fertilization and embryo transfer. In: Testart J, Frydman R, eds. *Human in vitro fertilization*. INSERM symposium n°24. Amsterdam, Elsevier Sciences: 263-76

F. Merlet et F. Thépot

Organisation et régulation de l'assistance médicale à la procréation en France par l'Agence de la biomédecine : rôles, missions et avenir

Introduction – De l'émergence de l'assistance médicale à la procréation aux lois de bioéthique

L'assistance médicale à la procréation (AMP) naît dans les années 1970 lorsque l'insémination avec don de sperme s'organise au sein des Centres d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains (CECOS). Conscients des craintes et des fantasmes que le don de sperme suscite, ces pionniers de l'AMP élaborent une charte qui le place dans le domaine du don gratuit et anonyme d'éléments du corps humain, œuvrant ainsi pour sortir cette activité de la clandestinité tout en maintenant le secret sur la démarche individuelle, tant des donneurs que des couples bénéficiaires. Pour eux, le don de sperme s'inscrit dans une démarche généreuse et altruiste d'un homme déjà père. Dans cette perspective, sa conjointe donne son consentement, faisant de ce don celui d'un couple à un autre couple. L'arrivée des techniques de fécondation *in vitro* (FIV), de congélation embryonnaire et du don d'ovocytes, fait évoluer le regard de la société sur la stérilité du couple qui n'est plus une fatalité mais devient une pathologie accessible à un traitement médical. Ces nouvelles techniques suscitent l'enthousiasme mais laissent aisément imaginer les dérives possibles. Pour la première fois en effet, l'embryon humain est directement accessible *in vitro*.

L'assistance médicale à la procréation devient ainsi l'un des premiers sujets de réflexion bioéthique. En France d'ailleurs, le Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé (CCNE) est créé en 1983, peu après la première naissance française par FIV. Parallèlement, pour asseoir leur crédibilité, les professionnels s'organisent en sociétés savantes (GEFF, BLEFCO, etc.) ou fédération (CECOS) au sein desquelles les discussions éthiques occupent une très large place. Ils mettent en place le registre FIVNAT permettant une évaluation en toute transparence de l'ensemble des tentatives réalisées en France.

Dès la fin des années 1980, le ministre chargé de la santé impose un régime spécifique d'autorisation pour les activités d'AMP. Le ministre appuie alors ses décisions sur l'avis d'une commission consultative siégeant à la Direction générale de la santé, la Commission nationale de médecine et biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal (CNMBRDP), à laquelle participent des praticiens de l'AMP.

Toutes ces actions concourent précocement à encadrer les pratiques françaises.

Et pourtant, les années 1980 voient émerger des craintes, souvent irrationnelles, de situations fantasmagoriques. Reprises dans les médias et répétées à l'envie, des histoires imaginées contribuent à créer un climat de suspicion vis-à-vis des embryologistes considérés parfois comme des apprentis sorciers : « les embryons congelés vont être conservés pendant plusieurs générations pour que renaissent de nouveaux Hibernatus », ou encore « comme une tragédie oédipienne, des ovocytes d'une femme allaient être fécondés par les spermatozoïdes de son fils »... D'innombrables questions sur les implications sociales, culturelles, morales et juridiques, posées par des projets scientifiques en matière de procréation, entretiennent alors le débat avec parfois des annonces retentissantes, aussitôt contestées, de scientifiques controversés ou de sectes, sur de prétendus clonages humains.

Plus concrètement, des affaires ponctuelles émergent en France comme dans d'autres coins du monde. Citons par exemple cette histoire de désaveu de paternité d'un homme stérile après avoir consenti à l'insémination de sa conjointe par un sperme de donneur, qui met en exergue la précarité du statut de l'enfant issu de don de sperme. Ou encore cette femme qui a revendiqué son droit à être fécondée par le sperme conservé de son conjoint décédé. Dans ces différentes affaires, les tribunaux doivent prendre des décisions qui ne sont pas toujours comprises.

Tous sont alors convaincus de la nécessité absolue de réaffirmer, cette fois par un texte de loi, les grands principes éthiques qui doivent être respectés dans

toute pratique d'AMP. Mais il faut se rendre compte que les questions soulevées par les progrès scientifiques et techniques dans le domaine des sciences de la vie alimentent en France un débat public qui dépasse le cadre strictement médical de l'AMP. Deux questions spécifiques font particulièrement débat, le clonage thérapeutique et la recherche sur l'embryon. Le débat aboutit finalement, au terme d'un long et chaotique parcours, au vote des premières lois de bioéthique en 1994¹. Ces lois définissent des grands principes éthiques. Elles encadrent le développement du progrès biomédical tout en protégeant les droits fondamentaux de la personne. Les dispositions reprises par le législateur concernant l'AMP et le don de gamètes s'inspirent largement de la charte que s'était donnée la fédération des CECOS, en considérant notamment l'infertilité comme une maladie et l'AMP comme une thérapeutique. Afin de ne pas entraver la dynamique de la recherche et tenir compte des évolutions, non seulement technologiques mais aussi sociétales, le législateur a inscrit dans la loi elle-même le principe de sa révision au bout de cinq ans, après une évaluation de son application par l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST) et un nouvel examen par le Parlement. La nouvelle loi relative à la bioéthique sera finalement promulguée le 6 août 2004, soit dix ans après la première.

Le cadre juridique de l'assistance médicale à la procréation La loi du 6 août 2004 relative à la bioéthique

Comme celles de 1994, la loi du 6 août 2004² encadre différents domaines de la médecine qui ont en commun des enjeux éthiques majeurs et un essor récent et rapide. Elle traite notamment les questions relatives au don d'éléments du corps humain (à l'exception du sang qui fait l'objet d'une loi spécifique), à la recherche sur l'embryon, à l'assistance médicale à la procréation (AMP) et au don de gamètes et d'embryons, au diagnostic prénatal (DPN), au diagnostic préimplantatoire (DPI) et à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales. Le législateur y réaffirme les grands principes éthiques fixés dans les textes fondateurs de 1994 et destinés à assurer la protection de la personne humaine face aux progrès de la science médicale sans attenter à la liberté des scientifiques.

Comme en 1994, le législateur introduit dans la loi le principe de sa révision cinq ans après son entrée en vigueur. La loi de 2004 est à l'origine de la création de l'Agence de la biomédecine. En tant que nouvelle agence sanitaire de l'État, l'Agence de la biomédecine reprend les précédentes missions de l'Établissement français des greffes et ajoute des missions d'évaluation, de suivi et de contrôle dans les domaines de la procréation, de l'embryologie et de la génétique humaines.

En matière de procréation et d'embryologie, cette loi n'entraîne pas de changements majeurs. Elle réaffirme l'interdiction de la recherche sur l'embryon, sur les cellules embryonnaires et les cellules fœtales mais autorise une procédure dérogatoire encadrant strictement la recherche s'il est démontré qu'elle est susceptible d'apporter un progrès thérapeutique majeur et qu'il n'existe pas d'alternatives possibles. Elle ouvre le droit au double diagnostic préimplantatoire permettant de mettre en œuvre un diagnostic biologique à la recherche de la maladie familiale et d'une compatibilité HLA sur les embryons conçus au cours d'une FIV.

La loi et l'assistance médicale à la procréation

Les normes imposées aux activités d'AMP, telles qu'elles sont définies dans la loi relative à la bioéthique, s'intègrent dans un ensemble cohérent de lois qui porte sur les droits des malades et l'accès aux soins, la protection des données personnelles et la recherche biomédicale, et dans lequel les principes de respect de la dignité humaine et de l'intégrité du corps humain, de non-patrimonialité du corps humain et de l'interdiction de toute pratique eugénique sont constamment réaffirmés.

La loi définit l'AMP comme un acte de soin dont les bénéficiaires sont des patients. L'AMP s'inscrit dans le cadre des traitements de l'infertilité et son coût est pris en charge par la solidarité nationale au même titre que tout autre acte de soin. Un embryon ne peut être conçu *in vitro* que dans le cadre du projet d'un couple d'avoir un enfant. La loi de 2004 ajoute que l'AMP peut également être mise en œuvre dans le but d'éviter la transmission d'une maladie grave au conjoint (par exemple dans le cas d'un conjoint infecté par le VIH) ou à l'enfant. Dans cette définition juridique, en aucun cas la convenance personnelle ne peut justifier une prise en charge ou un embryon ne peut être conçu pour la recherche.

Les textes européens

Concomitamment à la promulgation de la loi française relative à la bioéthique, la directive européenne

1. Loi du 29 juillet 1994 sur le corps humain, le don et l'utilisation des éléments et produits du corps humain ; loi 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain ; loi 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal.

2. Loi 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.

du 31 mars 2004³ encadre le domaine du prélèvement et de la collecte des tissus ou cellules jusqu'à leur utilisation en vue d'une application thérapeutique. Elle fixe des normes de qualité et de sécurité que doivent respecter tous les états membres. Elle les oblige à contrôler ces activités par des dispositifs d'agrément, d'inspection, de traçabilité et de mise en place de registres, garantissant un même niveau de qualité et de sécurité des soins pour les patients libres de circuler au sein de l'Union européenne. Cela concerne aussi les activités biologiques d'AMP. Pour la France, l'ordonnance du 22 mai 2008 modifie quelque peu la loi du 6 août 2004⁴ en transposant dans le droit français les dispositions de cette directive en matière de don de gamètes et d'AMP.

Les textes d'application

De façon générale, des textes d'application, décrets et arrêtés, sont nécessaires pour mettre en œuvre les lois mais leur publication parfois tardive rend souvent difficile le bilan qui peut en être fait. À titre d'exemple, le décret relatif à l'AMP et au don de gamètes⁵ est publié deux ans et demi après l'entrée en vigueur de la loi du 6 août 2004. C'est ce dernier qui permet enfin à l'Agence de la biomédecine de prendre en charge ses missions d'autorisation et d'agrément.

Comme pour la loi nationale, la mise en œuvre de la directive européenne 2004-23 a été possible grâce à deux directives techniques publiées en 2006 et l'obligation de les transposer dans le droit national français a imposé la rédaction d'un décret modificatif⁶ paru en juin 2008.

De nombreux arrêtés viennent compléter les décrets d'application. Certains d'entre eux, difficiles à élaborer, ne seront vraisemblablement pas pris d'ici le vote de la nouvelle loi. C'est notamment le cas d'un arrêté prévoyant de fixer la liste des techniques d'effet équivalent à l'AMP.

Malgré la publication tardive ou incomplète de certains textes, le dispositif d'encadrement des activités d'AMP est assez proche de ce que préconisent les instances européennes et peu de pays ont d'ores et déjà un cadre juridique rigoureux équivalent à celui qui est mis en place en France. L'Agence de la biomédecine va jouer un rôle majeur dans la régulation de cette activité.

La révision de la loi de 2004

Afin de préparer les débats parlementaires et de faire en sorte que la nouvelle loi soit votée avant 2011, des états généraux de la bioéthique se sont tenus courant 2009 comprenant de très nombreuses auditions devant la mission parlementaire, des débats publics au travers de forums régionaux et de réunions organisées par les espaces éthiques régionaux. De nombreuses instances, dont l'OPECST, le Conseil d'État, le CCNE, l'Académie de médecine, les sociétés professionnelles, les associations, ont produit des recommandations issues d'une réflexion approfondie sur la loi actuelle et les modifications souhaitées. Rarement une loi a été autant débattue, notamment au niveau citoyen. Il est impossible à ce jour de connaître l'issue des débats parlementaires et d'anticiper sur les futures évolutions de la loi de bioéthique de 2004.

L'Agence de la biomédecine : une nouvelle agence sanitaire

Depuis un certain nombre d'années déjà, les professionnels de l'AMP se prononçaient pour la création d'une autorité régulant et expertisant spécifiquement les activités de la médecine et de la biologie de la reproduction, au sein de laquelle ils pourraient s'exprimer et faire valoir librement leur point de vue, plus facilement qu'au sein de la CNMBRDP.

Agence d'expertise et de régulation dans tous ses champs de compétence, l'Agence de la biomédecine est une structure reconnue et de qualité, unique en Europe. Elle rassemble des domaines qui ont en commun un essor rapide dû au progrès des connaissances et des techniques d'une part, et à l'évolution de la société d'autre part. Elle est la deuxième agence après l'HFEA⁷ pour la procréation et la recherche sur l'embryon et les cellules embryonnaires.

Un décret d'application lui est consacré⁸ et sa mise en place est effective depuis le 10 mai 2005. Elle est sous la tutelle du ministère de la Santé français avec qui elle négocie un contrat de performance tous les quatre ans. Celui-ci définit avec précision les objectifs stratégiques et les actions menées par l'Agence, objectifs mesurés grâce à des indicateurs de suivi prenant en compte les moyens nécessaires à ses actions.

Une agence d'expertise

L'Agence de la biomédecine est l'autorité de référence pour les aspects médicaux et scientifiques relatifs à

3. Directive européenne 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains.

4. Ordonnance 2008-480 du 22 mai 2008 transposant en matière de don de gamètes et d'assistance médicale à la procréation la directive 2004/ gamètes et à l'assistance médicale à la procréation.

5. Décret 2006-1660 du 22 décembre 2006 relatif au don de gamètes et à l'assistance médicale à la procréation.

6. Décret 2008-588 du 19 juin 2008 transposant en matière de don de gamètes et d'assistance médicale à la procréation la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004.

7. HFEA : Human fertilisation and embryology authority. Organisme britannique indépendant de régulation pour l'utilisation des gamètes et des embryons dans les traitements de la fertilité et la recherche.

8. Décret 2005-420 du 4 mai 2005 relatif à l'Agence de la biomédecine.

l'utilisation des éléments du corps humain : organes, tissus, cellules, gamètes, notamment lorsqu'ils sont prélevés à des fins thérapeutiques. Elle a pour mission de contribuer au développement maîtrisé de ces activités et doit tout mettre en œuvre pour que chaque patient reçoive les soins dont il a besoin, dans le respect des règles de sécurité sanitaire, d'éthique et d'équité, par l'encadrement, le contrôle, l'évaluation, l'expertise et la transparence des activités médicales et biologiques relevant de sa compétence. L'Agence participe à l'élaboration et à l'application de la réglementation en liaison avec les services de l'État et les professionnels de santé. Elle accompagne les professionnels de santé dans l'application de nouveaux textes réglementaires après leur publication. En matière d'évaluation, elle analyse les résultats des activités pour mesurer leur efficacité et concourir au développement de ces pratiques médicales en constante évolution. Elle doit ainsi établir et publier un état des lieux détaillé des moyens mis en œuvre et des résultats obtenus en France.

Les activités d'AMP relèvent de ses compétences.

Dans le domaine de la procréation assistée, les missions de l'Agence sont clairement définies dans la loi, le décret de 2005 et le contrat de performance négocié avec l'autorité de tutelle. Elles ont pour premier objectif de sécuriser l'offre de soins :

- contribuer à l'amélioration des conditions de prise en charge de l'AMP et développer la qualité, la sécurité et l'évaluation transparente des activités ;
- promouvoir les dons de gamètes ;
- assurer une information juste et complète du public, du gouvernement et des professionnels sur les activités d'AMP ;
- apporter une contribution efficace à l'activité réglementaire et aux politiques de santé publique, ainsi qu'à l'action internationale.

Les instances de l'Agence de la biomédecine

Pour remplir ses missions, l'Agence de la biomédecine s'appuie sur différentes instances décrites brièvement ci-dessous.

Le conseil d'administration (CA) est composé d'un président désigné par décret et de 36 membres, titulaires ou suppléants, désignés par arrêté ministériel. Nommés pour une durée de trois ans, ils sont choisis pour représenter les différents ministères et établissements publics à caractère sanitaire ou en qualité de personnalités qualifiées dans les domaines de compétences de l'Agence ; deux spécialistes de l'AMP figurent parmi ces derniers. Le CA fixe les orientations générales de l'Agence. Il se réunit trois fois par an pour aborder des sujets traitant aussi bien du budget, de la stratégie ou de la gestion du personnel que de ses domaines d'activités ou encore de la promotion du don.

Le conseil d'orientation (CO) est composé d'un président et de 24 membres nommés par arrêté ministériel pour une durée de trois ans. Il est constitué d'experts scientifiques et médicaux, de représentants d'associations de patients, de personnalités qualifiées, de membres de diverses institutions (par exemple, du CCNE et de la Commission nationale consultative des droits de l'homme). Il veille à la cohérence de la politique médicale et scientifique de l'Agence, à l'aune des principes éthiques applicables à ses activités. Il rend des avis publiés sur le site Internet de l'Agence et sur lesquels s'appuie la direction générale.

Le comité médical et scientifique (CMS) est une instance d'expertise, de conseil et de proposition placée auprès du directeur général de l'Agence. Il est composé de représentants de sociétés savantes et groupements de professionnels, de représentants d'institutions avec lesquelles l'Agence entretient des liens particulièrement étroits. Ses membres sont nommés par le directeur général de l'Agence de la biomédecine. Le CMS assure la coordination médicale et scientifique des travaux d'experts.

Les professionnels de santé et l'Agence

Les professionnels de santé occupent une très large place au sein de l'Agence de la biomédecine. En ce sens, elle est une agence sanitaire tout à fait particulière. De nombreux groupes de travail sont mis en place en fonction des exigences de la réglementation mais aussi des besoins des professionnels et des difficultés rencontrées sur le terrain. Un groupe de travail pérenne « Stratégie en AMP » initie, coordonne puis valide les travaux de sous-groupes spécifiquement dédiés. La composition des groupes obéit à des règles transparentes, s'appuyant sur les propositions des sociétés savantes et le caractère consensuel et participatif des candidats. Les membres sont chargés d'assurer un relai entre l'Agence et les sociétés savantes qu'ils représentent et auprès desquelles ils rendent compte de l'état d'avancement de la réflexion.

Les partenaires institutionnels

L'Agence de la biomédecine est en relation étroite avec d'autres agences sanitaires, notamment l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), l'Institut national du cancer (INCa), l'Agence française de sécurité dans l'environnement et le travail (Afsset) et l'Institut de veille sanitaire (InVS), avec des domaines de compétence qui se superposent parfois. Par exemple, l'Afsset a proposé des recommandations de sécurité pour l'utilisation de l'azote liquide dans les sal-

les de cryogénie des laboratoires d'AMP. Le rapport publié, étayé par des connaissances scientifiques rigoureuses, a été en fait élaboré à la demande de l'Agence de la biomédecine, alors en difficultés pour fixer des règles de sécurité relatives à l'azote liquide dans sa proposition de bonnes pratiques en AMP. Autre exemple, un groupe conjoint INCa-Agence de la biomédecine est en place afin de dresser un état des lieux de l'activité de préservation de la fertilité pour les patients exposés à un traitement stérilisant et faire des propositions d'amélioration dans ce domaine encore insuffisamment développé.

L'Agence échange régulièrement avec les agences régionales de santé (ARS) qui remplacent depuis avril 2010 les services déconcentrés du ministère, ARH, DRASS et DDASS apportant son expertise dans le domaine de l'AMP et proposant des formations et des outils spécifiques.

Enfin, l'Agence collabore avec les services de la Caisse nationale de l'assurance maladie (CNAMTS) sur les aspects de financement des activités, de défraiement des donneurs et de remboursement des soins réalisés à l'étranger.

Les actions de l'Agence – L'évaluation des activités d'AMP

Suivre, évaluer, contrôler et veiller à la transparence des activités sont des missions essentielles que le législateur a confiées à l'Agence de la biomédecine. Elle est ainsi destinataire des rapports annuels d'activité des structures autorisées pour les activités clinico-biologiques d'AMP. Elle s'est dotée d'outils d'évaluation permettant, après s'être assurée de la qualité et de l'exhaustivité des informations collectées, d'analyser ces rapports et d'en établir la synthèse. Elle publie chaque année les données nationales dans un rapport détaillé disponible sur son site Internet⁹. Elle édite également des fiches régionales décrivant la répartition des activités sur le territoire, utiles aux ARS dans leurs actions.

Afin de mener des études épidémiologiques impossibles à réaliser avec les données agrégées des rapports annuels d'activité, l'Agence s'est appropriée l'expérience du registre FIVNAT et, avec l'accord de la CNIL, a initié en 2007 un registre national des FIV dont les données, après consentement express des couples concernés, peuvent être nominatives. Des moyens informatiques considérables ont été déployés, notamment pour assurer la protection des données échangées. Le registre devrait constituer une source précieuse d'informations pour évaluer les facteurs de succès et d'échec des FIV, décrire avec précision l'offre de soins et proposer des analyses comparatives de résultats.

En outre, la loi a souhaité répondre aux préoccupations légitimes concernant la santé des personnes qui ont eu recours à l'AMP, des enfants qui en sont issus et des femmes donneuses d'ovocytes. Elle a confié à l'Agence de la biomédecine le soin de mettre en place un processus de suivi. Cette mission, difficile à mettre en œuvre sans risquer de stigmatiser les enfants et leur famille, fait encore l'objet d'une réflexion approfondie. Une des pistes suivies consiste à mettre en regard les données nominatives du registre national des FIV et celles, cryptées, de l'assurance maladie et du PMSI¹⁰. Les modalités techniques de ce croisement de données sont actuellement à l'étude.

Au niveau européen, l'Agence participe au groupe de l'ESHRE¹¹ dédié à l'évaluation des activités d'AMP : l'European IVF monitoring (EIM), qui collige et publie les données disponibles en Europe chaque année¹².

Les autorisations en AMP

Les activités d'AMP telles que définies dans le décret du 19 juin 2008 sont soumises à autorisation. Celles qui concernent les établissements ou les laboratoires pour une ou plusieurs activités cliniques ou biologiques sont sous la responsabilité de l'ARS qui tient compte dans ses décisions des spécificités de la région en termes de démographie et d'accessibilité notamment. Les activités d'AMP sont ainsi intégrées dans l'organisation territoriale définie à l'avance dans les schémas régionaux d'organisation des soins (SROS) au même titre que les autres activités de soin. Les ARS comme précédemment les services déconcentrés de l'État ont aussi la charge de contrôler périodiquement les structures notamment sur le respect des exigences réglementaires en termes de sécurité et de qualité des soins. L'ARS s'appuie d'ailleurs sur les rapports d'inspection pour délivrer les autorisations ou leur renouvellement.

Si l'Agence de la biomédecine n'a pas la responsabilité d'autoriser directement les activités d'AMP, son avis est en revanche requis au cours de l'instruction des dossiers pour garantir une certaine cohérence globale dans la répartition nationale.

L'autorisation est renouvelée tous les cinq ans, de manière implicite, à partir des données d'activité et d'évaluation, sauf demande expresse des ARS. Dans cette procédure, les ARS peuvent solliciter l'expertise de l'Agence. Le dispositif d'encadrement relatif au praticien, appelé agrément, a été mis en place dès le décret de 2005. L'agrément est obligatoire pour pratiquer une ou plusieurs activités cliniques ou biologi-

9. www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2008.

10. PMSI : programme de médicalisation des systèmes d'information.

11. ESHRE : *European society in human reproduction and embryology*.

12. *Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. Human Reproduction*, Vol.24, No.6 pp. 1267-1287, 2009.

ques d'AMP. Il est placé sous la responsabilité directe de l'Agence de la biomédecine qui instruit les dossiers déposés selon des critères de formation initiale, de formation spécialisée et d'expérience établis par le CO de l'Agence et est une reconnaissance de compétence. L'agrément ne se substitue pas à l'autorisation d'exercice qui reste à la charge des conseils de l'ordre des médecins ou des pharmaciens. Il est renouvelable tous les cinq ans sur demande individuelle des praticiens. En cas de refus, un recours gracieux ou devant le tribunal administratif par le professionnel est toujours possible. L'Agence a publié près de 1 000 décisions d'agrément pour une ou plusieurs activités d'AMP depuis la parution du décret.

Le déplacement transfrontalier des gamètes ou des embryons est également soumis à l'autorisation de l'Agence de la biomédecine. Cette procédure garantit que la loi et les règles de qualité, de sécurité et d'équité applicables en France au recueil, au traitement et à l'utilisation des gamètes ou des embryons sont respectées.

La promotion de la qualité

L'Agence de la biomédecine a eu pour premier objectif de procéder à la révision des règles de bonnes pratiques en assistance médicale à la procréation qui dataient de 1999. L'arrêté du 11 avril 2008 relatif à ces règles a repris directement le texte élaboré avec les professionnels et proposé par l'Agence de la biomédecine. Ainsi, des exigences nouvelles concernant la gestion de la qualité ont été introduites alors que dans le même temps une plus grande latitude était laissée aux équipes médicales dans leurs choix thérapeutiques. Une large place a été faite à l'information des patients et au caractère multidisciplinaire de la prise en charge des couples. Certaines activités qui faisaient auparavant l'objet d'arrêtés spécifiques ont été introduites comme, par exemple, l'AMP en contexte viral.

L'Agence travaille également à des recommandations, notamment en matière d'accueil d'embryons ou, en collaboration avec l'INCa, de prise en charge de patients soumis à des traitements potentiellement stérilisants.

Par ailleurs, l'Agence développe des outils destinés à augmenter le niveau de qualité des soins en AMP et propose des formations pour aider les professionnels à développer le management de la qualité dans leurs structures ou à faire certifier leur service.

L'AMP vigilance ou la sécurité sanitaire

L'Agence de la biomédecine a mis en œuvre depuis 2007 un dispositif national d'AMP vigilance dans

lequel les événements indésirables survenant dans le cadre d'une AMP sont déclarés sans délai à l'Agence. Installé après une phase test menée avec des centres d'AMP volontaires, le dispositif a été complété par la publication du décret du 19 juin 2008. Le recueil centralisé des déclarations a d'ores et déjà permis de colliger des incidents graves de même nature et de mener à bien des actions préventives chaque fois qu'elles ont été possibles. La mise en place du système est suivie par un groupe d'experts. Articulé avec les autres vigilances sanitaires comme la matériovigilance, la pharmacovigilance ou la biovigilance, le dispositif d'AMP vigilance, qui a l'avantage d'être ciblé et spécifique à l'AMP, doit échanger activement avec les autres institutions compétentes, notamment l'Afssaps. Dans cet objectif, l'Agence de la biomédecine participe à la coordination des vigilances sanitaires mise en place par l'Afssaps.

À titre d'exemple d'événements indésirables similaires et regroupés dans le temps déclarés à l'Agence de la biomédecine dans le cadre de l'AMP vigilance : les professionnels déploraient la destruction accidentelle d'embryons lors de la congélation à l'origine d'une perte de chance pour les couples concernés. S'agissant d'une défaillance du matériel de congélation, ces événements indésirables relevaient de la matériovigilance et donc du domaine de compétence de l'Afssaps. C'est pourquoi, sollicitée par l'Agence de la biomédecine, l'Afssaps a mené une enquête rapide auprès de l'industriel impliqué. Un défaut technique d'un des composants du matériel a été mis en évidence. Sa correction, généralisée à tous les appareils de la même gamme, ainsi que le remplacement des appareils de congélation de tous les centres concernés ont évité la survenue de nouveaux incidents de ce type.

Le bilan fait apparaître que près de la moitié des déclarations reçues à l'Agence de la biomédecine concerne un syndrome d'hyperstimulation ovarienne sévère avec hospitalisation. Attribués aux médicaments utilisés, ces effets relèvent de la pharmacovigilance et de la compétence de l'Afssaps. Dans le cadre d'une analyse globale de prise en charge en AMP et d'analyse des pratiques, le groupe d'experts et l'Agence envisagent de mener une étude sur les facteurs de risque d'hyperstimulation ovarienne sévère en lien avec les acteurs concernés.

L'Agence et la communication

L'Agence de la biomédecine a la mission d'informer et de promouvoir le don de gamètes.

En 2008, avec les professionnels de santé, elle a mené en parallèle un travail de réflexion sur les aspects médicaux de l'AMP et sur les actions nécessaires pour améliorer l'information des couples en

démarche d'AMP. Elle a mis à la disposition des professionnels et des personnes qui ont recours à l'AMP en février 2008 le premier guide d'une série thématique consacrée à l'AMP : « le guide de l'AMP » et son site Internet dédié « www.procreationmedicale.fr ». Deux autres documents d'information et leurs sites Internet, « www.dondespermatozoides.fr » et « www.dondovocytes.fr », destinés aux donneurs de spermatozoïdes et donneuses d'ovocytes, ont suivi en mai et novembre 2008. Un document spécifique sur le don d'ovocytes a été également diffusé pour renforcer les connaissances des gynécologues libéraux qui ne contribueraient pas directement à l'activité d'un centre d'AMP. Des documents destinés à informer des modalités de la congélation embryonnaire et de l'accueil d'embryons sont en préparation. Ces outils d'information sont destinés à accompagner les couples dans leur démarche d'AMP ou de don.

Pour la promotion du don de gamètes, l'Agence va prolonger la campagne nationale d'information sur l'AMP, le don d'ovocytes et le don de spermatozoïdes initiée au cours de l'année 2008, en renforçant les actions Internet qui s'avèrent être un très bon outil d'accès confidentiel à une information complète pour les candidats au don.

Le financement des activités d'AMP

Bien que l'Agence de la biomédecine n'ait pas la responsabilité d'intervenir directement sur les mécanismes de financement des activités d'AMP, elle mène une réflexion avec les professionnels pour analyser les difficultés rencontrées sur le terrain. Les activités d'AMP ont la particularité d'être insuffisamment prises en compte par les mécanismes actuels de financement des activités de soins. Citons par exemple, les moyens de la participation au registre national des FIV ou le temps supplémentaire des personnels engagés dans la prise en charge multidisciplinaire telle qu'elle est exigée par la réglementation, qui ne sont pas pris en compte actuellement. Signalons également le don d'ovocytes, activité en difficulté en France, qui pourrait sans doute se développer si du personnel dédié à cette activité était financé dans la vingtaine de centres autorisés. Ces activités, très chronophages, requièrent des moyens spécifiques supplémentaires que l'Agence étaye dans un rapport diffusé à la tutelle et aux organismes en charge du financement des soins.

L'AMP, la recherche sur l'embryon et l'Agence de la biomédecine

En lien avec le secteur AMP et les experts en recherche sur l'embryon, l'Agence, qui délivre les

autorisations de recherche sur l'embryon *in vitro*, réfléchit à l'information nécessaire des couples qui, n'ayant plus de projet parental pour leurs embryons congelés, seraient susceptibles de consentir à les céder pour la recherche. Des documents d'information sont à l'étude ainsi qu'un modèle de consentement.

La mission d'inspection de l'Agence en AMP

Les missions d'inspection des centres d'AMP sont confiées aux ARS. Toutefois, l'Agence de la biomédecine, qui est dotée d'une Mission d'inspection dans ce domaine de compétence, appuie les services régionaux. Elle a élaboré et diffusé en juin 2009 un guide d'inspection. Destinataire des rapports d'inspection, elle peut apporter son expertise chaque fois que nécessaire et doit effectuer une synthèse publiée dans son rapport annuel. L'Agence contribue à la formation des médecins et pharmaciens chargés des inspections (DDASS, DRASS et sécurité sociale qui sont devenus ARS en 2010). Chaque structure autorisée pour les activités d'AMP doit être inspectée tous les deux ans sur pièce ou sur place et notamment pour vérifier la conformité des nouveaux services et le bon fonctionnement de ceux qui demandent un renouvellement d'autorisation.

Les actions internationales de l'Agence

En tant qu'autorité compétente, l'Agence de la biomédecine représente la France dans les instances européennes pour les activités d'AMP, notamment devant la commission européenne chargée de l'application de la directive européenne de 2004. Elle participe aux groupes spécifiques, organisés par la commission, qui travaillent sur des points particuliers de la directive tels que les exigences européennes en matière de codage unique des produits du corps humain et la rédaction d'un guide commun pour l'inspection des activités d'AMP. Les enjeux de la présence de l'Agence, aux côtés de l'HFEA, toutes deux reconnues comme autorités compétentes pour les activités d'AMP, sont d'autant plus importants que les directives n'ont pas été conçues initialement pour les activités d'AMP et que certaines dispositions sont inadaptées. L'Agence ne manque pas de s'exprimer devant la commission sur cette difficulté.

Les projets européens

L'Agence de la biomédecine participe activement aux projets européens financés par la Commission

européenne qui traitent des thèmes de travail liés à l'Agence. Ainsi, elle a participé activement au projet européen EUSTITE (European union standards and training in the inspection of tissue establishments), qui comporte un volet sur les inspections dans les centres d'AMP et l'AMP vigilance. Ce projet est prolongé dans SOHOV&S¹³ et l'Agence est responsable du module relatif à l'AMP vigilance.

L'Agence représente aussi la France dans des groupes de travail de l'ESHRE. Le groupe « European IVF Monitoring » (EIM) s'efforce de mettre en place des référentiels communs dans tous les états européens en vue de comparer les résultats des FIV. Il est encore trop tôt aujourd'hui pour faire ces comparaisons de façon rigoureuse, compte tenu des différences importantes tant dans les indications et les pratiques que dans la qualité et l'exhaustivité des données.

Par ailleurs, il est possible d'imaginer que l'Agence puisse aider des pays moins avancés dans la régulation et le contrôle des activités d'AMP, à la demande, comme elle le fait déjà dans le domaine de la greffe d'organes.

La révision de la loi de 2004

La ministre de la santé a demandé à l'Agence de la biomédecine d'établir un bilan pratique, s'appuyant sur son expertise, de la mise en œuvre effective de la loi au regard de l'évolution des sciences et des pratiques médicales ainsi qu'une étude de droit comparé des différentes législations nationales pour apporter à la réflexion sur la révision de la loi de 2004 un éclairage international. Dans le rapport fourni en octobre 2008¹⁴, l'Agence a joint la contribution de son conseil d'orientation¹⁵ aux débats préparatoires à la révision de la loi.

Elle a, par ailleurs, été chargée de recueillir les contributions des sociétés savantes et des associations d'usagers de santé qu'il était indispensable d'associer. Concernant les conditions générales d'accès à l'AMP, dans son bilan d'application, l'Agence suggère de réfléchir à deux dispositions : l'âge de procréer et la difficulté à le définir chez l'homme et chez la femme et l'obligation de vie commune de deux ans qui a pour conséquences de retarder le début de la prise en charge et, dans certains cas, de diminuer les chances de succès.

13. SOHOV&S (*Substances of human origin – vigilance and surveillance. A project proposal under the EU second programme of Community action in the field of health* (2008-2013)).

14. Rapport de la ministre de la santé de la jeunesse, des sports et de la vie associative « Bilan d'application de la loi de bioéthique du 6 août 2004 » Agence de la biomédecine, octobre 2008.

15. Contribution du conseil d'orientation de l'Agence de la biomédecine aux débats préparatoires à la révision de la loi de bioéthique - Leçons d'expérience (2005-2008) et questionnements - 20 juin 2008.

Par ailleurs, les difficultés avérées du don d'ovocytes en France font s'interroger sur les dispositions de la loi concernant le don de gamètes. Le maintien des principes en vigueur sur l'anonymat et la gratuité du don de gamètes est placé au cœur du débat aujourd'hui. Toutefois, l'Agence, qui souligne la complexité de la question et la difficulté à évaluer la portée de la levée de l'anonymat à long terme, suggère de réfléchir dans un premier temps à l'exigence de procréation antérieure de la donneuse, ce qui contribue à élever l'âge moyen des donneuses, écarte du don de nombreuses jeunes femmes et rend au final le don moins efficace. L'Agence préconise également une meilleure application des textes quant à la prise en charge financière des frais liés au don et une amélioration des moyens des centres d'AMP pour qu'ils soient en capacité d'accueillir les donneuses et gérer cette activité particulière. La question de la participation du secteur privé à cette activité sous de strictes conditions réglementaires est aussi posée. Enfin, partant du constat que l'accueil d'embryons est peu développé en France, l'Agence s'interroge sur l'intérêt de maintenir un régime juridique spécial.

Conclusion

L'essor récent des activités d'AMP bouleverse les repères de la société. Elles ont comme corollaire un besoin d'évaluation des pratiques médicales et d'harmonisation des conditions de réalisation des AMP sur tout le territoire. L'Agence de la biomédecine a été créée en mai 2005 pour contribuer à l'amélioration de la qualité des pratiques et de la prise en charge des patients et à la sécurité des soins délivrés. Assurant les missions que le législateur lui a confiées, de l'encadrement à l'évaluation, la sécurité sanitaire, l'information et la communication, l'Agence a pu faire aujourd'hui le bilan de ses quatre premières années de fonctionnement dans le domaine de l'AMP. Elle a acquis une légitimité tant pour les professionnels de santé que les pouvoirs publics ou la société. Ainsi, elle a rendu publics des données exhaustives et de bonne qualité sur l'AMP et ses résultats et a introduit plus de transparence sur ces activités. Elle a développé l'information du public, des parlementaires et du gouvernement. Elle a délivré des agréments de praticiens et suit la pratique des centres d'AMP. Elle a aidé à promouvoir la qualité en proposant différents outils de formation à la gestion de la qualité et en proposant des règles de bonnes pratiques. Elle a mis en place un dispositif de vigilance spécifique à l'AMP qui a déjà porté ses fruits.

Sa proximité avec les équipes médicales et les patients lui permet de veiller au respect de la sécurité et de la qualité, de l'anticipation, de l'éthique

et de la transparence, tout en tenant compte de l'expérience et des difficultés concrètes d'exercice. Par son expertise, l'Agence de la biomédecine s'est imposée comme autorité de référence sur tous les aspects médicaux et scientifiques relatifs à l'assistance médicale à la procréation.

Dans tous les domaines, les progrès scientifiques et médicaux font émerger de nouveaux risques et de nouvelles dérives possibles. Le domaine de la reproduction n'échappe pas à ce phénomène ; l'eugénisme, les discriminations génétiques, les offres de services de « mères porteuses » sont autant de sujets abordés au cours des débats sur la révision de la loi de bioéthique. La loi est là pour protéger l'individu contre toutes les dérives mais elle ne doit pas entraver les progrès scientifiques et la recherche. Sa révision périodique est en discussion. Elle a cette

fois-ci été précédée par de très larges débats portés au niveau du citoyen auxquels ont participé nombre d'experts, d'associations de patients et de grandes institutions de l'état notamment. La ministre a souhaité qu'un des objectifs poursuivis par les états généraux de la bioéthique soit de mieux informer et de sensibiliser le citoyen sur les enjeux actuels de la bioéthique. Le rôle confié à l'Agence par la ministre dans le processus de révision de la loi a été important. Chargée de dresser le bilan de la mise en œuvre de la loi de 2004, l'Agence a facilité les débats sur les questions essentielles posées par la loi. L'Agence a une ouverture sur l'Europe indiscutable. Deuxième agence européenne à réguler les activités d'AMP, elle participe aux efforts des instances européennes pour harmoniser les pratiques et les législations, au moins sur les principes éthiques fondamentaux.

A. Devaux

Aspects médico-légaux comparés de l'assistance médicale à la procréation en Europe

Introduction

Le domaine de la médecine de la reproduction a connu un développement remarquable ces 30 dernières années. Grâce à une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques de la reproduction, le biologiste a appris à maîtriser les étapes de fécondation *in vitro* et de la congélation embryonnaire. L'assistance médicale à la procréation (AMP) est définie en France comme l'ensemble des techniques permettant d'obtenir une fécondation en dehors du processus naturel ou par insémination. Avec la maîtrise de la contraception, on a appris également à dissocier la sexualité de la fertilité.

Ces développements scientifiques, progrès pour certains, reculs pour d'autres, représentent un tournant irréversible dans le domaine de la procréation. La prise de conscience des conséquences et des dérives possibles explique que les professionnels des pays pionniers dans ce domaine aient souhaité un encadrement des pratiques. Cela a été le cas en Espagne en France et au Royaume-Uni. Le développement des recherches sur les embryons, les cellules souches embryonnaires et sur le clonage, la mondialisation de ces techniques, ont fait l'objet de débats très médiatisés. Deux tabous étaient remis en cause : la création « d'être humain », la « pérennité de l'espèce humaine et la possible modification de son génome ». Enfin, la notion de filiation a quelque peu évolué.

Ces techniques réalisées au départ dans les pays riches se développent maintenant dans de très nombreux pays. La crainte des dérives possibles et les interrogations posées par les sociétés font que ces techniques ont quitté le domaine purement scientifique pour être prise en compte comme fait sociétal. Depuis 2004, de nombreux pays ont fait le choix ou envisagent d'encadrer ces pratiques afin d'éviter des dérives. Avant de débiter une analyse comparée des aspects médico-légaux de chaque pays en matière d'AMP, quelques éléments d'histoire de la médecine nous permettent de comprendre comment on est passé d'une démarche

scientifique à une démarche législative. Les droits fondamentaux sont différents dans les pays anglo-saxons et dans les pays latins. Cela nécessite donc de connaître les principes fondant le Droit dans chaque état et la position de l'Europe vis-à-vis de ces pratiques. Comprendre le statut de l'embryon et la « définition » juridique que chaque État lui confère aidera à la compréhension des orientations prises par ceux-ci. Enfin, il faut garder à l'esprit que les sociétés sont imprégnées à des degrés variables par la morale judéo-chrétienne ou islamique et par la déclaration des droits de l'homme. Connaître les positions de chaque religion et leur influence en tant que valeur nous permet de comprendre les choix législatifs dans chaque État.

Le développement de l'AMP a donc évolué de façon différente d'un pays à l'autre. Le principe de subsidiarité s'est imposé et chaque pays est libre de légiférer, ou non, d'autoriser ou d'interdire telle ou telle pratique. Pour éviter les dérives et le danger d'un tourisme médical faisant craindre une nouvelle forme d'esclavage moderne, il est important de comprendre les choix des états afin de s'engager vers une transparence et une harmonisation des réglementations.

D'Aristote à Edwards, un chapitre de l'histoire de la médecine ou comment la reproduction est devenue un objet de consultation juridique

De tout temps, le mystère de l'enfantement a intrigué les philosophes et les scientifiques

« La puissance mâle fertilisait la femme ». Aristote pensait que la semence de l'homme était constituée de petits hommes déjà formés, l'utérus de la femme ne servait que d'habitable nourricier. Cette théorie de l'Homunculus va perdurer pendant des siècles et même parfois jusqu'à aujourd'hui dans l'imaginaire de certains couples candidats à l'AMP lorsqu'on les interroge.

1680, l'invention du microscope

Grâce au microscope, Leeuwenbeck a mis en évidence « l'animalcule grouillant » dans la semence et de Graaf a observé la présence de follicules à la surface de l'ovaire. Cette notion de gamètes « têtard » a soulevé la polémique nombre de scientifiques refusant cette théorie.

La théorie de la reproduction sexuée et les premières AMP

Spallanzani en 1776 en réalisant la première fécondation *in vitro* d'œufs de grenouille a évoqué la notion de reproduction sexuée. Des tentatives d'inséminations artificielles chez le chien ont vérifié cette théorie et ont représenté la première expérience d'AMP chez les mammifères. À la moitié du XVIII^e siècle, du fait des progrès de la microscopie, Caspar Wolf a montré que l'œuf ne contient aucun tissu ni organe. L'Homonculus serait donc bien contenu dans la tête de l'animalcule de la semence. De la théorie animalière au passage à l'expérimentation humaine, il n'y avait qu'un pas et Hunter en 1791 a réalisé la première insémination intraconjugale chez un couple infertile.

Les premières polémiques éthique et sciences

L'insémination chez l'humain a immédiatement soulevé les polémiques. Dès 1887, le Saint Office de Rome a interdit cette pratique. L'Académie des Sciences morales et politiques a condamné l'insémination artificielle au prétexte qu'elle était antinaturelle et que le recueil de sperme par masturbation est implicitement condamnable. On observe le poids de l'éducation judéo-chrétienne. Cependant, les scientifiques ont continué leurs travaux en vertu que la médecine est une science donc « amoral ». En 1866, Monteggia met en évidence l'impact du froid sur la mobilité spermatique et ses effets réversibles. C'est le début des travaux sur la congélation des gamètes qui trouvera un accueil favorable dans le monde vétérinaire. En 1950, grâce aux travaux de Jean Rostand, sur l'intérêt des cryoprotecteurs pour la conservation des spermatozoïdes de bovins et d'ovins, le monde vétérinaire dispose de la première banque de sperme.

Acquisition de statut de traitement médical pour l'AMP

Pendant toutes ces années, les mentalités ont évolué en France et en 1957 la Société des gynécologues de langue française reconnaît que l'insémination artificielle (IAC) est une technique acceptable dans les infertilités de couples. Cette

reconnaissance donne le statut de « traitement » à cette première technique d'AMP. Aux États-Unis où l'individu est propriétaire de son corps, Sherman ouvre la première banque de sperme d'Homme et c'est le début des inséminations de sperme de donneur. Cette pratique n'arrive en France qu'en 1973 où le Pr Netter et le Pr David ouvrent les deux premières banques de sperme sur le mode associatif avec une charte éthique. Cette charte, basée sur le volontariat, l'anonymat et la gratuité, est toujours en vigueur dans les CECOS. Le don de sperme est reconnu comme service d'intérêt public depuis 1992 et la loi de bioéthique de 1994 le reconnaît comme technique d'AMP.

Depuis 1982, en Angleterre, Edwards et Steptoe ont maîtrisé les étapes de fécondation *in vitro* qui ont permis la naissance de Louise Brown puis d'Amandine dans le service du Pr Frydman à l'Hôpital Antoine Béchère. En 1983, il a été possible d'obtenir une grossesse après transfert d'embryons surnuméraires ayant été cryopréservés. Enfin, en 1995 l'ICSI va révolutionner la prise en charge des stérilités masculines. En 30 ans, la médecine de la reproduction a fait plus de progrès que pendant plusieurs siècles.

La demande de Droit

Le développement scientifique a fait débats et entraîné des prises de positions très virulentes avec une médiatisation très importante. Jusque-là, la médecine était considérée comme une science et donc « amoral ». Le devoir du médecin était de tout mettre en œuvre pour soigner au mieux ses patients, seul l'homicide est interdit. Les chercheurs et les biologistes n'avaient d'autres obligations que la rigueur de leur raisonnement et de méthodes. Malgré une attitude très conservatrice de l'Église, la France a tout de même autorisé l'IVG et la contraception en vertu de la séparation de l'Église et de l'État. L'éthique repose sur des valeurs choisies sociétales qui, elles-mêmes, sont influencées par les courants religieux philosophiques ou de pensées. La société s'est sentie concernée. Cinquante ans après la dernière guerre et ses dérives eugéniques, l'homme et l'embryon pourraient encore être objet d'expérimentation. L'homoparentalité ou encore la gestation pour autrui se sont invitées dans le débat. La famille et l'espèce humaine auraient été en danger. Les prises de positions des différents courants de pensées ont entraîné des prises de positions éthiques, philosophiques ou religieuses. Les professionnels eux-mêmes ont souhaité disposer d'un encadrement des pratiques. Ce fut la rencontre de la Médecine et de la nécessité du Droit. L'Angleterre, la France ou l'Espagne ont légiféré très rapidement dans les

années 1980-90. Depuis 2004, le nombre de pays ayant réglementé l'AMP a fortement progressé. Mais la réglementation varie selon le statut attribué à l'embryon dans chaque pays : est-il une chose ou un être vivant ? Cette problématique du statut de l'embryon est responsable de l'absence de consensus au niveau européen et favorise ainsi le tourisme procréatif. La médecine a fait une place au Droit.

Quel statut pour l'embryon ? Comparaison des législations

L'absence de statut pour l'embryon explique la difficulté pour les européens à trouver un consensus en matière d'AMP. Biologistes, penseurs, religieux ou philosophes chacun débat. Pour certains l'embryon n'est qu'un amas de cellule, d'autres lui reconnaissent dès sa conception la qualité d'une personne humaine sans restriction. De plus, le clivage entre les différents groupes d'interprétation ne se superpose pas avec les clivages existants dans la société telle que nous la connaissons. Les philosophes ou les médecins peuvent être athées religieux ou matérialistes, etc. Connaître la place des différents courants de pensées dans la société et de leur impact sur les choix politiques permet de comprendre comment la législation de l'AMP a été mise en place dans chaque État. Les réglementations de l'AMP sont récentes et en perpétuelle élaboration. Elles restent dans la majorité des cas influencées par la morale judéo-chrétienne et la déclaration des Droits de l'Homme.

La position des religions monothéistes

Le catholicisme, sans donner le statut de personne humaine, réclame pour l'embryon un respect analogue à celle-ci et ceci dès sa conception. De ce fait, il condamne toutes les pratiques d'AMP.

Le protestantisme a une position plus libérale et l'AMP est une parenthèse technique qui s'inscrit dans un projet parental. De ce fait, l'AMP est admise pour les couples infertiles y compris pour l'AMP avec tiers donneur.

L'islam et le judaïsme supposent une animation différée de l'embryon. Le temps de latence est de 40 jours dans le Talmud et de 40 à 120 jours pour les musulmans. De plus, pour le judaïsme, l'embryon n'a pas d'existence propre s'il n'est pas replacé dans l'utérus. De ce fait, ces deux religions autorisent l'AMP, reste cependant le problème du recueil de sperme par d'autre moyen que celle de la masturbation qui reste un tabou et une interdiction du point

de vue religieux. Le recueil par coït interrompu est discuté. Le recueil à l'aide d'un préservatif non spermicide lors d'un rapport sexuel peut être une solution. En revanche, le recueil chirurgical de spermatozoïdes épididymaires ou testiculaires est autorisé. Le recours au don de gamète ou d'embryon est discuté en raison de l'importance de la connaissance de la filiation. Dans l'islam, la religion est celle du père alors que le judaïsme se transmet par la mère. Mais la nécessité de connaître la filiation biologique reste prépondérante et explique les obstacles aux dons dans ces deux religions. On voit ainsi que l'embryon peut se voir attribuer des statuts très divers.

La position des scientifiques

Les biologistes eux-mêmes ont des positions qui divergent. Le vocabulaire utilisé varie : pour les embryologistes le terme d'embryon ne doit être attribué qu'après la fin de la phase de segmentation. Les biologistes de la reproduction parlent d'embryon dès la 1^{re} division par commodité et de zygote dès l'apparition des deux pronucléi. Pour les uns, il ne s'agit que d'un tas de cellules et on parle de pré-embryon jusqu'au stade de fin de segmentation au 14^e jour. Pour les autres, l'embryon est défini dès la fécondation puisqu'il est l'aboutissement d'un phénomène de procréation « nouvelle identité génétique » qui est unique et qui n'est pas la reproduction d'un des géniteurs. L'embryon est la plus petite forme d'un être.

En fait, dans ce débat, se mélangent les données scientifiques, leur interprétation et le statut juridique qu'on essaye de superposer. Mais au bout du compte, la charge revient aux juristes d'élaborer un statut juridique prenant en compte les fondements du Droit qui eux-mêmes sont influencés par les différents courants de pensée.

La difficulté est de faire converger toutes les législations des États

L'Europe n'a pas attendu pour se pencher sur ces questions. Le CABHI (Comité ad hoc d'experts sur les progrès des sciences biomédicales) le Conseil de l'Europe à deux reprises et le CCNE (Comité consultatif national d'Éthique) ont successivement fait des propositions de 1985 à 1990. Ce sont ces rapports qui ont servi à l'élaboration de la loi de Bioéthique de 1994. Malheureusement, le conseil de l'Europe n'a pu obtenir de consensus. Il a cependant formulé des recommandations en encourageant les pays à se munir de textes afin d'éviter des abus et des dérives en AMP, et toutes activités scientifiques portant sur l'embryon le fœtus et le matériel génétique humain. Il a également recommandé qu'une

institution internationale soit créée afin de faire converger les différentes positions des états. Cette action a été confrontée aux divergences des états vis-à-vis d'un éventuel statut de l'embryon. Pour l'Union européenne, le principe de subsidiarité est donc appliqué pour le domaine de la biomédecine qui relève de la compétence des états membres.

Le Royaume-Uni a une législation (1990) plutôt libérale qui pèse peu sur les individus. Chacun a le libre choix du destin de son corps puisqu'il lui appartient. Ainsi, le délai limite d'IVG est de 24 semaines, donc le plus long d'Europe, et l'embryon est considéré comme un matériau jusqu'au 14^e jour de développement, ce qui autorise la recherche.

La Belgique et les pays du Nord de l'Europe ont également une position relativement libérale qui permet de nombreuses pratiques. La Belgique n'a légiféré que beaucoup plus tard en 2007. Elle dispose d'une législation qui n'a pas conféré de statut à l'embryon mais qui autorise le projet parental pour les homosexuels, le transfert d'embryons post-mortem ainsi que la recherche sur l'embryon.

En France, le législateur dans la loi de bioéthique en 1994 n'a pas statué sur le statut à conférer à l'embryon. Si le « respect de l'être humain dès le commencement de sa vie » est affirmé, il persiste une ambiguïté concernant le statut de l'embryon. Il semble qu'on lui ait attribué un statut en « ombre chinoise ». Non assimilable à un être humain, il bénéficie d'une protection particulière en tant que « personne humaine potentielle ». Le Droit français n'a donc pas pu statuer de façon claire. Faute de donner un statut juridique, il a conféré à l'embryon un statut médical autorisant ou interdisant certaines pratiques. L'IVG est autorisée et n'est pas considérée comme un homicide. En revanche, seules les recherches ou études ne portant pas atteinte à l'intégrité de l'embryon peuvent être envisagées. Le Portugal s'est doté d'une législation en juillet 2006 qui est très proche de la loi française.

L'Allemagne autorise l'AMP mais interdit en raison de son histoire récente la congélation embryonnaire. L'embryon est considéré comme apte à se développer 24 heures après la fusion des deux pronucléi. Mais, cependant, elle n'a pas défini un statut pour l'embryon. La loi reconnaît même une protection absolue à l'embryon qui est équivalente à celle de la personne humaine mais en évitant de lui en donner le statut juridique.

La Pologne, qui interdit l'IVG, sauf danger pour la mère, envisage d'inscrire dans sa constitution le droit à la vie du fœtus « dès sa conception ».

L'Espagne, alors qu'elle a une position assez restrictive sur l'IVG, a adopté une position très libérale en termes d'AMP et de recherche sur l'embryon. Dès 1988, elle a défini un statut biologique de l'embryon : c'est un pré-embryon jusqu'au 14^e jour puis un embryon jusqu'au 2^e mois et demi où il devient un fœtus.

La Suisse a une réglementation cantonale ; quant au Danemark (1990), la vie commence dès la fécondation et considère que le développement humain est continu.

L'exemple des États-Unis est encore différent, ce sont les tribunaux qui répondent le plus souvent à ces questions par le biais de la responsabilité du praticien. Comme pour le Royaume-Uni, la position dans ce domaine est plutôt libérale. Au total, l'embryon n'a pas de statut juridique. Des contrats entre les praticiens et les couples sont censés encadrer les pratiques.

Si l'on fait un rapide tour d'horizon, on peut considérer trois types de situations : les pays qui ne dispose d'aucun encadrement des pratiques, ceux qui ont un ensemble de recommandations professionnelles de bonnes pratiques (guidelines) assez libéral et ceux qui ont mis en place un dispositif législatif relativement restrictif ce qui est le cas des pays européens. Il n'y a qu'un seul pays qui ait interdit officiellement l'AMP par voie législative, c'est le Costa Rica. Quoi qu'il en soit, à ce jour, aucun pays n'a attribué le statut juridique « d'être humain » à l'embryon. Cette situation explique les difficultés à trouver un consensus européen et international. Aux vues de ces données, il est maintenant possible de comparer les choix juridique des états pour la mise en œuvre de l'AMP.

Comparaisons des conditions d'accès à l'AMP

L'accès à l'AMP traduit le choix du type de droits fondamentaux conférés à l'individu. L'accès à l'AMP diffère selon l'option faite par les états. Soit l'AMP est réalisée uniquement en tant que traitement d'une infertilité ou pour éviter une pathologie grave, soit elle est considérée comme un droit et peut être réalisée en dehors de toute pathologie à la demande de l'individu qui fait le choix de son mode de procréation. De plus, le choix de prise en charge du coût des techniques traduit le choix des états. On peut définir deux catégories de pays : ceux qui imposent un contexte médical et ceux qui considèrent que c'est un choix de procréation.

Les pays qui réservent l'AMP aux indications médicales

La France limite l'accès à l'AMP sur la nécessité d'une indication médicale, impose que le couple soit hétérosexuel, avec une limite d'âge pour la prise en charge.

La France, l'Italie, l'Allemagne, la Slovaquie, la Norvège, la Suisse, le Portugal et la Serbie-Monténégro réservent l'AMP aux couples stables infertiles. Parmi eux, seule l'Allemagne accepte également

les couples homosexuels ayant signé un contrat de vie commune. En France, bien que le PACS ait été adopté pour les couples homosexuels, celui-ci ne permet pas l'accès à l'AMP ni à l'adoption.

Les pays qui considèrent le recours à la procréation artificielle comme un choix personnel

De nombreux pays autorisent le recours à l'AMP par choix personnel. Ce principe repose sur l'interdiction de toute discrimination en rapport la sexualité ou le statut matrimonial. La Grèce, l'Espagne, les Pays Bas, le Royaume-Uni, la Belgique, le Danemark, la Russie, le Canada, les États-Unis, Israël, la Suède, la Finlande autorisent l'AMP chez les femmes célibataires. Dans le même esprit, ces pays autorisent le recours à l'AMP pour les homosexuels sans pour autant autoriser leur mariage. De plus, aucune limite d'âge n'est précisée de façon explicite pour l'accès à l'AMP. Il existe cependant des recommandations et une limite pour bénéficier d'une prise en charge.

Impact de la prise en charge financière de l'AMP par les États

La prise en charge financière de l'AMP par les systèmes de protections sociales est un facteur limitant de l'accès à l'AMP. En France, l'infertilité est prise en charge à 100 % avec une limite de quatre tentatives de FIV et une limite d'âge fixée à 43 ans. La Belgique a limité le taux de remboursement des premières tentatives en le conditionnant à un transfert mono-embryonnaire, afin de diminuer le taux de grossesse multiple. Dans ce cas, le législateur interfère avec les pratiques médicales.

L'insémination post-mortem

C'est une situation particulière du recours à l'AMP qui pose des problèmes éthiques importants. Dans ce cas, on présuppose l'acceptation du patient décédé. Ce n'est plus une question d'accès à l'AMP pour raison médicale ou personnelle. L'impact en termes d'intérêt pour l'enfant est le centre des discussions.

La France, le Danemark, l'Italie, l'Allemagne, la Norvège, la Suisse, la Bulgarie, la Slovaquie, Hong Kong, la Corée, Singapour, le Japon et Taiwan interdisent l'AMP post-mortem.

En revanche, la Belgique, la Grèce, les Pays Bas, l'Espagne, l'Inde, Israël, et l'Australie l'autorisent. L'Autriche, le Royaume-Uni, et l'Afrique du Sud l'autorisent si un consentement écrit préalable du conjoint a été signé de son vivant.

Une limite temporelle après le décès du conjoint pour la réalisation de l'AMP est prévue par les lois anglaises israélienne et espagnole.

Le risque est de voir des couples dont le conjoint est malade faire la démarche de congeler le sperme dans un des pays autorisant l'insémination post-mortem.

Comparaison des législations en matière d'AMP avec don de gamètes ou d'embryon

Le choix des États

Alors que l'AMP en intraconjugal semble admis dans quasiment tous les pays, le recours à un tiers donneur reste très discuté. Et les choix divergent selon qu'il s'agisse du sperme de l'ovocyte ou de l'embryon.

Parmi ceux qui ont légiféré, rares sont les pays qui interdisent le recours au don de gamètes. C'est pourtant le cas de l'Italie, de la Turquie et de la Tunisie.

D'autres pays n'autorisent que le don de sperme, interdisant le don d'ovocyte, c'est le cas de l'Allemagne, de l'Autriche, de la Suisse, de la Norvège et de la Croatie. Cette attitude est fondée sur la notion du droit de l'enfant à n'avoir qu'une seule et même mère génétique et gestationnelle. Dans ces mêmes pays, il est en général interdit de féconder plus d'ovocytes que le nombre d'embryon qu'il serait possible de transférer. De ce fait, il n'y a pas théoriquement d'embryon surnuméraire et donc pas de possibilité de don d'embryon.

Il y a également des pays qui acceptent le don de gamètes mais interdisent l'accueil d'embryon par un couple tiers. C'est le cas de l'Azerbaïdjan, de l'Islande, du Portugal, de la Slovaquie, de la Suède et du Portugal.

Les principes du don : volontariat, gratuité, anonymat

En France, trois principes régissent le don : le volontariat, l'anonymat et la gratuité. Il n'en est pas de même dans les pays voisins autorisant le don. Dans les pays où le recours au don de gamètes ou d'embryons est autorisé, ces principes ont fait l'objet de discussion.

Le principe du volontariat

Dans tout les cas, le principe de consentir librement à faire un don est appliqué. Cependant, on peut se demander s'il est réellement appliqué certains pays rémunérant des donneuses.

Le principe d'anonymat et l'accès aux origines

La question de l'accès aux origines pour les enfants fait débat. Le droit pour l'enfant de connaître ses origines a amené certains pays à autoriser la levée de l'anonymat. La Suède, depuis 1984, prévoit que les parents doivent informer l'enfant du mode de procréation à l'origine de sa naissance. Cette obligation n'est cependant pas inscrite dans la loi. Une institution est chargée d'accompagner l'enfant dans sa démarche. En réalité peu d'enfants issus de don entreprennent cette démarche. Peut-être parce que le mode de conception a été gardé secret ? En Allemagne, depuis 1989, le médecin qui réalise l'AMP conserve des données qui peuvent permettre à l'enfant d'exercer son droit constitutionnel à connaître ses origines. En 2004, aux Pays-Bas, la possibilité d'avoir accès aux données concernant ses origines a abouti à la chute brutale de 70 % du nombre de donneur. En Norvège, seuls les donneurs acceptant la levée de l'anonymat sont retenus. Ceci a entraîné une importation massive de paillettes danoises pour lesquelles l'anonymat est maintenu. En Autriche et en Suisse, le droit de connaître ses origines est constitutionnel.

Au Royaume-Uni, les enfants nés après le 1^{er} avril 2005 auront le droit d'avoir accès aux données identifiantes des donneurs, ceci a divisé de moitié le nombre de donneur. L'État considérant que c'est un devoir d'informer l'enfant du mode de leur conception un projet de loi, encore à l'étude, prévoit de rendre obligatoire l'inscription du mode de procréation par FIV sur le certificat de naissance de l'enfant.

La Belgique n'a pas tranché, l'anonymat est maintenu mais il est possible de faire des dons d'ovocytes non anonymes et d'avoir recours à une donneuse de son entourage. En Australie, trois états sur sept ont légiféré dans ce domaine et deux d'entre eux ont déjà autorisé la levée de l'anonymat. Dans l'État de Victoria, les données conservées peuvent être nominatives ou non.

Aux États-Unis, la loi varie d'un état à l'autre. Il existe plus de 150 banques de sperme et aucune législation n'impose l'anonymat ou sa levée. Les deux systèmes existent en parallèle. Il semble que le nombre de don avec possibilité de lever l'anonymat soit plus important. Cela pourrait être en rapport avec le montant de l'indemnisation qui est dans ce cas plus élevé. Les autres pays ayant autorisé l'AMP avec don de sperme ont pour l'instant conservé le principe de l'anonymat.

En France, cette question a fait l'objet de nombreux rapports et de discussions lors des états généraux de la bioéthique en vue de la révision de la loi en 2009. Les avis restent partagés.

Le principe de gratuité

Le principe de la gratuité appliqué en France n'est pas la situation la plus rencontrée. De nombreux

pays ont prévu une rémunération des donneurs de sperme. Il existe actuellement des banques de sperme par exemple au Danemark qui réalisent des ventes de paillettes par le biais d'un réseau franchisé international. L'importation de paillettes étrangères n'est théoriquement pas interdite en France, mais doit faire l'objet d'une déclaration et d'un dossier circonstancié à l'Agence de biomédecine.

Pour les ovocytes, la situation est plus disparate. Peu de pays applique le principe de gratuité et d'anonymat pour le don d'ovocyte. En Angleterre, la femme devant bénéficier d'une AMP peut faire don d'une partie de ses ovocytes en échange de quoi elle est prise en charge avec un coût moindre pour son propre traitement. Aux États-Unis, le don d'ovocytes est l'objet d'une marchandisation extrême. En Espagne, la loi autorise une indemnité de 900 euros pour la donneuse, ce qui explique l'absence de délai dans ce pays pour cette technique et l'apparition d'un tourisme médical très organisé.

En France, où les délais de prise en charge varient de 2 à 5 ans, les frais de la donneuse liés au don sont depuis peu pris en charge par l'assurance maladie. Il n'en reste pas moins que de nombreux professionnels demandent une indemnisation pour les donneuses comme en Espagne.

Un tourisme médical de grande ampleur s'est développé en direction des pays de l'est, de la Grèce et de l'Espagne. Les donneuses sont souvent des étudiantes de conditions modestes. C'est la raison pour laquelle on s'interroge sur le caractère « volontaire » ambigu de leur démarche. Les associations de patients en France sont souvent le relais de ces établissements étrangers. Une note du conseil de l'Ordre des médecins en France a rappelé à ses membres l'interdiction d'une telle publicité.

Comparaison des législations en termes de gestation pour autrui

La pratique du don d'enfant est connue depuis des millénaires dans certaines civilisations. L'AMP permet techniquement de réaliser une gestation pour autrui.

Les pays qui interdisent la grossesse pour autrui

Cette pratique est toujours interdite en France et dans de nombreux pays comme l'Italie et l'Espagne. Aux États-Unis, elle est même criminalisée dans certains États alors qu'elle fait l'objet de contrat dans d'autres.

Les pays qui n'ont pas légiféré

Dans quelques pays, elle n'est pas interdite ou ne fait pas l'objet d'un encadrement. « Ce n'est pas

interdit mais ce n'est pas non plus autorisé. » Les Pays-Bas ont reconnu dans un premier temps l'acte médical sans reconnaissance en termes de droit civil. Seule la rémunération de la donneuse est pénalisée et la mère porteuse a la possibilité de garder l'enfant après l'accouchement. Le seul centre autorisé a cessé son activité.

En Belgique, la gestation pour autrui n'est pas interdite mais elle n'est pas encadrée par la loi et le principe d'indisponibilité de la personne rend nul tous les contrats qui seraient signés avec des mères porteuses. De plus, les problèmes de filiation ne sont pas réglés.

Les pays qui l'autorisent

La Finlande a admis la pratique de la gestation pour autrui.

Actuellement, la majorité des gestations pour autrui sont réalisées aux États-Unis. Les couples passent des contrats gérés par des cabinets d'avocats spécialisés.

Enfin, il existe des pays qui disposent de texte encadrant la gestation pour autrui. Le Royaume-Uni, le Danemark, la Grèce, la Hongrie, la Géorgie ont voté des textes précisant les conditions d'accès à cette technique, ainsi que les conditions de filiation et d'indemnisation pour certain d'entre eux.

Seul Israël a voté une loi spécifique concernant la maternité de substitution. Dans cet État, la mère porteuse ne doit pas être la mère biologique et l'embryon doit être obtenu par FIV avec les gamètes du couple demandeur ou de tiers. Du fait de la transmission du judaïsme par la femme, si le couple demandeur est juif la mère porteuse doit l'être également.

Comparaison des législations à propos de la recherche sur l'embryon

Compte tenu des enjeux scientifiques, la recherche sur l'embryon a été l'objet de nombreuses discussions. Le choix des pays de s'engager dans cette voie de recherche est fonction du « statut qu'ils accordent à l'embryon ». En France, cette recherche est en principe interdite mais, à titre exceptionnel, certaines études peuvent être menées à condition qu'elles ne portent pas atteinte à l'intégrité de l'embryon. Les projets doivent être analysés par un comité d'experts à l'Agence de biomédecine. Les pratiques sont très encadrées. Très peu de projets ont reçu l'aval de l'Agence à ce jour. Quatre situations peuvent être rencontrées.

Les pays où la recherche est autorisée

C'est le cas de l'Angleterre qui est particulièrement en pointe dans ce domaine. La production d'embryons destinés à la recherche et la création d'hybrides cytoplasmiques sont autorisées. Ces recherches sont contrôlées par la HFEA (Human Fertilization and Embryology Authority).

Depuis 2003, la Belgique l'autorise si elle présente un intérêt thérapeutique ou d'amélioration des connaissances dans le domaine de la reproduction, des maladies génétiques et des greffes d'organes ou de tissus. Elle est autorisée pour les embryons d'AMP ne faisant plus l'objet d'un projet parental. La production d'embryon destiné à la recherche n'est autorisée que si elle ne peut s'effectuer sur les embryons surnuméraires issus d'AMP. Donc la production d'embryons à fin de recherche est implicitement permise si on ne peut faire la recherche sur des embryons surnuméraires.

En Espagne, depuis 2003, il est possible d'utiliser les embryons surnuméraires ne faisant pas l'objet d'un projet parental. La création d'embryons pour la recherche est interdite sauf pour les techniques de transfert nucléaire. La Suède autorise depuis 1991 la recherche sur l'embryon de moins de 14 jours. Un comité d'éthique est habilité à autoriser un projet nécessitant la production d'embryon en vue de recherche. De même, on peut importer des embryons et des cellules et réaliser des transferts nucléaires.

En Israël, la production d'embryons destinés à la recherche est autorisée, ce qui a impliqué l'autorisation du don d'ovocyte.

La zone Asie pacifique s'est très fortement impliquée dans la recherche sur l'embryon, allant jusqu'à mener des travaux sur le clonage de l'embryon humain. La création d'embryons pour la recherche et le transfert nucléaire y est autorisée. Cependant, la Corée autorise la production d'embryon par transfert nucléaire mais interdit les autres techniques aboutissant à la production d'embryons pour la recherche.

Les pays disposant d'un régime d'autorisation avec restriction

Certains pays autorisent la recherche sur l'embryon les cellules souches embryonnaires et les dérivations cellulaires mais interdisent la production d'embryons pour la recherche ou les transferts nucléaires. La majorité des pays européens sont dans cette catégorie. C'est une condition exclusive pour obtenir des financements européens.

La Slovaquie, la Bulgarie, la Croatie, Chypre, le Portugal, l'Estonie, l'Islande, l'Australie, la Nouvelle Zélande, le Brésil et l'Inde limitent la recherche sur des embryons de maximum 14 jours. La Suisse,

depuis 2004, autorise les recherches sur les cellules souches de même le Canada.

Enfin, il existe des pays où la législation interdit la recherche sur l'embryon tout en autorisant l'importation de lignées, c'est le cas de la France et avec 4 ans de décalage de l'Allemagne. Cependant, depuis 2002, elle autorise l'importation de cellules dérivées si elle provient d'une dérivation antérieure à la loi modifiée en 2008. La Hongrie a une législation similaire. En Italie, la recherche est interdite sauf s'il existe un bénéfice pour l'embryon lui-même et l'importation des cellules souches est autorisée depuis 2004.

Paradoxalement, les États-Unis interdisent depuis 2002 d'utiliser des fonds fédéraux pour ce type de recherche. Aucune lignée cellulaire produite au-delà de cette date ne peut être utilisée pour des recherches. Cette décision limite le nombre de lignée disponible, soit environ à 20 actuellement. Mais il n'est pas interdit d'utiliser des fonds privés, ce qui inquiète les chercheurs.

Il faut noter que le soutien financier des états est indispensable pour le développement de la recherche c'est la raison pour laquelle les États-Unis et la zone Asie pacifique ont pu créer des instituts de recherche dédiés à cette thématique. Aux États-Unis, les fonds privés ont pris le relais des fonds fédéraux.

Les pays qui interdisent l'ensemble des recherches

Enfin, certains pays ont totalement interdit l'ensemble des recherches, que ce soit sur l'embryon ou les cellules embryonnaires, par exemple la Pologne. Lors du conseil de l'Europe, elle a adopté une position très ferme pour que de tels projets ne soient pas financés au niveau communautaire.

L'Irlande, bien qu'elle n'ait pas légiféré, a émis des recommandations interdisant de façon explicite la recherche sur l'embryon. Il en est de même en Slovaquie, en Lituanie et en Bulgarie. La Norvège, à la différence de ses voisins suédois et finlandais, interdit par voie législative ces pratiques.

À l'extérieur de l'Europe, la Russie, les pays du Maghreb, la Jordanie, le Vietnam, les Philippines et la Malaisie ont également interdit ces recherches. Il en est de même pour les pays d'Amérique du Sud à l'exception du Brésil.

Les organismes nationaux de contrôle

Rares sont les pays qui ont déjà créé un organisme de surveillance des pratiques d'AMP et techniques dérivées. En France, l'Agence de biomédecine a été créée à l'occasion de la révision de la loi en 2004. Ses missions ont été exposées dans un chapitre

précédent. Le Royaume-Uni dispose de la NHSBT (National Health Service Blood and Transplant) qui est l'Autorité de santé nationale. Elle est le premier pays à avoir organisé ces services. La HFEA depuis 1990 encadre les pratiques de FIV et la recherche sur l'embryon. Elle est chargée de délivrer les autorisations d'activités, du recueil et des analyses des résultats en intraconjugal et tiers donneurs. En Espagne, un projet de loi est à l'étude.

Où en est-on du point de vue du droit communautaire ?

Comme nous l'avons dit précédemment bien que l'Europe se soit intéressée à ce sujet, il n'existe pas à ce jour de lois européennes dans ce domaine. Le principe de subsidiarité s'applique en particulier pour le droit de la filiation.

La charte des Droits fondamentaux

Le droit communautaire n'a pas à ce jour prévu de texte concernant l'encadrement juridique de la bioéthique. Trop de questions posées portent sur les Droits fondamentaux des personnes variant d'un pays à l'autre. Les États membres ont l'entière compétence dans ce domaine. Le traité de l'Union européenne a recherché un équilibre entre le respect des valeurs communes et le respect de la diversité historique culturelle ou religieuse des États membres. Depuis 1999, une « charte des Droits fondamentaux » est proposée. Elle a été proclamée lors de la signature du Traité de Nice en 2000 mais à ce jour elle n'a toujours pas été intégrée dans le Traité de l'Union Européenne alors que le traité de Lisbonne lui donne la même valeur juridique que les autres traités. Le Traité de Lisbonne n'étant toujours pas ratifié par tous les États membres, la situation est loin d'être réglée.

Les directives européennes

Des directives relatives à la santé interférant sur la prise en charge de l'AMP ont été adoptées par le conseil de l'Europe. Ces directives portent uniquement sur des mesures sanitaires et de normes de Qualité. Quatre directives ont été votées :

- 1998/79/CE, sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* et des tests génétiques ;
- 2001/83/CE, sur le codage des médicaments à usage humain ;
- 2002/98/CE, qui établit les normes de sécurité et de qualités pour la collecte, la préparation et la distribution du sang et de ses composés ;

– 2004/23/CE, qui porte sur les normes des dons et l'utilisation des tissus et cellules humains.

Cette dernière directive a nécessité la modification récente de la législation française. Cependant, une directive n'interfère pas sur le pouvoir des états d'autoriser ou d'interdire les pratiques de dons ou l'utilisation de cellules germinales ou embryonnaires. Sans imposer, elle recommande la notion d'anonymat et de gratuité en cas de don mais laisse les états membres décider.

Des projets de directives concernant la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire et sur la sécurité des organes et tissus humains utilisés à des fins médicales sont en cours d'étude. Ces directives sont importantes dans la mesure où le transfert de gamètes de tissus ou d'embryon entre les pays est théoriquement autorisé. Certains pays ont déjà commencé à travailler ensemble pour faire avancer ces projets. Ces directives trouvent également leur importance dans la lutte contre le trafic d'organes de tissus ou de gamètes.

Le Groupe européen d'éthique

En 1998, la commission éthique créée en 1981 a été remplacée par le Groupe européen d'éthique (GEE). Il est chargé de conseiller les instances communautaires dans le domaine des Sciences nouvelles et Biotechnologies. Ceci est le signe de l'engagement éthique de la Commission de Bruxelles. C'est un comité indépendant dont les membres sont nommés à titre personnel pour leur compétence. Cependant, cette commission reste liée à la commission de Bruxelles puisque le parlement ne participe pas à sa nomination.

Ce groupe donne son avis à la demande de la Commission ou du Parlement mais peut également s'autosaisir.

Les programmes européens de recherche

Au niveau européen, un vaste programme de recherche a été mis en place dans le 7^e programme cadre couvrant la période 2007-2013. Lors de la discussion du budget, certains pays comme la Pologne, la Lituanie, Malte, la Slovaquie et l'Autriche se sont opposés au financement des recherches sur les cellules souches embryonnaires. Pour faire voter ce programme, il a fallu poser des limites strictes et la production d'embryons pour la recherche a été exclue des possibilités de financement. Seuls les embryons surnuméraires pourront faire l'objet de recherche. Enfin, pour atteindre la majorité qualifiée indispensable au vote du programme, il a été décidé que les financements seront réservés aux recherches portant sur des lignées cellulaires déjà existantes ou des cellules souches adultes.

Les états restent libres d'interdire la recherche sur l'embryon et les cellules d'origine embryonnaire et aucun financement ne pourra être attribué aux équipes de ces pays.

Avant toute acceptation et financement d'un projet les auteurs auront à faire valider le projet par le pays où la recherche sera réalisée.

Même si l'Europe ne dispose pas d'un cadre juridique établi, des avancées ont été obtenues depuis les années 1990.

L'AMP et la recherche dans le contexte international

Du point de vue international, il n'existe aucun cadre juridique.

L'OMS s'est ému de l'existence de trafics dus à la pénurie d'organes disponibles pour le don et a établi en 1991 des principes directeurs pour ce domaine de la médecine. Ces principes ont influencé les choix législatifs de nombreux états. En 2008, ces principes ont été revus et ont précisé la nécessité d'une information claire préalable au consentement du donneur et l'intérêt d'un principe de gratuité.

L'UNESCO s'est également intéressée à cette question avec la déclaration universelle du génome humain et des Droits de l'Homme en 1997, la déclaration portant sur les données génétiques humaines en 2003, et sur la déclaration universelle sur la bioéthique et les Droits de l'homme adoptée en 2005. Cependant, ces déclarations n'ont aucune valeur contraignante et ne peuvent même pas être considérées comme sources de Droit. Elles restent cependant un guide pour les États qui n'ont pas encore légiféré et qui le souhaiteraient. Ainsi, de façon progressive, les positions des différents États pourraient se rapprocher et permettre d'aboutir dans le futur à des principes universels de bioéthique.

On ne peut terminer ce paragraphe sans évoquer la déclaration d'Istanbul en mai 2008 à propos du don d'organe mais qui peut s'appliquer au don de gamètes. Un consensus a été possible autour de la nécessité de chaque pays d'encadrer ces pratiques et de mettre en place un système de surveillance garantissant la sécurité du donneur et du receveur. La convention d'Oviedo a abouti à l'élaboration de la convention des Droits de l'Homme et de la Bio-médecine le 4 avril 1997. Convention européenne à l'origine, elle a une vocation internationale car elle peut être signée par des pays autres que les États membres de l'Union.

Enfin, en 2005, le Conseil de l'Europe a adopté à Varsovie une convention qui est entrée en vigueur en février 2008, tendant à lutter contre le trafic

d'êtres humains mais par extension on peut envisager que cela s'applique indirectement aux d'organes et aux gamètes.

Conclusion

L'Assistance médicale à la procréation a permis une avancée considérable dans la prise en charge des infertilités. Cependant, elle peut être aussi envisagée comme un droit du choix de la procréation pour certains en dehors de tout contexte médical devenant ainsi un élément de liberté individuel. Le statut de l'embryon reste à trouver. Ces techniques posent des problèmes éthiques, en particulier en ce qui concerne le droit de la filiation et le droit de connaître ses origines. La recherche permet de maîtriser de plus en plus des étapes physiologiques pouvant porter atteinte au génome de l'espèce humaine. Mais pour certains, les enjeux en termes de sciences et de médecine justifient la poursuite des travaux même si cela nécessite une transparence et un encadrement strict des pratiques. La législation en matière d'AMP est en continuelle évolution. La société intervient maintenant dans le choix des états. L'absence d'harmonisation des législations a favorisé un tourisme procréatif à travers le monde et de nombreux pays depuis 2004 s'engagent dans une démarche d'encadrement de ces pratiques. Faute d'accord total entre les États membres en Europe, des directives les plus consentuelles possibles sont publiées. Ces textes servent de supports aux nouveaux pays qui souhaitent à leur tour légiférer ce domaine des sciences. La lutte contre ce tourisme qui risque d'être à l'origine d'une nouvelle forme d'esclavage moderne est un enjeu important.

Références

1. Bernard J (1990) De la Biologie à l'Éthique Nouveaux Pouvoirs de la Science. Nouveaux devoirs de l'Homme. Paris, Chastel
2. Lepicard E (1992) L'embryon dans la bible et la tradition rabbinique. Éthique n°3
3. Mattéi JF (1996) Qu'est-ce que l'embryon ? Actes du colloque du Forum Diderot : l'embryon est-il humain ? Paris, PUF : 47-53
4. Sénat (1991) Service des Affaires Européennes Réglementations relatives à l'utilisation des embryons. Avril n°18
5. Stepan J (1990) Recueil International de lois sur la procréation assistée Publication de l'institut suisse de droit comparé. Schulthes Polygraphischer Verlag, Zurich
6. Sureau C (1996) L'embryon humain : une entité scientifique ? Actes du colloque du Forum Diderot : l'embryon est-il humain ? Paris, PUF : 11-25
7. Vigneau D (1994) Dessine moi un embryon. Les petites affiches-les journaux judiciaires associés 149 : 62-69
8. Claes A (2006) La recherche sur le fonctionnement des cellules humaines, rapport de l'OPECST n° 3498 du 6/11/2006
9. CCNE (24 novembre 2005) avis 90 « Accès aux origines, anonymat et secret de la filiation » du Conseil de l'Europe 12/07/2005 CDBI « Réponse aux États Membres du questionnaire sur la PMA et sur le droit à la connaissance de ses origines pour les enfants nés après PMA
10. Paquez AS (2007), Thèse IEP Paris : Les politiques publiques des Biotechnologies médicales (DPI, Thérapie génique, clonage) en Allemagne, en France et au Royaume-Uni
11. Zatti P (2006) Le problème des limites à la procréation assistée dans les lois des principaux pays européens, Droit et Culture 51: 133
12. Andorno R (2004) First step in the development of an international biolaw. Intern J Bioethic 15: 2-3
13. Azoux Bacrie L (2006) Les nouveaux droits fondamentaux. Gazette du Palais 77: p49
14. Byk C (2007) La déclaration universelle sur la Bioéthique et les droits de l'homme. Journal du Droit International, Clunet, juillet-août : 863
15. Lenoir N, Mathieu B (1998) Les normes internationales de la Bioéthique. Paris, PUF
16. Rapport de l'Agence de la Biomédecine (2008) Étude comparative de l'encadrement juridique international : 2-39

III Diagnostic et pronostic

K. Bettahar-Lebugle

Bilan initial d'un couple hypofécond

Définition

Le terme stérilité, à connotation défavorable, est souvent utilisé à mauvais escient et est plus volontiers remplacé par le terme infertilité traduit du terme anglais « infertility ».

Un couple qui désire une grossesse sans succès consulte pour infertilité ou infécondité par opposition au couple fécond qui a déjà obtenu une grossesse. L'infécondité est une notion qui peut changer avec le temps (un couple infécond deviendra fécond lorsqu'il aura obtenu la grossesse désirée). En revanche, l'infertilité se rapporte à la possibilité de concevoir : le couple fertile peut concevoir et non pas le couple infertile ou stérile.

En pratique, la situation est plus floue et les couples hypoféconds ont plus de risque de consulter pour une absence de grossesse dans les 18 mois à 2 ans d'essais infructueux.

Partant de ces définitions, un indice a été choisi afin d'harmoniser les prises en charge médicale. Il s'agit de la fécondabilité qui est la probabilité de concevoir à chaque cycle menstruel. En France, la fécondabilité est en moyenne de 25 % par cycle. Certaines enquêtes ont montré qu'environ 10 % des couples ont une fécondabilité réduite à moins de 10 %. La moitié de ces couples vont tout de même concevoir au bout d'un an et les trois quarts après deux ans de rapports réguliers sans contraception.

Quant aux couples à la fécondabilité très abaissée (moins de 5 %), le tiers va concevoir naturellement après un an et la moitié après deux ans.

Ceci montre bien que l'absence de grossesse après un an est un signe évocateur d'hypofécondité, ce qui justifie la réalisation d'un bilan.

L'âge de la femme est le deuxième élément essentiel à prendre en compte après la durée de l'infécondité. La fécondité féminine diminue à partir de 30 ans avec une accélération de ce phénomène après 35 ans. Leridon (1) a calculé que si 100 femmes désirent une grossesse, 90,7 % l'obtiennent dans les quatre ans si elles ont 30 ans, 85,9 % si elles ont

35 ans, et 63,7 % si elles ont 40 ans. Il faut donc tenir compte de l'âge de la femme pour déterminer la rapidité du bilan du couple.

Interrogatoire

Il s'agit de la première étape importante dans la prise en charge d'une hypofécondité et cela nécessite d'établir un dossier pour les deux conjoints. Pour plus de commodités, le dossier est commun pour les deux et c'est un cas de figure qui n'est retrouvé qu'en médecine de la reproduction (un dossier médical pour deux personnes). Il importe que les deux membres du couple soient interrogés ensemble, puis séparément, afin de respecter le secret médical dû à chacun des partenaires.

Questions d'ordre général

Le dossier médical doit comporter des informations précises sur la vie du couple, leur profession, l'endroit où ils l'exercent, les horaires de travail car cela peut avoir une influence sur la fréquence des rapports sexuels. Ce sera le cas de couples travaillant toute la semaine dans deux régions différentes et qui ne peuvent se rencontrer qu'en fin de semaine. Cela va aussi concerner des couples qui travaillent de nuit pour l'un et de jour pour l'autre. Il ne faut pas oublier que certains métiers exposent à des toxiques ou à des températures élevées.

La réalité des rapports sexuels et leur fréquence doivent également être recherchées, car il n'est pas rare d'être confronté à des couples qui consultent pour infertilité et qui ne disent pas qu'ils n'ont aucun rapport. Dans ce cas particulier, il est indispensable de chercher à remonter à l'origine du trouble comme par exemple un antécédent de viol ou d'inceste, un problème de libido ou une dyspareunie qui empêche tout rapport.

La consommation de médicaments, de tabac, d'alcool ou de drogues (notamment celle de cannabis qui est loin d'être rare) doit également être recherchée.

Ensuite, il faut tenter d'avoir le maximum d'informations sur les antécédents de la femme et de l'homme afin de rechercher une ou plusieurs pathologies pouvant être délétères sur la fertilité.

Questions et facteurs de risques féminins

Antécédents gynécologiques

On recherche systématiquement l'âge des premières règles, la régularité des cycles, la date des dernières règles, l'abondance et la durée des règles.

Une contraception a-t-elle été utilisée avant le désir de grossesse ? Si oui laquelle ou lesquelles ? Y a-t-il eu des complications comme une infection avec un dispositif intra-utérin par exemple. Quand la contraception a-t-elle été interrompue ?

La recherche d'antécédent d'infection sexuellement transmissible, d'infection gynécologique ainsi que d'éventuels traitements médicaux, voire chirurgicaux, doit être systématique.

Il faut préciser le caractère primaire ou secondaire de l'hypofécondité.

Antécédents obstétricaux

En cas d'antécédents obstétricaux on en précisera :

- l'année de survenue de la grossesse ;
- le caractère spontané ou induit par un traitement inducteur de l'ovulation, voire par une aide médicale à la procréation (AMP) ;
- avec le partenaire actuel ou non ;
- le déroulement ;
- l'issue (accouchement voie basse, césarienne, avortement spontané ou médical) et l'âge gestationnel (à terme, prématuré, avortement précoce ou tardif) ;
- les éventuelles complications (hémorragie de la délivrance, endométrite) ;
- le devenir des éventuels enfants (état de santé, maladie, problème génétique) ;

En cas d'avortement spontané ou d'interruption volontaire de grossesse, il faut en préciser le nombre et la notion de curetage et/ou de complications infectieuses.

S'il y a eu grossesse extra-utérine, le traitement a été médical par injection de méthotrexate ou chirurgical (conservateur ou salpingectomie).

Antécédents médicaux

On recherche la notion de maladie ou d'une pathologie chronique telle que le diabète, la tuberculose, une affection cardio-vasculaire, rénale voire

endocrinienne. Préciser les traitements pris par la patiente car certains sont responsables d'un trouble de l'ovulation comme les antidépresseurs. Enfin, il convient de détecter un antécédent d'anorexie mentale, une pratique de sport à haut niveau, qui peuvent influencer l'ovulation.

Dans des cas plus rares, l'histoire clinique permettra de retrouver la notion de traitement carcinologique avec une altération secondaire de la fonction ovarienne.

Antécédents chirurgicaux

Il faut savoir si la patiente a eu des interventions abdomino-pelviennes, en préciser le type d'incision (laparotomie ou coelioscopie qui est considérée comme moins adhésiogène), le caractère urgent, la notion d'infection comme une péritonite et rechercher la notion de complications. La consultation des comptes rendus opératoires est dans ces cas très utile pour évaluer l'importance d'adhérences, l'existence d'une endométriose et son stade.

Antécédents familiaux

Ils doivent être systématiquement recherchés. Ils permettent de découvrir des pathologies congénitales, comme par exemple une mucoviscidose ou une anomalie chromosomique, qui doivent conduire à faire faire un caryotype et une enquête génétique. Les antécédents de thrombose peuvent évoquer une anomalie d'un facteur de coagulation ce qui conditionnera un bilan chez la patiente elle-même. Pour les patientes nées entre 1955 et 1977, il faut s'intéresser à une éventuelle exposition *in utero* au Distilbène®.

Questions et facteurs de risques masculins

Comme pour celui de sa compagne, le dossier médical du patient doit comporter tous les antécédents notables tant personnels que médico-chirurgicaux et familiaux.

Antécédents médicaux

On recherche un retard pubertaire, une anomalie des organes génitaux telle qu'un hypospadias ou une varicocèle et une maladie générale telle que le diabète, l'hypertension artérielle, l'épilepsie, une pathologie endocrinienne qui peuvent avoir un impact direct ou via les traitements sur la fertilité.

La notion d'infections bronchiques répétées, de dilatation des bronches ou de sinusites peut orienter vers une anomalie ciliaire avec risque d'asthénospermie sévère, voire d'azoospermie en cas de mutation d'un gène de la mucoviscidose. La notion d'orchite ourlienne, d'infection urogénitale ou

d'infection sexuellement transmissible oriente vers une altération du sperme.

Il faut également penser à d'éventuels traumatismes périnéo-pelvien ou testiculaire. Un antécédent de spina bifida de paraplégie entraîne une absence d'érection, des sondages urinaires itératifs donnent des séquelles infectieuses.

L'*habitus* est, bien entendu, évalué avec recherche d'une consommation de tabac qui doit être chiffrée, d'alcool, de drogue, la consommation de médicaments en particulier les médicaments dont on sait qu'ils ont un effet sur la spermiogenèse tels que les anabolisants, particulièrement utilisés dans les milieux sportifs, la salazopirine, la spironolactone, la colchicine, les furanes, les anti-H2, la ciclosporine et les antécédents d'éventuelle chimiothérapie. Cette liste n'est pas limitative dans la mesure où on ne connaît pas les effets de nombreux médicaments sur la spermiogenèse. Il faut également se renseigner sur la profession du patient et on recherchera une notion de stress, de toxicité professionnelle ou d'exposition à la chaleur.

Antécédents chirurgicaux

Certaines pathologies et certains types de chirurgie ont un impact direct sur la fonction testiculaire comme la cryptorchidie uni- ou bilatérale (souvent traitée trop tardivement), la cure de hernie inguinale bilatérale (risque de lésion de l'artère testiculaire ou du canal déférent), le traitement chirurgical d'un varicocèle ou d'un kyste du cordon ou de l'épididyme.

La chirurgie périnéale et pelvienne peut avoir comme conséquence un trouble de l'éjaculation (anéjaculation, éjaculation rétrograde) ou de l'érection. Le patient doit être informé en amont de ce type d'intervention pour pouvoir autoconserver du sperme s'il le souhaite.

Antécédents familiaux

Ils permettent de dépister des maladies génétiques comme la mucoviscidose ou une notion d'infécondité chez plusieurs membres de la famille.

Examen clinique

De la femme

Le poids et la taille sont les premiers éléments à noter. Le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) est fondamental pour une prise en charge optimale. Un IMC trop bas < 18 ou trop élevé > 35 sont responsables de troubles de l'ovulation. L'examen physique comporte également une appréciation

de la morphologie, de la pilosité, de la présence d'acné ainsi que la présence de cicatrices abdomino-pelviennes.

L'examen se poursuit par celui de la vulve à la recherche d'une anomalie congénitale. L'examen au spéculum permet de rechercher une éventuelle cloison et de voir le col de l'utérus qui peut être double dans les cas d'utérus bicorne. Le col peut être cicatriciel après une conisation par exemple. Si l'examen a lieu à la période préovulatoire, on peut examiner la qualité de la glaire cervicale.

Le toucher vaginal permet d'apprécier le volume de l'utérus et des annexes, de détecter une masse pathologique telle qu'un fibrome ou un kyste ovarien. La recherche de points douloureux notamment utéro-sacrés peut orienter vers un diagnostic d'endométriose.

L'examen des seins doit être systématique, à la recherche d'un nodule ou d'un écoulement pouvant être le témoin d'une hyperprolactinémie. Enfin, l'examen de la thyroïde, simple à faire peut révéler un goitre ou un nodule thyroïdien.

De l'homme

L'examen clinique est le deuxième temps essentiel de la première consultation. Il doit être fait par un spécialiste entraîné ayant l'expérience de l'examen des organes génitaux externes masculins. Il commence avec le patient en position debout pour rechercher spontanément ou à la toux la présence d'une varicocèle en particulier à gauche, mais il faut noter que celle-ci peut être bilatérale. Le patient est ensuite placé en décubitus dorsal et on le fait à nouveau tousser pour rechercher aussi la possibilité d'une varicocèle à la toux. La peau et la pilosité de la région pubienne et des régions inguinales sont examinées afin d'apprécier la présence de cicatrices, d'une hernie par introduction du doigt au niveau du canal inguinal. La palpation des testicules confirmera la présence de deux gonades dont le volume, la tonicité et la position seront appréciés et notés. Les épидидymes seront palpés sur l'ensemble de leur trajet, on recherchera en particulier à en apprécier une éventuelle dilatation, surtout au niveau de la tête, ou la présence de kyste ou de calcification perceptible sous la forme de nodule dur. On palpera aussi les canaux déférents et en particulier la jonction épидидymo-déférentielle à la recherche d'une agénésie bilatérale. La verge doit également être examinée à la recherche d'une éventuelle plaque de Lapeyronie (affection bénigne caractérisée par une induration plastique localisée au niveau des corps caverneux de la verge entraînant une déformation de celle-ci en érection) ou une position hypospade ou une sténose ayant pu passer inaperçue chez le patient. Le morphotype

du patient doit également être noté pour rechercher un éventuel Klinefelter, la pilosité doit avoir une distribution masculine, les seins seront aussi examinés. Enfin, un examen neurologique périnéal et un toucher rectal doivent être pratiqués afin d'apprécier la présence de la prostate, son volume, sa sensibilité, la présence des vésicules séminales et le fait qu'elles soient dilatées ou non.

Causes de l'hypofécondité

À la fin de la première consultation telle que décrite ci-dessus, il devient possible d'établir une hypothèse sur l'explication de l'hypofécondité.

La cause en est évidente lorsque l'on décèle :

- un trouble de la sexualité du couple (absence de rapports, anéjaculation, troubles de l'érection, pénétration impossible, etc.) ;
- une anomalie génitale féminine (absence de vagin comme dans le syndrome de Rokistansky-Kuster-Hauser ou un testicule féminisant évoqué devant une aménorrhée et une absence de poils, une cloison vaginale, etc.) ;
- une anomalie génitale masculine (micropénis, état intersexué, hypospadias) ;
- des antécédents médico-chirurgicaux pouvant avoir un impact sur la fertilité.

La cause est supposée sur les données de l'histoire clinique. Le bilan sera alors orienté.

Des cycles irréguliers, une spanioménorrhée, un poids anormalement bas ou élevé évoquent une anovulation qui peut être explorée par une surveillance de la courbe ménothermique, les dosages hormonaux de base et l'échographie pelvienne.

Un antécédent de péritonite, de kystectomie, de salpingite va orienter vers une anomalie de la perméabilité tubaire qui peut être explorée par hystérosalpingographie, voire par coelioscopie.

Un antécédent de conisation ou autre traitement sur le col, une glaire pathologique évoqueront une étiologie cervicale et sera explorée par un test de Huhner.

Un hypogonadisme, un trouble sexuel, une gynécomastie, une varicocèle, une exposition à un traitement ou toxique imposent l'exploration du sperme et/ou des dosages hormonaux.

L'étude du caryotype sanguin en cas d'antécédents de plusieurs avortements spontanés.

Aucune cause n'est évoquée pour expliquer l'absence de grossesse chez ce couple. Il faut alors faire un bilan de première intention comportant des dosages hormonaux, une hystérosalpingographie, un spermogramme, un spermocytogramme et une spermoculture.

Les examens de deuxième intention peuvent être faits en fonction des précédentes explorations : le test de Huhner, le test de capacitation du sperme, l'hystérocopie.

Examens complémentaires

Chez la femme

Courbe thermique

Elle va nous renseigner sur la probabilité d'une ovulation en cas de décalage thermique avec température en plateau en deuxième phase de cycle. La date de l'ovulation ne sera connue qu'a posteriori car elle correspond au point le plus bas de la courbe (nadir) avant la montée thermique. Si la courbe est plate, cela est témoin d'une anovulation. Un plateau court va, quant à lui, signaler une insuffisance du corps jaune. La femme doit prendre sa température tous les matins avant le lever. Cela sous-entend que ses horaires soient réguliers. Une patiente qui a des horaires de travail très irréguliers ou qui travaille de nuit n'aura pas des températures matinales informatives et dans ce cas il est inutile de demander une courbe. Il est conseillé d'observer la température sur deux ou trois cycles. Aller au-delà est inutile et surtout très épuisant pour la femme.

Échographie pelvienne

Cet examen est caractérisé par la facilité de son exécution et par son innocuité. L'échographie trouve tout naturellement une place croissante dans le panel des techniques d'imagerie dans l'infertilité grâce à l'avènement des sondes endocavitaires de haute fréquence et des techniques Doppler. Son innocuité, sa facilité de réalisation et son coût modeste en font une technique de choix. L'échographie par voie vaginale a supplanté l'échographie transvésicale, améliorant le confort des patientes tout comme la qualité des images. L'échographie abdominale reste utilisée dans les quelques situations où existe une contre-indication à l'utilisation d'une sonde vaginale (atrophie extrême, virginité).

Elle permet de s'assurer de l'absence d'une anomalie utérine (fibrome, polype, cloison, utérus bicorne, adénomyose). Les annexes sont explorées, ce qui peut permettre de trouver des anomalies telles qu'un kyste ovarien ou un hydrosalpinx. Enfin, l'échographie permet d'estimer la réserve ovarienne grâce au décompte folliculaire et de faire une adéquation entre la taille des follicules, le jour du cycle et l'aspect de la glaire. En revanche, elle ne permet pas d'apprécier la qualité des trompes.

Test de Huhner

Il s'agit d'une exploration possible dans un bilan d'infertilité si aucune cause n'est évoquée d'emblée et si la femme est jeune. Il permet d'observer les spermatozoïdes au cours de leur ascension dans la glaire. Ce test doit être pratiqué 8 à 16 heures

après un rapport, en phase pré-ovulatoire, la veille ou l'avant-veille de la montée thermique.

À cette période, le col doit être ouvert et la glaire abondante, transparente, filante, pauvre en leucocytes et cristallisant en feuilles de fougère. Pour objectiver ces données, le score d'Insler peut être utilisé (tableau I).

Plus récemment, Moghissi (3) a proposé un score plus complet pour donner les caractéristiques du mucus. Le score maximal est de 15. Au-dessus de 10 signifie que la glaire présente des qualités favorables pour la pénétration des spermatozoïdes. Alors qu'un score < 10 caractérise une glaire peu fonctionnelle. Ce score est calculé à partir du volume de la glaire prélevée et quatre variables décrivent ses caractéristiques et son aspect. Le pH n'est pas inclus dans ce score.

Les variables étudiées sont :

- le volume : 0 = 0 mL, 1 = 0,1 mL, 2 = 0,2 mL, 3 = 0,3 mL ;
- la viscosité : 0 = glaire épaisse, très visqueuse de type prémenstruel, 1 = viscosité intermédiaire, 2 = mucus peu visqueux, 3 = glaire aqueuse, de viscosité minime, de type préovulatoire ;
- la cristallisation en feuilles de fougères : 0 = pas de cristallisation, 1 = formation de cristaux atypiques, 2 = cristallisation en feuilles de fougères de 1^{er} et 2^e ordre, 3 = cristallisation en feuilles de fougères de 3^e et 4^e ordre ;
- la filance : 0 ≤ 1 cm, 1 = 1-4 cm, 2 = 5-8 cm, 3 = 9 cm et plus ;
- la cellularité : 0 > 20 cellules/champ, soit > 1 000 cellules/mm³, 1 = 11 à 20 cellules/champ, soit 501 à 1 000 cellules/mm³, 2 = 1 à 10 cellules/champ, soit 1 à 500 cellules/mm³, 3 = 0 cellules ;

Le pH du mucus cervical doit être mesuré à l'aide d'un papier pH, in situ ou immédiatement après le prélèvement, en évitant de le contaminer avec des sécrétions vaginales qui sont plus acides.

Un mucus acide immobilise les spermatozoïdes, tandis qu'un mucus alcalin stimule leur mobilité. La valeur optimale pour la migration et la survie des spermatozoïdes dans la glaire est comprise entre 7 et 8,5.

La glaire est prélevée à l'aide d'un aspi-glaire qui permet d'examiner la fraction la plus intéressante, celle qui se trouve dans les cryptes cervicales, là où les spermatozoïdes se réfugient alors que les spermatozoïdes immobiles sont dans le courant cervical principal. Les cryptes représentent une sorte de réservoir de spermatozoïdes qui leur permet de préserver leur énergie et les protège des macrophages et des anticorps. Il est admis que ces spermatozoïdes sont de meilleure qualité. Ils sont ensuite réactivés dans les cryptes pour pénétrer dans le flux cervical (2).

Elle doit contenir au moins 5 à 10 spermatozoïdes à progression rapide et franche par champ (grossissement 400).

Tableau I – Éléments permettant le calcul du score d'Insler (2).

Score	1	2	3
Ouverture du col	ponctuel	perméable	béant
Abondance glaire	minime	en goutte	en cascade
Filance	1-4 cm	5-8 cm	> 8 cm
Cristallisation	linéaire	partielle	complète

Lorsque le score est entre 8 et 10, la sécrétion cervicale est satisfaisante, entre 4 et 7 elle est insuffisante et entre 0 et 3 elle est nulle.

Hystérosalpingographie

L'hystérosalpingographie (HSG) reste indispensable pour apprécier la qualité et la perméabilité tubaires. Elle doit être réalisée après les règles et avant l'ovulation. En effet, pendant les règles, les images sont perturbées par la présence de débris intracavitaires, en phase lutéale, l'HSG risquerait d'être réalisée chez une femme enceinte, de plus les images sont perturbées par l'endomètre épaissi et par l'aspect ballonisé de l'utérus. Deux contre-indications sont formelles : l'infection et la grossesse. Au moindre doute clinique d'infection ou en cas de suspicion d'hydrosalpinx à l'échographie, il faut pratiquer l'examen sous antibiotiques, voire préférer la coelioscopie. En cas d'aménorrhée prolongée, un test de grossesse éliminera formellement cette dernière avant la pratique de l'HSG. L'allergie aux produits de contraste iodés représente une contre-indication relative. Une préparation « antiallergique » peut résoudre le problème, des produits de contraste non ioniques peuvent être préconisés.

Un premier cliché à vide est réalisé, permettant de repérer des calcifications ou des opacités anormales (kyste dermoïde) ou des clartés anormales (graisse). Six clichés suivent, montrant l'aspect dynamique de l'examen : cliché de face en semi-réplétion avec imprégnation en couche mince de la cavité utérine ; cliché de face en réplétion complète avant la réplétion tubaire pour une visualisation indirecte de la pathologie pariétale ; cliché de salpingographie complète objectivant les trompes ; cliché de profil précisant les rapports antérieurs et postérieurs des organes génitaux dans le pelvis ; cliché d'évacuation utérine, le passage du produit dans la cavité péritonéale objective les contours utérins et annexiels ; cliché de brassage péritonéal, tardif, le liquide doit diffuser de façon bilatérale, symétrique et homogène dans la cavité péritonéale au niveau pelvien.

Les douleurs en cours d'examen sont liées à la pression intra-utérine et intratubaire. L'utilisation d'antispasmodiques et de produits ultrafluides limitent ces phénomènes. Lorsque ces douleurs surviennent dans un 2^e temps, dans les heures ou les jours qui suivent l'HSG, il faut craindre une complication infectieuse. Un éventuel passage vasculaire (muqueuse atrophique ou inflammatoire)

est généralement sans gravité. Les perforations sont rares. Pour les clichés de face, on exerce une traction sur le col pour corriger une éventuelle ante- ou rétroversion utérine de façon à visualiser une cavité triangulaire bien déroulée et éviter d'éventuelles superpositions. Le cliché de profil est réalisé sans traction. Une fuite vaginale du produit de contraste peut empêcher une bonne visualisation des trompes et faire porter à tort le diagnostic d'obturation tubaire. À l'inverse, un remplissage trop important peut masquer certaines images intracavitaires. Des bulles d'air, mobiles d'un cliché à l'autre, sont à différencier d'un polype.

Sonohystérogaphie (ou échographie de contraste)

Elle est réalisée en ambulatoire sans sédation ni prémédication car peu douloureuse, en 1^{re} partie de cycle. Un cathéter intra-utérin muni d'un ballonnet est mis en place. Un produit de contraste est injecté, qui est soit du sérum physiologique (10-40 mL), soit un sucre échogène (suspension de galactose, 10-20 mL) (Echovist®). La solution saline est généralement choisie pour explorer la cavité utérine et la solution échogène pour apprécier la perméabilité tubaire (4). L'échographie endovaginale est réalisée une fois le système en place.

La sonohystérogaphie est mieux tolérée que l'hystérogaphie et ne nécessite pas d'irradiation (5). Elle est par ailleurs sans risque allergique contrairement à l'hystérosalpingographie. Il s'agit de la seule technique permettant une exploration globale du myomètre, de l'endomètre et de la cavité.

L'étude des anomalies intracavitaires est facilitée. En gardant l'hystérogaphie comme l'examen de référence, la sonohystérogaphie a une sensibilité de 87,5 %, une spécificité de 100 %, une valeur prédictive positive de 100 % et une valeur prédictive négative de 91,6 % dans le dépistage des anomalies endocavitaires dans une étude concernant 44 patientes incluses en FIV (6).

Ainsi, les performances de la sonohystérogaphie au sérum physiologique sont excellentes dans l'évaluation de la pathologie endo-utérine, meilleures que pour le diagnostic de pathologie ou même de perméabilité tubaire (4).

La sonohystérogaphie a l'avantage sur l'hystérogaphie d'associer une imagerie intracavitaire à une imagerie pelvienne (fibrome sous-séreux, kyste de l'ovaire). L'étude des trompes (de leur perméabilité) s'aide des techniques Doppler (7). Elle peut être réalisée dans le bilan initial mais ne peut remplacer l'HSG qui reste l'examen de référence.

Hystérogaphie

Elle permet à la fois un geste diagnostique et thérapeutique mais elle est plus invasive que l'échographie et l'hystérogaphie, la plaçant initialement

comme examen de 2^e intention. L'hystérogaphie diagnostique ambulatoire a changé l'ordre des choses en facilitant l'accès à cet examen. Elle est réalisée sans anesthésie générale ni même locale. L'insufflation par CO₂ permet de distendre la cavité utérine pour une bonne visualisation. Le CO₂ est utilisé sous couvert de la mise en œuvre d'appareils électroniques fiables de contrôle de la pression et du débit du gaz. Le sérum physiologique est également utilisé ; il permet de maintenir une vision, claire même en cas de saignement, et de faire « flotter » les structures intracavitaires. L'hystérogaphie visualise le trajet cervical et isthmique, la cavité utérine puis les orifices tubaires. L'endoscope rigide de 4 mm est inséré dans une chemise diagnostique de 5,5 mm avec un canal pour insuffler le CO₂. Un hystérogaphie souple de 3 mm de diamètre peut également être proposé. La grossesse, une infection pelvienne récente ou en cours ou des métrorragies sévères représentent des contre-indications à la réalisation de l'examen. Le moment idéal se situe en postmenstruel immédiat (pas de risque de grossesse, endomètre peu épais permettant une bonne visualisation de la cavité). De nombreuses études ont comparé les pertinences respectives de l'hystérosalpingographie et l'hystérogaphie dans le diagnostic des pathologies de la cavité utérine. Pour tous les auteurs, l'hystérogaphie est supérieure en sensibilité et en spécificité à l'hystérosalpingographie pour la pathologie intracavitaire, les faux négatifs de l'hystérogaphie variant de 2 à 50 %, et les faux positifs de 15 à 32 % (8, 9). Prevedourakis, chez 323 femmes infertiles, ne retrouve une corrélation parfaite entre hystérogaphie et hystérosalpingographie que dans 74,8 % des examens (9).

Dosages hormonaux de base

- Ils permettent d'observer le fonctionnement ovarien ainsi que celui de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La prescription comportera le dosage en début de cycle (vers le troisième jour) de : 17 bêta-œstradiol (E2), FSH, LH, prolactine, TSH, testostérone.
- Le dosage de E2 permet d'apprécier la qualité de la sécrétion ovarienne, il est aux alentours de 40 Pg/mL en début de cycle. Si E2 est élevé cela témoigne d'une insuffisance ovarienne débutante. Quand E2 est effondré, cela peut être le signe d'une insuffisance ovarienne avérée telle qu'une défaillance ovarienne précoce ou une insuffisance centrale hypothalamo-hypophysaire.
- Le taux de FSH est normalement inférieur à 10 UI/L. Lorsque le taux de FSH s'élève au-delà, cela signifie que la fonction ovarienne est altérée, on parle d'épuisement ovarien. Au contraire, une FSH basse signe une insuffisance hypophysaire.

- Le taux de LH est normalement aux alentours de 4 UI/L. Une LH élevée doit faire évoquer un syndrome des ovaires polykystiques : le SOPK est un syndrome de dysfonction ovarienne dont la définition nécessite la présence de deux des trois traits phénotypiques suivants : oligo- et/ou anovulation, une hyperandrogénie clinique et/ou biologique, un aspect échographique d'ovaires polykystiques. Une LH basse fait évoquer une insuffisance haute : l'insuffisance gonadique hypothalamo-hypophysaire ou hypogonadisme hypogonadotrope (HH) qui est définie par une sécrétion insuffisante ou absente des gonadotrophines LH et FSH, altérant ou supprimant la fonction gonadique périphérique. Ce déficit en gonadotrophines peut être :
 - d'origine primitivement pituitaire ou secondaire à une atteinte hypothalamique par anomalie sécrétoire de GnRH,
 - provoqué par une lésion organique ou une atteinte fonctionnelle,
 - isolé ou intégré dans un tableau plus large d'insuffisance antéhypophysaire,
 - congénital ou conséquence d'une pathologie acquise,
 - révélé avant ou après l'âge de la puberté.
- Le diagnostic biologique d'hypogonadisme hypogonadotrope repose sur la mise en évidence : d'un taux bas d'estradiol plasmatique, de concentrations plasmatiques effondrées ou de phase folliculaire précoce de gonadotrophines LH et FSH et d'une prolactinémie normale.
- Le test à la GnRH doit être réalisé et peut être négatif ou positif. Ce test ne permet pas de différencier le niveau hypothalamique ou pituitaire d'une atteinte gonadotrope mais évalue plutôt la profondeur du déficit. L'indication de ce test ainsi que l'IRM cérébrale sera posée par l'endocrinologue qui prendra en charge la patiente.
- Le dosage de prolactine doit être fait dans certaines conditions : le matin aux alentours de 10 heures, sans être à jeun, dans des conditions de repos avant le prélèvement sanguin. Sinon le taux de prolactine risque d'être faussement élevé en raison du stress. En cas d'hyperprolactinémie modérée il faut refaire le contrôle quel que soit le jour du cycle. Si le dosage est très élevé au-delà de 100 ng/mL, cela évoque un adénome. Dans ce cas il ne faut pas oublier de rechercher à nouveau une éventuelle prise médicamenteuse comme celle de neuroleptiques, d'antidépresseurs ou d'anti-hypertenseurs. La prolactine peut être élevée dans les hypothyroïdies et dans le SOPK. Devant une hyperprolactinémie, il est très utile de demander un dosage de la prolactine monomérique pour détecter une augmentation de la big-prolactine qui ne justifie pas de traitement. Ceci évite, dans certains cas, le recours à l'IRM hypophysaire dont

le coût est 10 fois supérieur et qui, de plus, nécessite une longue attente du rendez-vous.

- Le dosage des androgènes commence par celui de la testostérone et, en cas d'anomalie, sera suivi par celui de l'androstènedione, de la delta-4-androstènedione et du sulfate de déhydro-androstènedione. La patiente devra être adressée à un médecin endocrinologue.
- Le dosage de la progestérone en deuxième phase de cycle vers J22 est le reflet de la fonction du corps jaune.
- Le dosage de TSH doit être systématique car les hormones thyroïdiennes ont plusieurs effets sur la fonction ovarienne. Chez l'animal, l'hypothyroïdie entraîne, chez les femelles, une diminution du poids des ovaires associée à un arrêt de la folliculogénèse, la fréquence des ovulations diminue. Ces observations se retrouvent dans différentes espèces.
- Chez la femme, l'hyperthyroïdie est à l'origine d'une oligoménorrhée avec dysovulation, voire une aménorrhée. L'hypothyroïdie provoque chez la femme une anovulation et une infertilité marquée, une galactorrhée liée à une augmentation de la prolactine sont observées dans 3 % des cas.
- Le dosage de l'inhibine B est pour certains auteurs (10) un bon marqueur de la réserve ovarienne puisque cette hormone est produite sous le contrôle de la FSH par les cellules de la granulosa des petits follicules antraux et pré-antraux. Un taux d'inhibine B dosé au 3^e jour du cycle a une bonne valeur prédictive de la réponse à la stimulation ovarienne s'il est supérieur à 45 Pg/ mL.
- Le dosage de l'hormone antimüllérienne (AMH) a été plus récemment proposé comme marqueur de la réserve ovarienne (11).

Les sérologies : HIV, hépatite B et C, syphilis, chlamydiae, toxoplasmose et rubéole sont recommandées lors d'un bilan d'infertilité.

Salpingographie sélective

Elle s'adresse aux obstructions proximales des trompes sans cause évidente (il s'agit à l'histologie de débris amorphes) et avec partie distale normale. L'endosalpingiose, la salpingite, l'hydrosalpinx, les adhérences et la fibrose ne peuvent bénéficier de cette technique en tant que méthode thérapeutique. Néanmoins, l'apport diagnostique est évident. Une hystérogographie conventionnelle sous faible sédation est le 1^{er} temps de la procédure. Si l'obstruction proximale se confirme, le cathéter est introduit dans l'utérus.

La salpingographie sélective est réalisée avec un matériel spécifique : cathéter porteur de calibre 6F servant de tuteur dans l'endocol et dans la cavité, sonde précourbée qui sera poussée jusqu'à l'ostium, minisonde souple qui est destinée à pénétrer dans la trompe, guides souples de calibre 0,035 inches

pour le positionnement dans la cavité, guides ultrafins ($\leq 0,018$) pour recanaliser la trompe.

Coelioscopie

Examen chirurgical plus invasif est indiqué sur les données cliniques, échographiques et hystérogaphiques pour confirmer et éventuellement traiter des lésions tubaires postinfectieuses ou une endométriose. L'indication de la coelioscopie doit être bien pesée en raison du risque opératoire. Idéalement la coelioscopie doit être à la fois un geste diagnostique, pronostique et thérapeutique.

Fertiloscopie

Terme proposé par Watrelot *et al.* (12) en 1997, le geste associe une hydrolaparoscopie transvaginale, une épreuve de perméabilité tubaire, une salpingoscopie et une hystéroscopie. Le pelvis est exploré grâce à une microfibre optique introduite par voie vaginale dans le cul-de-sac de Douglas. Encore peu utilisée, cette exploration permet de visualiser les trompes tout en étant moins invasive que la coelioscopie. En cas d'anomalie tubaire, le passage à la coelioscopie est de mise car très peu de gestes peuvent être réalisés hormis la cratérisation des OPK

Chez l'homme

Lorsque l'examen clinique et l'interrogatoire sont terminés, on pourra prescrire des examens complémentaires en expliquant au patient leur utilité. Deux examens sont obligatoires et indispensables. Le premier est le spermogramme, qui doit être fait après une abstinence de deux à trois jours pour pouvoir être significatif et répété deux fois pour être concluant. Le deuxième examen prescrit est le dosage de la FSH et de testostérone qui permettra d'emblée de différencier grossièrement les patients ayant une insuffisance testiculaire de ceux ayant plutôt une pathologie de type obstructif.

D'autres examens seront prescrits en fonction des données de l'examen clinique et du résultat du spermogramme. En cas d'altération sévère du sperme, un caryotype sanguin doit être prescrit.

Si l'on soupçonne une pathologie infectieuse il sera indispensable d'effectuer une uroculture ainsi qu'une spermoculture, soit spontanée, soit après massage prostatique, en particulier si le patient a signalé des brûlures après éjaculation. Des sérologies en particulier HIV, hépatite B et C, chlamydiae, syphilis doivent également être prescrites.

Un bilan biologique peut être demandé avec dosage de l'urée, de la créatinine et de la glycémie pour rechercher des altérations métaboliques et au niveau du sperme on peut rechercher les marqueurs du tractus génital, le zinc, les citrates et les

phosphatases acides prostatiques qui sont des bons marqueurs du fonctionnement de cette glande, le fructose qui reflète l'activité des vésicules séminales et la carnitine des épидидymes. L'effondrement d'un de ces paramètres attirera l'attention sur l'organe correspondant ou sur un obstacle situé en amont de la dernière valeur normale.

En cas d'antécédents chirurgicaux au niveau du tractus génital, on peut être amené à demander un dosage des anticorps antispermatozoïdes, bien que cette donnée soit souvent difficile à interpréter. En cas d'anticorps, le recours à l'aide médicale à la procréation avec lavage du sperme est indiqué. En revanche, un examen simple peut donner des renseignements importants, la recherche de sperme dans les urines après éjaculation, qui confirmera la présence d'une éjaculation rétrograde.

Les examens d'imagerie ont en général peu d'indication. L'échographie-Doppler peut être intéressante lorsque l'on soupçonne la présence d'une varicocèle sans certitude clinique. L'échographie testiculaire ou prostatique ou épидидymaire à la recherche de pathologie infectieuse est souvent peu spécifique et n'affirme absolument pas une lésion actuellement évolutive. L'urographie intraveineuse pourrait être demandée, de même qu'une urétrocystographie rétrograde, en cas de recherche d'anomalies génito-urinaires associées. Le scanner et l'IRM n'ont que des indications exceptionnelles.

Pour la pratique

Il faut retenir les points suivants :

- couple jeune, sans antécédent, désir de grossesse de moins d'un an, examen normal : rassurer, deux courbes ménothermiques, temporiser 6 à 12 mois ;
- couple jeune, avec antécédent notable ou anomalie à l'examen clinique : débiter le bilan en fonction de l'histoire clinique ou des antécédents ;
- couple moins jeune, femme âgée de 38 ans ou plus : débiter d'emblée le bilan avec dosages hormonaux, hystérosalpingographie, sérologies, spermogramme.

Conclusion

La prise en charge d'un couple infertile nécessite une grande rigueur dans la constitution du dossier. Les explorations sont nombreuses et pour des raisons de coût évidentes tout ne peut pas être prescrit. Le médecin doit faire en sorte de débiter un bilan adapté à chaque situation pour pouvoir proposer une thérapeutique ou une aide médicale adéquate sans

oublier la part très importante du contexte psychologique du couple qui vit une infertilité. L'aide psychologique devra être systématiquement proposée aux couples au cours de leur bilan et traitements.

Références

1. Leridon J (2004) Can assisted reproduction technology compensate for the material decline in fertility with age. *Hum Reprod* 19: 1548-53
2. Insler V (1981) Diagnosis and treatment of the cervical factor of infertility. *Reprod* 5: 295-300.
3. Moghissi KS (1976) Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertil Steril* 27: 117-29
4. Créquat J, Pennehouat G, Cornier E *et al.* (1993) Évaluation de la pathologie endo-utérine et de la perméabilité tubaire par échographie de contraste. *Contracept Fertil Sex* 21 : 861-4
5. Kim AH, Mc Kay H, Keltz MD *et al.* (1998) Sonohystero-graphic screening before in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69: 841-4
6. Ayida G, Chamberlain P, Barlow D, Kennedy S (1997) Uterine cavity assessment prior to in vitro fertilization: comparison of transvaginal scanning, saline contrast hysterosonography and hysteroscopy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 10: 59-62
7. Kleinkauf-Houcken A, Hüneke B, Lindner C, Braendle W (1997) Combining B-mode ultrasound with pulsed wave Doppler for the assessment of tubal patency. *Hum Reprod* 12: 2457-60
8. Goldenberg M, Sivan E, Sharabi Z *et al.* (1995) Outcome of hysteroscopic resection of submucous myomas for infertility. *Fertil Steril* 64: 714-6
9. Prevedourakis C, Loutradis D, Kallianidis C *et al.* (1994) Hysterosalpingography and hysteroscopy in female infertility. *Hum Reprod* 9: 2353-5
10. Seifer DB, Messerlian G, Hogan JW *et al.* (1997) Day 3 serum inhibin B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 67: 110-4
11. Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH *et al.* (2005) Per-follicle measurements indicate that anti-müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinisation and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril* 84: 167-73
12. Watrelot A, Dreyfus JM, Andine JP, Nachury L (1999) Indications, technique et résultats de la fertiloscopie. Étude d'une série de 250 cas. *Reproduction humaine et hormones* 12, 2 : 212-8

N. Lédée

Réceptivité endométriale

Introduction

« L'implantation de l'embryon est-elle la dernière frontière de la procréation médicalement assistée ? ». Venant de Robert Edwards, « Père » il y a 30 ans du premier bébé-éprouvette, la question interpelle (1). C'est un fait, le taux moyen d'implantation des embryons conçus par FIV/ICSI reste faible, 20 % environ. Et cela ne facilite pas la mise en place de la seule mesure susceptible de réduire les grossesses multiples post-FIV : le transfert d'un seul embryon dans l'utérus, au lieu de deux en Europe, et trois ou quatre aux États-Unis. Dans ce cadre, une compréhension de la réceptivité utérine et plus largement du dialogue précoce de l'embryon avec l'endomètre est totalement essentielle. Il convient de souligner l'importance de l'hôte, la mère et son aptitude à recevoir l'embryon et à construire autour de lui la matrice nourricière nécessaire. L'objectif de la médecine de la reproduction n'est pas la grossesse mais la naissance d'enfants bien portants. L'analyse et le traitement des expressions anormales de l'environnement endométrial représentent ainsi une perspective d'avenir majeure en clinique courante.

Concept de fenêtre d'implantation Synchronisation et dialogue entre embryon et endomètre

Un transfert d'embryons échoue si l'utérus receveur n'est pas synchronisé à son embryon. En effet, le développement embryonnaire est directement soumis à l'environnement utérin. De même, les signaux embryonnaires modulent la différenciation de l'utérus adjacent en decidua basalis. C'est cette synchronisation qui définit la fenêtre d'implantation (2), une des phases les plus critiques de la FIV.

Il est paradoxal d'ailleurs de constater que, alors que l'implantation peut se produire dans n'importe quel tissu du corps humain (cas des grossesses extra-utérines spontanées, ou expérimentales), la plupart du temps sans aucune transformation préalable de ce dernier, l'endomètre, lui, est un des rares tissus dans lequel l'embryon ne peut pratiquement pas s'implanter excepté durant cette fenêtre implantatoire (3).

Au cours de cette période, l'endomètre offre une réceptivité maximale à l'embryon (4, 5). La durée de la fenêtre d'implantation est une caractéristique d'espèce. Chez la femme, on pense que cette fenêtre dure à peu près 4 jours, du jour 20 au jour 24 d'un cycle menstruel normal et donc de LH+7 à LH+11 (6).

Dans les dix dernières années, il a été montré que cette fenêtre d'implantation dépend en grande partie, sinon de façon quasi exclusive, de l'expression coordonnée de chimiokines, métalloprotéases, molécules d'adhésion et de l'expression utérine et placentaire de facteurs de croissance précoces (7), ainsi que de cytokines pro-inflammatoires, qui permettent les stades d'apposition puis d'adhésion, régulent l'invasion de la basale par le cône placentaire, puis permettent et régulent tant l'adhésion que l'invasion des cellules trophoblastiques dans l'endomètre (8-11).

Cette expression coordonnée est pour certains médiateurs totalement ou partiellement hormonodépendante et débute à l'ovulation quand la sécrétion estrogénique pure devient une sécrétion mixte estroprogestative. Sous l'effet de la progestérone, l'endomètre subit des modifications structurales et moléculaires, permettant à un embryon compétent de s'implanter au cours de cette fenêtre (12). Dans les espèces animales, la synchronisation peut être déclenchée de façon retardée : ainsi, pour l'un des modèles les plus étudiés, le vison d'Amérique synchronise au printemps le redémarrage des divisions embryonnaires post-blastocyste et la différenciation de l'utérus. Dans l'espèce humaine,

la fenêtre d'implantation reste très mal connue pour toute une série de raisons où dominent tant les problèmes techniques que les considérations éthiques.

En effet, aucun modèle *in vitro* humain n'est apte à reconstituer la complexité des interactions cellulaires dynamiques mettant en jeu les cellules épithéliales, stromales et les cellules immuno-compétentes présentes dans l'endomètre au cours de la fenêtre implantatoire pour reconstituer ainsi de façon satisfaisante le processus apposition-adhésion et invasion.

Enfin, si l'utilisation d'embryons humains à seules fins de recherche est envisageable sous couvert d'une réglementation stricte et sans objectif d'implantation, la pratique de biopsies utérines dans l'espèce humaine en période péri-implantatoire n'est pas envisageable.

Enfin, signalons que le seul modèle primate qui serait – quasi – totalement satisfaisant est représenté par le chimpanzé, dont on sait le statut d'espèce protégée, et les très grandes difficultés d'obtention, y compris pour des études aussi prioritaires que les vaccins contre le VIH-1.

Endomètre et décidualisation

La décidualisation initiée au cours de la phase proliférative est sous la dépendance des estrogènes, complétée nécessairement par la sécrétion de progestérone par le corps jaune en début de phase lutéale. On observe un amincissement de l'épithélium utérin et une transformation des cellules stromales de l'endomètre qui prennent une forme polygonale (cellules déciduales), se chargent de glycogène et expriment certains marqueurs spécifiques de la décidualisation comme la prolactine et l'IGF BP-1 et l' α -actine (13). La membrane basale ainsi que la matrice extracellulaire (MEC) subissent également des transformations structurales, concourant à faciliter la pénétration de l'embryon (changement des fibres de collagène au niveau de la membrane basale et augmentation de l'hydratation de la MEC et augmentation de la perméabilité des capillaires) (14). Enfin, l'endomètre est le siège d'une importante infiltration lymphoïde notamment les cellules *natural killer* (uNK) qui joue un rôle essentiel dans l'implantation (15, 16).

La néo-angiogenèse utérine concerne la transformation des artères utérines « classiques » en artères spiralées, générées comme branche de division/prolifération des artères utérines, qui véhiculeront le sang maternel vers les espaces intervillositaires du placenta. Leur croissance et leur structure sont sous la dépendance des sécrétions hormonales ovariennes, via un certain nombre de facteurs de croissance, mais aussi de molécules immuno-

logiques contrôlées essentiellement par les cellules NK utérines. Des anomalies concernant le nombre, l'activation des uNK ou leur sécrétion cytokiniques entraînent des anomalies de réceptivité utérine et des échecs d'implantations (17). Ces anomalies cytokiniques ont pour témoin clinique des Doppler utérins anormaux et des troubles de vascularisation endométriale (18, 19).

Hormones et réceptivité endométriale

Les stéroïdes sexuels sont essentiels pour la prolifération et la décidualisation de l'endomètre, le préparant ainsi à l'implantation embryonnaire. La montée préovulatoire de l'estradiol assure la mise en place des récepteurs à la progestérone, hormone indispensable à l'établissement de la gestation. La progestérone agit sur l'activité sécrétoire de l'endomètre assurant ainsi un milieu favorable au développement de l'embryon et à son implantation. La transformation induite par la progestérone en un endomètre sécrétoire est accompagnée d'une cascade d'expression de gènes qui vont faciliter ou, au contraire, limiter l'implantation embryonnaire. Les stéroïdes ovariens ont un rôle de médiateurs du dialogue embryo-utérin et modulent l'expression de nombreux facteurs de croissances, cytokines ou molécules d'adhésion à l'interface materno-fœtale. Parmi ces hormones, certaines semblent jouer un rôle fondamental comme la progestérone, les estrogènes mais aussi l'hCG, les inhibines, les activines, la relaxine, la calcitonine et le CRH. L'hCG est probablement une des toutes premières molécules complexes synthétisées par l'embryon. Elle participe de toute évidence au dialogue embryo-utérin.

Néanmoins, aucune de ces hormones ou de leurs récepteurs n'a été identifiée comme un marqueur de réceptivité utérine. L'étude des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone sur des biopsies d'endomètres pratiquées au moment de la ponction d'ovocytes n'a pas permis de différencier de manière prospective chez des femmes infertiles celles qui allaient implanter ou pas (20).

Notion de fenêtre d'implantation : changements développementaux dans l'endomètre

Durant la phase lutéale, une série de changements s'opère au niveau de différents compartiments, qu'il s'agisse de l'épithélium glandulaire et de surface, des cellules stromales, des vaisseaux ou de la matrice extracellulaire. Malheureusement, le microscope optique ou même électronique ne révèle aucune différence, au cours de la période péri-implantatoire, entre des femmes fertiles et

des patientes qui ne le sont pas. Depuis 1950, un système de datation très précis est utilisé en anatomopathologie pour dater au jour près l'endomètre suivant des critères morphologiques précis établi par Noyes (21). On définit alors s'il existe un décalage entre la datation chronologique et histologique de l'endomètre. L'endomètre exploré en phase lutéale est alors dit « en phase-in, phase - » ou « hors phase-out phase - », selon qu'il existe un décalage de plus de 3 jours entre la phase du cycle et son observation histologique. La relation entre ces changements morphologiques et la réceptivité utérine n'a pas été établie (22) et même tant l'utilité de cette datation que sa relation avec l'infertilité sont actuellement remises en cause.

Marqueurs de surface

Des pinopodes ont été décrits au pôle apical de la cellule épithéliale utérine pendant la période péri-implantatoire. Chez la femme normalement réglée, ces pinopodes apparaissent entre le jour 19-21 du cycle menstruel, soit au moment présumé de la fenêtre d'implantation (23). Plus particulièrement, ils ouvriraient cette fenêtre mais ne semblent pas être présents pendant toute sa durée. Leur apparition est strictement sous la dépendance de la progestérone. Leur demi-vie est de moins de 48 heures, avec des variations d'un patient à l'autre et selon les traitements hormonaux (24). La stimulation ovarienne semble accélérer leur apparition, alors que la substitution hormonale semble retarder leur apparition par rapport au cycle spontané. Il existe par ailleurs une corrélation entre le nombre de pinopodes et le taux d'implantation après transfert d'embryons. Le rôle exact des pinopodes n'est pas encore bien défini. L'apparition des pinopodes paraît liée au phénomène d'apposition du blastocyste à l'épithélium luminal de l'endomètre. Enfin, l'apparition des pinopodes semble coïncider avec d'autres événements moléculaires comme l'apparition des intégrines $\alpha\beta 3$ (25) ou la sécrétion de HB-EGF qui caractérise la phase lutéale moyenne (26). La variabilité d'apparition de ceux-ci d'un cycle à l'autre, la nécessité d'une biopsie en fenêtre implantatoire et le recours à la microscopie électronique limitent de fait la possibilité d'exploration en clinique courante.

La nature non adhésive de l'épithélium utérin est en partie attribuée à la couche de glycocalyx recouvrant la surface des cellules épithéliales. Une glycoprotéine du type mucine, la MUC-1, est exprimée à la surface des cellules épithéliales humaines et murines. Son expression est maximale au moment de l'implantation chez l'homme, alors qu'il est à son niveau minimum chez la souris au même moment. Chez la femme, l'expression de MUC-1 au niveau de

l'épithélium endométrial est progestérono-dépendante et augmente dès la fin de la phase proliférative pour être maximale en fenêtre d'implantation. Les récentes études *in vitro* de co-culture de cellules épithéliales et d'embryons humains ont révélé que, lors de la phase d'apposition, la présence de l'embryon augmente l'expression de Muc-1 au niveau des cellules épithéliales. Mais lorsque le blastocyste adhère aux cellules épithéliales, il existe une inhibition paracrine de Muc-1 au site d'implantation. Muc-1 est donc une molécule anti-adhésive qui peut être localement clivée par le blastocyste compétent en phase d'adhésion (27).

Intégrines

Les études de Lessey *et al.* ont montré l'importance des molécules adhésives appelées intégrines dans la définition de la fenêtre implantatoire (28). Les intégrines sont une famille de récepteurs de surfaces hétérodimériques constitués de deux sous-unités (les chaînes α et β). Elles sont sous-divisées en huit familles, selon leur sous-unité. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$ (récepteur au collagène) et $\alpha 5\beta 1$ (récepteur à la fibronectine) sont modulées par la progestérone : elles apparaissent en même temps que la production de progestérone et lorsque les récepteurs à la progestérone sont à leur plus grande concentration. Le récepteur à la vitronectine $\alpha v\beta 3$ apparaît quand la sécrétion de progestérone est à son maximum mais lorsque les récepteurs à la progestérone sont à leur plus faible concentration. Ces trois intégrines sont exprimées conjointement uniquement lors de la fenêtre d'implantation, c'est-à-dire de j20 à j24 (29). Des expressions aberrantes d'intégrines ont été décrites dans l'endomètre de femmes présentant des échecs d'implantation. Un intérêt particulier s'est porté sur l'intégrine $\alpha v\beta 3$ car celle-ci sert de récepteur à des ligands de la matrice extracellulaire et semble moduler les fonctions endométriales et embryonnaires. Des expressions aberrantes ou retardées ont ainsi été décrites chez des femmes porteuses d'hydrosalpinx et d'endométrieose (30). L'embryon humain semble apte à stimuler l'expression de l' $\alpha v\beta 3$ sur les cellules épithéliales de l'endomètre en culture et, ce, par l'intermédiaire entre autre de l'IL-1 (31). L'absence de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ reconnaissant la fibronectine du tissu fœtal trophoblastique pourrait induire une reconnaissance maternelle incomplète de l'embryon.

L'expression adaptée des intégrines à cette étape du processus implantatoire apparaît importante pour l'adhésion trophoblastique proprement dite mais également pour toute la signalisation qui en découle.

Exploration du milieu endoluminal utérin

Lors de cycle de FIV, il est possible d'explorer le milieu endoluminal utérin en aspirant les sécrétions endoluminales présentes. Ces études sont généralement faites au moment de la ponction d'ovocytes ou pour certaines avant le transfert ou encore en dehors de tout cycle de FIV en fenêtre implantatoire théorique. Pour analyser les résultats, il faut garder en mémoire la chronologie des séquences de réactions immunologiques locales physiologiques survenant au moment de l'ovulation et du coït puis en fenêtre de transfert, enfin en fenêtre implantatoire.

Dès le jour 1 suivant un coït ayant donné lieu à une fécondation effective, des lymphocytes et des macrophages affluent en grand nombre dans l'utérus. Les macrophages sont attirés par les signaux chimiotactiques émis par le liquide séminal et les cellules en train de mourir (spermatozoïdes, macrophages, lymphocytes recrutés sous l'impulsion du liquide séminal) et sont de fait chargés de nettoyer toutes les cellules mortes car un seul spermatozoïde survit de fait sur les millions introduits. Cette réaction présente toutes les caractéristiques d'une réaction inflammatoire classique contre les spermatozoïdes (8). À cette connaissance ancienne, s'ajoute celle développée plus récemment quant aux aspects positifs du liquide séminal sur le recrutement des cellules T-régulatrice endométriales. La manière dont se présente l'embryon progresse également. Au stade de son entrée dans la cavité utérine, il se comporte comme « un macrophage ». La première union embryon-mère est le phénomène d'apposition. Ce phénomène est une exception, un paradoxe biologique. Deux épithéliums ne s'apposent pas. La manière dont va se présenter l'épithélium luminal est essentielle. Il s'agit d'une réaction pseudo-inflammatoire qui a pour mission d'attirer l'embryon, faciliter son éclosion, puis permettre l'apposition et l'adhésion.

Fenêtre d'implantation et fenêtre de transfert

Il convient de différencier fenêtre d'implantation et fenêtre de transfert. En effet, la plupart des programmes de fécondation *in vitro* reposent sur un transfert d'embryons dans l'utérus au stade 4 à 8 cellules soit à j-2 ou j-3 après la fécondation. Cette fenêtre déterminée comme la fenêtre de transfert précède donc la fenêtre d'implantation de 2 à 4 jours.

Certaines équipes proposent de prolonger la culture embryonnaire *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste. Un des rationnels pour cette politique de transfert est de synchroniser ces deux fenêtres tout en s'assurant *in vitro* que l'activation génomi-

que de l'embryon a lieu (stade 8 cellules) et que le développement préimplantatoire embryonnaire est satisfaisant de manière à augmenter les taux d'implantation. Les détracteurs de ce courant s'appuient sur la nécessité de rétablir l'embryon le plus tôt possible dans son environnement physiologique, les conditions *in vitro* n'atteignant pas la perfection des conditions *in vivo*.

En utilisant une technique du « lavage ou flushing » utérin endoluminal, une documentation de l'expression protéique du milieu luminal est possible. C'est une procédure indolore qui permet d'étudier le milieu endoluminal dilué car on estime le fluide endoluminal chez la femme à 10 microlitres environ. La cellule épithéliale endométriale apparaît comme polarisée, avec une sécrétion apicale en direction de la lumière différente de celle en direction du stroma et des vaisseaux (32). Cette polarisation suggère un rôle spécifique des messages envoyés. Une étude récente utilisant la technique d'ELISA assay en multiplex sur bille couplée à une cytométrie de flux (Luminex) a permis de mettre en évidence que l'expression luminale chez des patientes enceintes au décours de la FIV était ciblée sur les principaux chémo-attractants des cellules uNK (MCP-1 et IP-10) et certaines cytokines de le TNF-alpha et l'IL-1beta soulignant l'importance d'une réactivité locale nécessaire (33). En termes finalistes, la mission utérine à ce stade est très clairement d'attirer l'embryon et de préparer sa matrice en conséquence. À partir de ce constat et en sachant que de plus en plus d'auteurs se posent la question d'un bienfait d'un geste utérin au moment de la ponction pour déclencher de manière effective la décidualisation, on pourrait imaginer se servir du flushing utérin pour détecter des profils inadéquats avant implantation, tout en ayant le délai nécessaire pour développer une approche thérapeutique visant à favoriser la rencontre. En utilisant la même méthode, mais une semaine plus tard en fenêtre implantatoire et en dehors de tout cycle de fécondation *in vitro*, nous avons en effet observé des expressions anormales pour des cytokines clés comme le LIF en cas d'échecs d'implantation (34). Cette recherche a révélé que la présence d'une vraie réaction inflammatoire empêchait l'établissement des acteurs de la tolérance materno-fœtale provoquée par la réaction pseudo-inflammatoire physiologique. En effet, cette première pseudo-réaction inflammatoire est suivie d'une puissante poussée anti-inflammatoire, c'est l'équilibre et la séquence de ces deux réactions d'apparence contradictoire qui permettent la mise en place des acteurs qui assureront l'angiogenèse nécessaire à la placentation. Certaines cytokines vont alors « nourrir et fortifier » le futur placenta (bases de l'immuno-trophisme).

Endomètre en fenêtre implantatoire et réceptivité inadéquate sur un plan immunologique

La compréhension des clés diagnostiques concernant la réceptivité utérine et plus largement le processus implantatoire ne peut se faire sans prendre en compte les acteurs et les particularités de l'immunité innée. L'endomètre, sa complexité cellulaire, les particularités uniques de l'antigénémie embryonnaire font de l'implantation un phénomène unique du vivant.

Le concept de tolérance materno-fœtale est en fait un dialogue materno-fœtal qui s'instaure dès les premiers moments de la vie, l'embryon étant au centre d'une « mer de cytokines ». L'implantation est un équilibre, il est particulier de l'individu et nécessite de ce fait une personnalisation du diagnostic et du soin. Ces cytokines seront à l'origine d'un dialogue continu entre conceptus (embryon et placenta) et le système immunologique maternel. La compréhension de cet équilibre subtil sera un des éléments de base dans la recherche d'un biomarqueur de réceptivité.

La cellule uNK va devenir le pivot cellulaire du processus implantatoire. En effet, le site d'implantation est infiltré par un très grand nombre d'uNK qui arrive en fenêtre implantatoire au niveau de l'endomètre. Chez les patientes en échec d'implantation, on peut très facilement faire un compte des cellules CD56⁺ en fenêtre implantatoire par immunohistochimie de routine. Il est en effet très fréquent de constater soit un excès, soit une déplétion dans des contextes pathologiques. L'environnement cytokinique dans lequel évolueront ces cellules uNK au contact du trophoblaste est probablement essentiel. Ainsi, dans ces contextes d'échecs implantatoires inexplicables, nous avons étudié le tripode IL-18/IL12/IL-15 censé représenter l'équilibre cytokinique nécessaire. L'échec d'implantation peut aussi bien résulter d'un défaut d'expression et/ou de sécrétion Th2 que d'un excès de sécrétion Th1 (17, 35). En effet, une sécrétion locale importante et conjuguée d'IL-12 et d'IL-18 suggère un excès cytotoxique et une activation des cellules uNK en véritables Killer (LAKs), qui de fait peut être une limite à l'invasion trophoblastique et être nocif pour l'embryon. À l'inverse, l'absence de sécrétion au niveau de l'endomètre suggère une absence de réactivité de la muqueuse utérine, réactivité pourtant nécessaire au phénomène d'apposition entre les épithéliums embryonnaire et utérin.

Les premières conséquences de ces déséquilibres sont vasculaires et sont dépisables par échographie. L'échographie avec angiographie digitalisée, nouvelle méthode non invasive, est la méthode la plus adaptée pour étudier l'angiogenèse endométriale. Nous avons donc combiné une exploration endométriale vasculaire par échographique en trois dimensions avec analyse digitale et une quantification par PCR

quantitative de l'expression des ARN messagers de l'IL-15, l'IL-18 et de l'angiopoïétine-2 en fenêtre implantatoire chez des femmes en échec d'implantation et des femmes fertiles (36). Le groupe fertile, au plan des données échographiques, est remarquable par le peu de variation des index de pulsatilité des artères utérines et du flux vasculaire endométrial. Le groupe en échec est lui hétérogène avec des variations considérables des paramètres, avec des cas d'absence de vascularisation endométriale ou des hypervascularisations locales probablement inflammatoires. La quantification de l'expression des ARNm de l'IL-15 et l'IL-18 était significativement différente entre les deux groupes et permettait de s'orienter dans certains cas sur des mécanismes précis. L'IL-15 par exemple est la cytokine à l'origine du recrutement des cellules utérines *natural killer* en fenêtre implantatoire (37) et le système IL-18 est relié au processus angiogénique (38). Le flux vasculaire endométrial est corrélé à l'expression des ARN messager de l'IL-15. Ceci suggère qu'une absence d'angiogenèse locale pourrait être la conséquence du non-recrutement local des cellules uNK nécessaire au processus implantatoire. Il existe une corrélation négative entre l'expression des ARN messagers du système IL-18 et l'index de pulsatilité des artères utérines. L'hypothèse ici est que l'absence de sécrétion d'IL-18 entraîne la non-déstabilisation physiologique des artères spiralées, préambule nécessaire pour leur invasion. Nous observons par le biais de la mesure de l'index de pulsatilité des artères utérines la conséquence de leur non-remodelage.

Enfin, l'imprégnation hormonale des hyperstimulations ovariennes peut aggraver des déplétions sous-jacentes. En effet, en utilisant toujours la quantification par PCR en temps réel, nous avons observé une baisse significative de l'IL-18 sous imprégnation hormonale en comparaison de l'expression en cycle naturel (39). Ceci suggère qu'une hyper-imprégnation hormonale (donc une hyperstimulation ovarienne) serait délétère au plan implantatoire chez des patientes ayant un profil de déplétion sous-jacente, mais au contraire serait potentiellement bénéfique chez des patientes ayant un profil en excès. Ainsi, en fonction du profil utérin, une adaptation du schéma de stimulation ovarienne semble nécessaire.

Développement embryonnaire pré-implantatoire et son environnement

Développement embryonnaire

La différenciation du trophoctoderme commence lors de l'entrée de l'embryon humain (stade morula de 12 à 16 blastomères) dans l'utérus, c'est-à-dire

trois ou quatre jours après la fécondation. Quand le blastocyste arrive au site d'implantation, il est probablement orienté de manière à mettre son pôle embryonnaire en contact avec l'épithélium utérin comme on le voit chez le primate évolué comme le macaque (40).

Le *hatching* ou dislocation de la zone pellucide quand l'embryon humain rentre en contact avec l'épithélium utérin survient vers le 5^e jour après fécondation. Une orientation incorrecte du blastocyste pourrait expliquer un certain nombre d'échecs précoces d'implantation.

Environnement embryonnaire

Les sécrétions folliculaires, tubaires et utérines jouent un rôle essentiel à la fois sur le développement embryonnaire et l'expression endométriale. Avant l'implantation proprement dite, un délai de 130 à 140 heures s'écoule.

Liquide folliculaire

Le liquide folliculaire participe aux étapes finales de maturation de l'ovocyte dans la trompe. Il contrôle, avant l'ovulation, les dernières modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui permettront à l'embryon d'effectuer ses synthèses protéiques au cours des premières étapes de division et de segmentation. Son rôle réel est finalement peu connu. De nombreux facteurs de croissance et cytokines sont présents dans les follicules prêts à ovuler. Le rôle de ceux-ci est encore largement méconnu. Néanmoins, des données récentes permettent de suspecter un rôle majeur de celui-ci dans la physiologie normale.

Dans une étude faite au sein du réseau EMBIC (Acronyme du réseau européen EMBryo Implantation Control), nous avons étudié les liquides folliculaires individuels tout en établissant une traçabilité du prélèvement avec la correspondance de l'embryon qui parviendra à la naissance d'un enfant. On peut donc par cette méthode établir un lien entre expression au sein de l'environnement ovocytaire et le futur potentiel de vie et d'implantation de cet ovocyte après fécondation.

Approcher la complexité du liquide folliculaire nous a fait choisir une exploration par Luminex qui permet simultanément de détecter 30 protéines par ELISA en multiplex (IL-1bêta, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN-alpha, TNF-alpha, G-CSF, GM-CSF, VEGF, PDGF, FGF, IP-10, MCP-1, RANTES, éotaxine, MIP-1-alpha, and MIP-1-bêta). Il

est à noter que sans cette approche multivariée intégrant la complexité du fluide étudié, nous n'aurions pas trouvé de biomarqueur car l'ELISA simple n'a pas la performance ni la sensibilité de l'approche Luminex.

Un seul biomarqueur apparaît comme significativement prédictif du potentiel implantatoire, le *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF). Ainsi, sur une cohorte de 132 embryons transférés, 45 auront un potentiel de naissance réduit évalué à 6 % (G-CSF < 20 pg/mL), 62 un potentiel de naissance à 15,6 % (20 < G-CSF < 24 pg/mL) et 25 un potentiel à 44 % (G-CSF > 24 pg/mL) (36). La notion même d'identification d'un biomarqueur dans le liquide folliculaire est une révolution pour les embryologistes et les cliniciens en termes de possibilités diagnostiques. La nature de ce biomarqueur ouvre également des perspectives. En effet, le G-CSF est un facteur bien connu des immunologistes, membre de la famille des « colony stimulation factor », c'est un facteur de croissance hématopoïétique (41). Son rôle principal est d'influencer la prolifération, la différenciation et l'activation de certaines cellules hématopoïétiques (42). Mais le G-CSF est également produit par certaines cellules du tractus reproductif comme les cellules folliculaires de la granulosa (43), les cellules endométriales (44), les cellules déciduales et placentaires (45) et différents tissus fœtaux (46).

Il est intéressant de voir que ce biomarqueur du potentiel implantatoire de l'ovocyte avant l'ovulation est décrit 10 jours plus tard, donc au moment de l'implantation proprement dite, comme augmentant dans le sérum en cas de grossesse en cycle naturel (47) et stimulé après FIV/ICSI (48). Le site de sécrétion cette fois est endométrial, décidual puis placentaire (44, 49). On observe donc une sécrétion en écho, ovarienne initialement, puis utérine secondairement.

Quel est le sens de ce message, où sont les rationnels des mécanismes ? Est-ce l'ovocyte lui-même, ou une action à distance du liquide folliculaire ? Très vraisemblablement les deux, de manière non exclusive et complémentaire. Nous n'en sommes qu'à l'étape de l'élaboration des hypothèses, mais leur énoncé propre ouvre de nouveaux horizons à la recherche. Ainsi, par exemple, le prétraitement par G-CSF recombinant de souris avant allogreffe augmente la prise de greffe et diminue les rejets en induisant un « Switch » à prédominance Th-2 et en mobilisant les cellules dendritiques tolérogéniques DC-2 (50). Le G-CSF entraîne la sécrétion d'IL-10 par les cellules T-régulatrices et, par cette action, augmente la tolérance en cas de transplantation (51). On peut spéculer que le niveau de G-CSF folliculaire nous donne une information essentielle sur l'ovocyte : son habilité au dialogue précoce avec son environnement.

Ce dialogue permettra la préparation d'un utérus réceptif, et cela avant même que l'embryon soit généré. L'hypothèse est que la qualité d'un ovocyte semble bien être sa capacité intrinsèque à préparer l'utérus et influencer sur l'ensemble de son environnement vers une voie de tolérance immunitaire.

Liquide tubaire

L'environnement tubaire n'est pas anatomiquement homogène. Les différentes portions anatomiques semblent avoir chacune leur sécrétion propre. L'environnement tubaire peut être, par ailleurs, localement modulé par la présence de l'embryon. Des messagers spécifiques sont émis, par l'embryon, pour réguler son entrée dans l'utérus (52). L'équilibre biochimique et immunologique ainsi que l'intégrité anatomique de l'oviducte sont aussi perturbés en cas d'agressions infectieuses ou inflammatoires (53).

Conclusion

La réceptivité utérine consiste donc en la mise en place des principaux acteurs qui participeront au processus implantatoire. La compréhension des mécanismes en cause nécessite d'intégrer qu'il s'agit d'un dialogue continu et évolutif qui s'établit dès les premiers moments de la vie. Le déchiffrement de ce dialogue, le développement d'outil diagnostique, la préparation personnalisée de la femme à l'implantation embryonnaire représentent un enjeu majeur pour l'avenir de la médecine de la reproduction.

Références

- Edwards RG (2006) Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online* 13: 887-904
- Bergh PA, Navot D (1992) The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 58: 537-42
- Psychoyos A (1973) Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam Horm* 31: 201-56
- Lessey BA (2000) Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 775-88
- Sunder S, Lenton EA (2000) Endocrinology of the peri-implantation period. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 789-800
- Acosta AA, Elberger L, Borghi M *et al.* (2000) Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril* 73: 788-98
- Evain-Brion D (1999) Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Suppl* 88: 12-6
- McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J Immunol* 148: 1699-705
- Chaouat G, Menu E, Delage G *et al.* (1995) Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *Hum Reprod* 10 Suppl 2: 55-9
- Chard T (1995) Cytokines in implantation. *Hum Reprod Update* 1: 385-96
- Tabibzadeh S, Babaknia A (1995) The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 10: 1579-602
- Aplin JD (2000) The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 757-64
- Fay TN, Grudzinskas JG (1991) Human endometrial peptides: a review of their potential role in implantation and placentation. *Hum Reprod* 6: 1311-26
- Getzenberg RH, Pienta KJ, Coffey DS (1990) The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocr Rev* 11: 399-417
- Tabibzadeh S (1990) Evidence of T-cell activation and potential cytokine action in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 645-9
- Wang C, Tanaka T, Nakamura H *et al.* (2003) Granulated metrial gland cells in the murine uterus: Localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. *Microsc Res Tech* 60: 420-9
- Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermine A, Durand-Gasselin I, Frydman R, Chaouat G (2004) A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 81: 59-65
- Ledee-Bataille N, Doumerc S, Olivennes F, Kadoch J, Chaouat G, Frydman R (2001) Contribution of diagnostic ultrasonography in cases of repeated embryonic implantation failure in fertilization in vitro. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 30: 747-52
- Ledee N, Chaouat G, Serazin V *et al.* (2008) Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 77: 57-62
- Bourgain C, Ubaldi F, Tavaniotou A, Smits J, Van Steirteghem AC, Devroey P (2002) Endometrial hormone receptors and proliferation index in the periovulatory phase of stimulated embryo transfer cycles in comparison with natural cycles and relation to clinical pregnancy outcome. *Fertil Steril* 78: 237-44
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J (1975) Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 122: 262-3
- Barash A, Czernobilsky B, Insler V, Borenstein R, Rosenberg M, Fink A (1992) Endometrial morphology and hormonal profiles in in vitro fertilization patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 44: 117-21
- Bentin-Ley U (2000) Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. *Hum Reprod* 15 Suppl 6: 67-73
- Nikas G, Drakakis P, Loutradis D *et al.* (1995) Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod* 10: 1208-13
- Damario MA, Lesnick TG, Lessey BA *et al.* (2001) Endometrial markers of uterine receptivity utilizing the donor oocyte model. *Hum Reprod* 16: 1893-9
- Stavreus-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, Eriksson H, Landgren BM, Hovatta O (2002) Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod* 8: 765-9

27. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P *et al.* (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 64: 590-601
28. Lessey BA (1994) The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 61: 812-4
29. Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ *et al.* (1996) Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 65: 477-83
30. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S *et al.* (1997) Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 12: 1393-8
31. Simon C, Martin JC, Meseguer M, Caballero-Campo P, Valbuena D, Pellicer A (2000) Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 55: 43-53
32. Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR (2005) Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* 20: 1439-46
33. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ *et al.* (2009) Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod* 1: 1-9
34. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G (2002) Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 17: 213-8
35. Ledee-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G (2005) Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil Steril* 83: 598-605
36. Ledee N, Lombroso R, Lombardelli L *et al.* (2008) Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 23: 2001-9
37. Kitaya K, Yamaguchi T, Honjo H (2005) Central role of interleukin-15 in postovulatory recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2932-40
38. Croy BA, Esadeg S, Chantakru S *et al.* (2003) Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J Reprod Immunol* 59: 175-91
39. Ledee N, Dubanchet S, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G (2006) Downregulation of human endometrial IL-18 by exogenous ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol* 56: 119-23
40. Sengupta J, Ghosh D (2002) Blastocyst-endometrium interaction at implantation in the rhesus monkey. *J Reprod Immunol* 53: 227-39
41. Clark SC, Kamen R (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229-37
42. Mielcarek M, Roeklein BA, Torok-Storb B (1996) CD14+ cells in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells induce secretion of interleukin-6 and G-CSF by marrow stroma. *Blood* 87: 574-80
43. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L (2004) Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 81 Suppl 1: 786-91
44. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG *et al.* (1995) Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod* 10: 3259-63
45. Miyama M, Umesaki N, Kawabata M (1998) Identification of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) producing cell population in human decidua and its biological action on trophoblast cell. *Osaka City Med J* 44: 85-96
46. Calhoun DA, Donnelly WH Jr, Du Y, Dame JB, Li Y, Christensen RD (1999) Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res* 46: 333-8
47. Yanagi K, Makinoda S, Fujii R *et al.* (2002) Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Hum Reprod* 17: 3046-52
48. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S *et al.* (2005) Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 20: 2434-40
49. Duan JS (1990) Production of granulocyte colony stimulating factor in decidual tissue and its significance in pregnancy. *Osaka City Med J* 36: 81-97
50. Pan L, Delmonte J Jr, Jalonon CK, Ferrara JL (1995) Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 86: 4422-9
51. Morris ES, MacDonald KP, Rowe V *et al.* (2004) Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood* 103: 3573-81
52. Barnea ER (2001) Embryo maternal dialogue: From pregnancy recognition to proliferation control. *Early Pregnancy* 5: 65-6
53. Dalton T, Kover K, Dey SK, Andrews GK (1994) Analysis of the expression of growth factor, interleukin-1, and lactoferrin genes and the distribution of inflammatory leukocytes in the preimplantation mouse oviduct. *Biol Reprod* 51: 597-606

N. Chabbert-Buffet

Infertilités endocriniennes féminines en dehors du syndrome des ovaires polykystiques

Introduction

Les causes endocriniennes en dehors du syndrome des ovaires polykystiques représentent une relativement faible proportion des causes d'infertilité féminine. Elles rentrent dans le cadre des troubles ovulatoires, qui correspondent à 30 % des causes féminines d'infertilité. Cependant, parmi ces dysovulations, la plus grande part est en relation avec un syndrome des ovaires polykystiques dont la fréquence *dans la population générale* est évaluée de 4 à 26 % selon la population étudiée et les critères diagnostiques utilisés (1). Parmi les femmes ayant une infertilité d'origine endocrine, il représente 80 % des cas (2).

Ces pathologies, qui représentent donc environ 6 à 7 % des causes d'infertilité féminine, sont pourtant importantes à connaître. En effet, certaines sont responsables de l'infertilité du couple, leur prise en charge – lorsqu'elles sont isolées – est souvent simple et peu délétère (par exemple traitement d'une hyperprolactinémie dans le cadre d'un microadénome à prolactine), et donc prioritaire. Certaines d'entre elles peuvent également entrer dans un cadre pathologique nécessitant un bilan avant la grossesse (par exemple : bilan cardiologique et rénal du syndrome de Turner). Parfois également, il existe une association de causes à l'infertilité et la question de la prise en charge spécifique de l'anomalie endocrine peut se poser (par exemple : faut-il traiter l'hyperprolactinémie liée à un microadénome hypophysaire, si par ailleurs une indication de FIV existe ?). Enfin, certaines anomalies endocrines, sans être directement ou exclusivement responsables de l'infertilité, sont découvertes dans le bilan et peuvent nécessiter une adaptation de la prise en charge (par exemple : il existe une hypothyroïdie, quels sont les objectifs thérapeutiques spécifiques en cas de désir de grossesse).

C'est donc dans le cadre d'un pronostic englobant non seulement la fertilité mais aussi la grossesse à venir, tant sur le plan fœtal que maternel, que ces pathologies sont envisagées dans ce chapitre. La prise en charge permettant une issue positive du traitement de l'infertilité doit en effet être globale, et par là même souvent pluridisciplinaire.

Physiopathologie, bilan initial et classification des infertilités endocriniennes

L'infertilité d'origine endocrine a pour mécanisme une anovulation ou une dysovulation, révélée par un trouble des cycles ou par l'infertilité elle-même. Le trouble des cycles, voire une aménorrhée, a pu être masqué par un traitement estroprogestatif, prescrit pour « régulariser les cycles ». Si le bilan n'a pas été réalisé avant la prise de ce traitement, le problème diagnostique se posera à nouveau à l'arrêt de la pilule, lors de la consultation pour désir de grossesse. La recherche d'une anovulation doit être menée y compris chez les femmes ayant des cycles réguliers car chez 10 % d'entre elles on retrouvera des cycles anovulatoires (3).

L'anovulation/dysovulation est recherchée classiquement par la réalisation d'une courbe ménothermique, qui montre normalement un décalage thermique survenant juste après l'ovulation (qui correspond donc au point le plus bas de la courbe ou nadir). C'est la méthode conseillée de première intention par l'ANAES (4). Toutefois, la contrainte et les aléas présentés par cette technique peuvent lui faire préférer le dosage de la progestérone en phase lutéale (j22-j24). Une valeur inférieure à 3 ng/mL est admise comme signant une anovulation certaine (5). La valeur normale en phase lutéale varie de 5 ng/mL au minimum plusieurs jours de suite (6) à 10 ng/mL au minimum si un seul dosage est réalisé. Entre anovulation et ovulation normale se situe le domaine de la contestée insuffisance lutéale (7), qui est également décrite lorsque le plateau de la courbe ménothermique est trop court, instable ou atteint trop lentement. Dans le contexte de l'infertilité, un tel profil fera poser l'indication d'un traitement inducteur de l'ovulation.

Le bilan étiologique initial d'une dysovulation/anovulation comporte, outre les données d'anamnèse personnelle et familiale et l'examen clinique, des dosages hormonaux et une échographie pelvienne.

Le bilan hormonal doit être mené en dehors de tout traitement hormonal (sous pilule, souvent utilisée pour la maturation pubertaire ou le rétablissement

des cycles, le bilan montrerait chez toute femme FSH et LH effondrées et estradiol bas). Il est réalisé au troisième jour d'un cycle naturel ou après induction des règles par un traitement progestatif de 10 jours, ou après 6 semaines d'aménorrhée. Il inclut un dosage de FSH, de LH, d'estradiol, de prolactine, et de testostérone dans le cadre de l'anovulation/dysovulation.

Les dosages d'inhibine B et d'AMH sont largement utilisés par ailleurs dans le cadre de l'infertilité pour évaluer la réserve ovarienne. Le dosage d'AMH n'est pas remboursé actuellement par la sécurité sociale et facturé 40 à 50 euros. La valeur de ces différents marqueurs biologiques de la réserve ovarienne est encore en cours d'évaluation (voir chapitre 17).

En cas d'hyperandrogénie biologique, le dosage de la 17-hydroxyprogestérone de base est demandé secondairement, en général pour éliminer un déficit en 21-hydroxylase et confirmer le diagnostic de syndrome des ovaires polykystiques (8).

L'échographie pelvienne est réalisée par voie vaginale et abdominale. Elle permet l'étude du volume ovarien et le compte folliculaire antral et contribue ainsi à évaluer la réserve ovarienne. Elle permet également une évaluation utérine et tubaire initiale.

Le reste du bilan d'infertilité (spermiologie et exploration tubaire et utérine) reste indispensable dans tous les cas. Enfin, le test de Huhner, dont la valeur est controversée, est souvent perturbé ou difficile à programmer chez les patientes anovulatoires ou dysovulatoires (9). Il n'est parfois réalisable ou interprétable qu'au cours d'un traitement, adapté en fonction de la cause de dysovulation, permettant de rétablir la mécanique ovulatoire.

Les dysovulations ont été classées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en OMS type I (anovulations d'origine hypothalamo-hypophysaire), OMS type IIa (dysovulation d'origine ovarienne ne remplissant pas les critères de diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques), OMS type IIb (dysovulations d'origine ovarienne remplissant ces critères), et OMS type III (insuffisance ovarienne). Les résultats des différents éléments du bilan en fonction du type d'anovulation sont résumés dans le tableau I.

Hypogonadismes hypogonadotropes

Diagnostic positif et étiologique, bilan commun

Le diagnostic est évoqué en général devant une femme présentant une anovulation (en général avec aménorrhée), chez qui l'on constate une carence estrogénique plus ou moins marquée en présence de taux de gonadotrophines non élevés. La carence estrogénique peut se traduire par un impubérisme dans les formes (souvent congénitales) les plus marquées. Au contraire, dans les formes frustes, en général d'origine fonctionnelle (sélection alimentaire et hyperactivité par exemple), mais également congénitale (mutations peu délétères du récepteur de la GnRH par exemple), le tableau peut être très incomplet et mimer alors une dysovulation OMS type IIa.

Le test au progestatif peut alors être réalisé chez une femme en aménorrhée (sous réserve qu'un obstacle à l'écoulement des règles ait été éliminé en cas d'aménorrhée primaire). L'absence de saignement à l'arrêt d'un traitement progestatif de 10 jours (par la dydrogestérone 20 mg/j par exemple) signe une carence en estrogènes permanente.

Le bilan hormonal montrera donc un taux d'estradiol généralement bas sans élévation de la FSH. Le dosage de prolactine permet ensuite d'orienter le diagnostic en cas d'élévation. Dans le cas contraire, le test à la GnRH (qui nécessite une injection de GnRH et mobilise la patiente 2 h pour les prélèvements dosages de FSH et de LH) peut être réalisé. Il n'est informatif que s'il est positif (élévation de la FSH de 1,5 à 2 fois et de la LH de 3 à 4 fois) confirmant l'intégrité de l'hypophyse et l'origine suprahypophysaire du trouble. En cas de négativité du test, deux cas possibles : l'atteinte est hypophysaire, ou il existe un hypogonadisme d'origine suprahypophysaire prolongé et profond. La stimulation brève du test à la GnRH n'est alors pas suffisante pour induire une réponse hypophysaire. Celle-ci peut alors parfois être observée après un cycle (au minimum) de stimulation pulsatile par la GnRH à l'aide d'une pompe, ce qui

Tableau I – Bilan hormonal en fonction du type d'anovulation selon l'OMS.

	OMS I (Déficit gonadotrope)	OMS IIa (Dysovulation)	OMS IIb (SOPK)	OMS III (Insuffisance ovarienne)
FSH	N ou diminuée	N	N	Augmentée
LH	N ou diminuée	N	N ou augmentée	Augmentée
E2	Diminué	N		Diminuée
Testostérone	N ou diminuée	N	N ou augmenté	Diminuée ou augmentée
Échographie (CFA)	N ou augmenté	N ou augmenté	N ou augmentée augmenté	Diminuée

CFA : compte folliculaire antral.

n'est pas réalisé à visée diagnostique en routine. En pratique, le diagnostic d'atteinte hypothalamique est fait sur l'anamnèse, l'absence de pathologie hypophysaire à l'IRM, et éventuellement *a posteriori* le rétablissement de cycles ovulatoires sous GnRH pulsatile (10).

La découverte d'un HH impose un bilan des autres axes antéhypophysaires en particulier et au minimum l'axe thyroïdienne. L'exploration de l'axe thyroïdienne doit comporter obligatoirement un dosage de TSH et de T4L, le diagnostic de déficit thyroïdienne reposant sur la constatation d'une T4L basse et d'une TSH non augmentée. Le monitoring du traitement substitutif par L thyroxine repose donc également sur les dosages de T4L. L'axe corticotrope doit également être exploré. Les déficits thyroïdiens et corticotropes doivent être corrigés avant toute prise en charge de l'infertilité.

Enfin, la découverte d'un HH implique obligatoirement une imagerie hypophysaire par IRM à la recherche d'un processus tumoral.

Bilan d'infertilité en cas d'hypogonadisme hypogonadotrope

Il peut être spécifique dans son interprétation. Les dosages de base de FSH et d'estradiol en cas de déficit complet sont bien sûr d'un apport nul. Le dosage d'AMH est d'après les données actuelles très peu variable en fonction du cycle, il n'est pas modifié lors d'un blocage de l'axe gonadotrope à court ou moyen terme par analogues de la GnRH (11), estroprogestatif (12), ou encore au cours de la grossesse (13), peu de données sont disponibles sur les taux d'AMH en cas d'HH profond ancien. La stimulation permet parfois de voir s'élever les taux d'AMH en cours de stimulation dans ces cas précis. Enfin, rappelons que des grossesses ont été décrites chez des femmes ayant pourtant un taux d'AMH effondré (14). La corrélation des dosages hormonaux avec le compte folliculaire antral et les données cliniques peut permettre de mieux approcher la réserve ovarienne (15).

Le compte folliculaire antral peut également montrer une augmentation du pool des follicules antraux qui doit faire suspecter un syndrome des ovaires polykystiques « masqué » par l'HH qui se révélerait sous la forme d'un développement multifolliculaire en stimulation simple par la GnRH pulsatile ou les gonadotrophines, ou d'une hypersimulation potentiellement grave dans le cadre d'une stimulation pour FIV (16). Le protocole de stimulation et de surveillance doit alors être adapté à la fois au statut d'HH (cf. infra) et au statut de PCOS (cf. chapitre 16).

Causes des HH, bilans spécifiques et pronostic

Les causes d'HH peuvent être acquises ou congénitales, mais à cette dichotomie ne correspond pas la dichotomie clinique hypogonadisme primaire ou secondaire. Les HH d'allure congénitale, avec impubérisme, peuvent être en relation avec une cause acquise, par exemple tumorale. À l'inverse, les hypogonadismes congénitaux peuvent être de révélation post-pubertaire, et correspondent à des expressions partielles de la pathologie, en lien avec des mutations peu délétères du gène codant pour la protéine considérée.

Les hypogonadismes hypogonadotrophiques sont le plus souvent liés à des causes acquises. Celles-ci sont fonctionnelles, tumorales ou infiltratives et elles sont résumées par niveau d'atteinte dans la figure 1. Une fois le bilan initial commun à tout HH réalisé, certaines causes doivent également faire réaliser un bilan spécifique qui doit être présent dans le dossier avant prise en charge de l'infertilité. Rappelons qu'en cas de déficit thyroïdienne ou corticotrope associés, ceux-ci doivent être corrigés également avant la prise en charge de l'infertilité.

Les hypogonadismes hypogonadotrophiques fonctionnels, ou encore nutritionnels, sont des causes fréquentes d'HH. Le profil caricatural de l'anorexie mentale ne pose pas de problème diagnostique particulier. Les formes atténuées, comportant une simple sélection alimentaire avec surconsommation de fibres et sous consommation de lipides, peuvent être plus difficiles à mettre en évidence. Un bilan diététique approfondi est nécessaire, pour confirmer le diagnostic et rechercher des carences, notamment en folates et iode. En fonction du terrain, un bilan psychologique voire psychiatrique est nécessaire. En effet, des difficultés peuvent être à craindre pour l'enfant à venir, la relation à la nourriture de sa mère pouvant aller jusqu'à induire une réelle maltraitance alimentaire de l'enfant. Par ailleurs, la prise en charge de l'infertilité doit s'inscrire, pour les femmes présentant une forme modérée ou améliorée avec un BMI dont le seuil n'est pas fixé de manière consensuelle (à 18 kg/m² au minimum), dans le cadre d'un contrat de poids pour limiter les complications obstétricales (17).

Les femmes soumises à un stress chronique, notamment sous forme de perturbation des cycles de sommeil en travail posté ou chez le personnel navigant aéronautique (18), présentent des tableaux similaires aux HH fonctionnels.

L'hémochromatose (le plus souvent post-transfusionnelle) nécessite en particulier un bilan hépatique (test de fibrose, fonction hépatique, recherche d'un carcinome hépatocellulaire), cardiaque (insuffisance cardiaque, y compris infraclinique, qui pourrait compliquer la grossesse à venir) et endocrinologique (glycémie, fonction thyroïdienne).

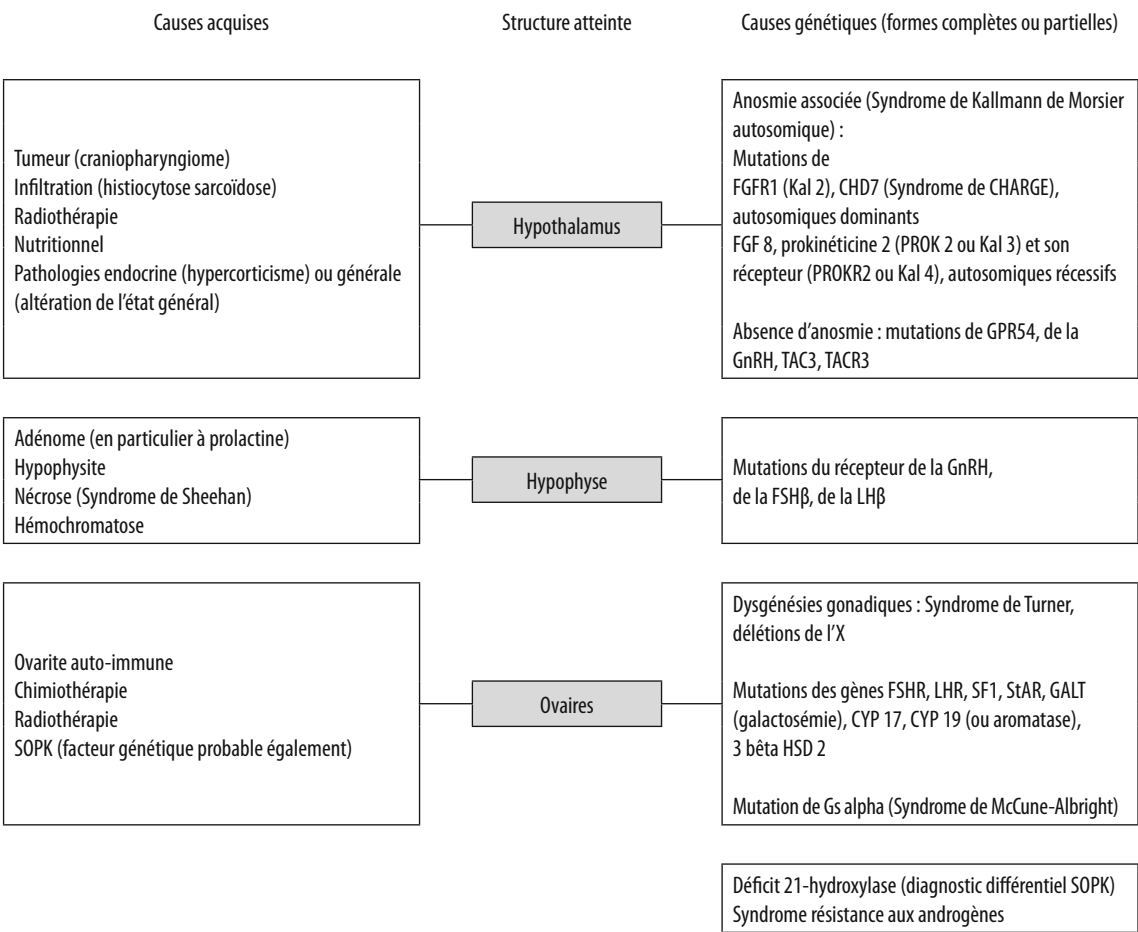


Fig. 1 – Causes de dysovulation/anoovulation.

Les autres causes infiltratives plus rares ou tumorales nécessitent également un bilan spécifique et une prise en charge adaptée avant prise en charge. L'hyperprolactinémie et sa prise en charge sont détaillées dans un paragraphe spécifique.

Les différentes causes d'HH congénital, beaucoup plus rares, sont résumées dans le tableau II en fonction du type d'atteinte. On distingue les HH congénitaux avec anosmie (syndrome de Kallmann) ou sans anosmie. L'anosmie peut être évidente cliniquement ou plus difficile à mettre en évidence. L'histoire familiale peut également permettre d'orienter le diagnostic. En cas de suspicion, une olfactométrie doit être réalisée pour confirmation. L'IRM pourra alors montrer également une atrophie des bulbes olfactifs.

Les syndromes de Kallmann chez la femme sont liés aux mutations des gènes FGF8 (*fibroblast growth factor 8*), FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) transmises sur un mode autosomique dominant à pénétrance variable, PROKR2 (*prokineticin receptor 2*), PROK2 (*prokineticin 2*), transmises sur un mode autosomique récessif. Elles peuvent alors être présentes à l'état hétérozygote, hétéro-

zygote composite ou homozygote. Enfin, des cas de digénisme (association de mutations d'un gène sur un allèle, et d'un autre gène sur l'autre allèle) ont été décrits. Les mutations du gène Kal 1 (gène de l'anosmine porté par le chromosome X) ne s'expriment pas chez la femme (19).

Certaines de ces mutations peuvent être associées à des malformations qui impliquent la réalisation d'un bilan, en particulier pour les gènes à transmission autosomique dominante. Les mutations de FGFR1 induisent des troubles neurologiques notamment des syncinésies, des fentes nasale ou palatine, des agénésies du cartilage nasal, ou encore rarement une surdité et doivent être recherchées en raison du risque de transmission à l'enfant à venir. Un conseil génétique doit être proposé le cas échéant, en tenant compte notamment de la forte variabilité d'expression phénotypique, y compris dans une même famille.

Les hypogonadismes hypogonadotrophiques congénitaux sans anosmie sont dus aux mutations des gènes de la GnRH, du récepteur de la GnRH, ou GPR54 (*G protein coupled receptor 54*). Elles sont également transmises sur un mode autosomique

récessif. Il n'existe pas de syndrome polymalformatif associé à ces mutations décrit à ce jour.

La classification de Leyendecker des HH d'origine hypothalamique peut être utilisée pour guider la stratégie thérapeutique (20). Elle est basée sur la profondeur du déficit gonadotrope (tableau II) à partir de différents tests pharmacologiques. Tous ne sont pas systématiquement réalisés si la profondeur du déficit semble d'emblée importante. Les stades peu profonds d'HH peuvent bénéficier d'un traitement pas le citrate de clomifène. En cas de stade plus profond (stade 2 ou 3), une pompe à GnRH est l'indication la plus logique (21). L'administration de GnRH peut être réalisée par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Cette dernière solution est plus contraignante en raison de la nécessité, notamment, d'hépariner le cathéter et elle comporte un risque septique. Les femmes sont éduquées à manipuler la pompe, le monitoring comporte à j7 une échographie et un dosage d'estradiol, renouvelé en fonction de l'évolution. Après l'ovulation, il est nécessaire d'assurer le maintien du corps jaune, soit par le maintien de la pompe, soit par injections d'hCG une fois par semaine, ou encore d'administrer de la progestérone. Une fois le diagnostic de grossesse fait, un traitement par progestérone est débuté, ou poursuivi, la voie d'administration, les doses et les durées restent non consensuelles (par exemple : 400 mg par jour en deux prises par voie vaginale, jusqu'à la fin du premier trimestre).

Le traitement par la GnRH pulsatile peut être mal accepté par les femmes, les gonadotrophines peuvent alors également être utilisées (20, 22). Dans le cas des HH, FSH et LH doivent être associées, avec un équivalent-dose de LH de 75 UI par jour (23). L'hMG a une efficacité réduite par rapport à la GnRH (20), et induit un risque de grossesse multiple plus élevé. L'association de deux gonadotrophines recombinantes est également possible mais plus lourde et coûteuse. La seule association de FSH et de LH recombinante disponible actuellement est dosée à 75 UI de LH et 150 IU de FSH.

En cas d'atteinte hypophysaire, seule la stimulation par gonadotrophines peut être proposée, selon les modalités décrites ci-dessus.

Les hypogonadismes congénitaux avec impubérisme peuvent se traduire par un utérus très hypotrophique (24) si la maturation pubertaire, par estroprogestatifs par exemple, n'a pas été conduite (25). Ces patientes peuvent alors bénéficier de trois mois de traitement hormonal dans ce but (24). On peut également voir maturer ces utérus en cours du cycle de stimulation ovarienne et le développement gravidique se fait normalement (26).

Le pronostic de ces infertilités est excellent, les taux de grossesse à 12 mois étant équivalents à ceux de la population générale après traitement par la GRH pulsatile par exemple.

Tableau II – Classification de Leyendecker, en fonction de la profondeur de l'hypogonadisme hypogonadotrophique hypothalamique.

Stades	Test au citrate de clomifène	Test aux progestatifs	Test à la GnRH
1	+	+	+
2	-	+	+
3a	-	-	+ et normal
3b	-	-	+ et prépubère
3c	-	-	-

Hyperprolactinémies

La constatation d'une hyperprolactinémie est fréquente dans un bilan d'infertilité. L'hyperprolactinémie peut entraîner un hypogonadisme hypogonadotrophique, de profondeur variable, par son action directe sur les neurones à GnRH. Elle peut également être sans rôle direct dans l'infertilité, voire être artéfactuelle.

La première difficulté réside dans la définition d'un chiffre seuil au-delà duquel mener un bilan. Il est convenu de faire dans un premier temps un bilan après un second dosage de confirmation, si possible utilisant un kit de dosage différent. Par ailleurs, les conditions de réalisation du dosage ont évolué au cours des dernières années avec l'amélioration des méthodes de dosage. Il n'est plus nécessaire de réaliser des dosages sur un pool de prélèvements échelonnés dans le temps, de faire le dosage à jeun, ou strictement en début de cycle (27). Toutefois, la prolactine augmente significativement en période ovulatoire, période à éviter de préférence.

Une fois l'hyperprolactinémie confirmée, il n'existe pas de valeur seuil consensuelle devant entraîner un bilan. Le risque de diagnostiquer un adénome à prolactine est classiquement corrélé au taux plasmatique de prolactine, avec un risque de 50 % au-delà de 100 ng/mL (microadénome en général) et 85 % au-delà de 150 ng/mL (macroadénome en général). Toutefois, les tumeurs suprahypophysaires, parfois volumineuses et menaçantes, sont responsables d'une levée du frein dopaminergique et donc d'une hyperprolactinémie, et entraînent en général des élévations modérées autour de 40 ng/mL. Un taux modéré ne doit donc pas être systématiquement rassurant. À l'inverse, une hyperprolactinémie modérée peut être associée au syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) en raison de l'hyperestrogénie. Une hyperprolactinémie à 30 ng/mL chez une femme porteuse d'un SOPK ne fait en général pas envisager un bilan étiologique complet de l'hyperprolactinémie en l'absence de tout autre point d'appel clinique. L'intérêt des tests de stimulation par la TRH ou le métoclopramide est limité aux cas difficiles.

En dehors du SOPK, d'autres causes d'hyperprolactinémie doivent être recherchées par l'anamnèse et l'examen clinique, avant de réaliser un bilan étiologique. Les causes médicamenteuses viennent au premier rang (27) (tableau III). Certains neuroleptiques comme l'amisulpride ou Solian® peuvent entraîner une hyperprolactinémie importante (150 ng/mL ou au-dessus). Comme il est souvent difficile de faire la preuve de l'origine médicamenteuse dans ces cas où le sevrage médicamenteux est problématique, l'attitude consensuelle est de réaliser une IRM hypophysaire de référence pour écarter toute anomalie associée (28). Le traitement de l'hyperprolactinémie sous neuroleptiques ne peut pas faire appel aux agonistes dopaminergiques en raison des interférences entre les deux thérapeutiques.

L'hypothyroïdie profonde est une cause rare d'hyperprolactinémie. Elle est en général cliniquement décelable dans ce cas, le dosage de la TSH systématique recommandé dans le bilan d'infertilité selon le consensus international (29) mais non retenu en France (30) redressera le diagnostic dans les autres cas. L'insuffisance rénale ou hépatocellulaire sévère est une autre cause d'hyperprolactinémie décelée à l'anamnèse. Enfin, les macroprolactinémies peuvent donner des dosages de prolactine élevés, en général sans aucun retentissement sur le cycle, ce qui ne les empêche pas d'être découvertes dans le bilan d'infertilité si la prolactinémie est dosée systématiquement. Vingt pour cent des hyperprolactinémies pourraient être liés à la présence de ces agglomérats de molécules de prolactine (31). Le diagnostic est redressé par la pratique d'une chromatographie ou, de manière plus simple mais moins fiable, par la réalisation d'un test au polyéthylène glycol (31).

Une fois les diagnostics différentiels écartés, la réalisation d'une IRM hypophysaire s'impose (28). Elle peut montrer (en coupe coronale T1) une

image hypo-intense ne prenant pas le contraste. En fonction de la taille de cette image, on parle alors de microadénome (< 10 mm de diamètre, 80 % des adénomes à PRL) ou de macroadénome (≥ 10 mm de plus grand axe, 20 % des adénomes à PRL). En cas de macroadénome menaçant les structures de voisinage (chiasma optique ou sinus caverneux), un bilan ophtalmologique est nécessaire. Un bilan hormonal à la recherche d'une atteinte fonctionnelle des autres axes antéhypophysaires, en particulier thyrotrope et corticotrope (voir paragraphe Hypogonadisme hypogonadotrophique). En cas de microadénome, il n'est pas nécessaire de mener un tel bilan en l'absence d'anomalie clinique.

Macroadénomes et microadénomes peuvent également être mixtes et entraîner une sécrétion d'hormone de croissance, qui conditionne la prise en charge et le pronostic. Cette hypersécrétion peut être dépistée par un dosage d'IGF1 (le médiateur de la GH produit par le foie) qui sera élevé le cas échéant.

Macroadénomes et microadénomes peuvent enfin s'intégrer (avec une fréquence non connue mais faible *a priori*) dans une néoplasie endocrinienne multiple de type 1, dont la manifestation la plus courante est l'hyperparathyroïdie primaire, responsable d'une hypercalcémie. Celle-ci est facile à dépister par la recherche d'antécédents familiaux ou personnels de coliques néphrétiques et par le dosage de la calcémie au moindre doute. Le traitement éventuel d'une telle anomalie est important avant d'induire une grossesse, en raison du risque de pancréatite aiguë gravidique notamment.

Le traitement des adénomes à prolactine repose dans tous les cas sur les agonistes dopaminergiques en première intention (27). En cas de macroadénome, il est indispensable de mettre en place une contraception jusqu'à la fin du bilan pour éviter de faire débuter une grossesse dans un contexte défavorable. Cette contraception ne doit pas être estroprogestative.

Tableau III – Médicaments inducteurs d'hyperprolactinémie.

Tous les neuroleptiques (antidopaminergiques)	• Phénothiazines (par exemple : Largactil®) • Butyrophénones (par exemple : Haldol®) • Thioxanthènes (par exemple : Fluanxol®) • Benzamides (par exemple : Dogmatil®, Primpéran®, Vogalène®, Motilium®, Sibelium®)
Certains antidépresseurs	• Tricycliques (par exemple Anafranil®) • Inhibiteurs spécifiques du recaptage sérotoninergique (par exemple Floxifral®)
Opiacés	
Tranquillisants	• Benzodiazépines (par exemple Valium®) • Carbamates (par exemple Equanil®)
Certains antiépileptiques	• Phénobarbital® • Tégrétol® • Dihydan®
Certains antihypertenseurs	• Aldomet® • Contenant de la réserpine (par exemple : Tensionorme®)
Antiulcéreux anti-H2	Cimétidine ou Tagamet®
Estroprogestatifs	

La molécule à utiliser de première intention pour traiter l'hyperprolactinémie dans un contexte de désir de grossesse est la bromocriptine (Parlodel®, Bromokin®) en prise quotidienne. Cette molécule a une AMM validée pendant la grossesse. Toutefois, il s'agit d'un dérivé de l'ergot de seigle, pour lesquels l'Agence européenne du médicament (EMA) a recommandé en 2009 de réaliser une échocardiographie en cas d'usage prolongé plus de 6 mois en raison du risque de fibrose cardiaque (mais aussi rétropéritonéale notamment). La bromocriptine est débutée à dose progressive en raison des sensations vertigineuses et des troubles tensionnels qu'elle induit. La tolérance est incomparablement meilleure si les comprimés sont administrés par voie vaginale, avec une efficacité thérapeutique conservée (32, 33). La cabergoline (Dostinex®), en prise hebdomadaire et mieux tolérée que la bromocriptine, n'a pas d'AMM validée pendant la grossesse, et cette notion a été rappelée en 2009 par l'EMA. C'est également un dérivé de l'ergot de seigle, plus grand pourvoyeur de fibrose que la bromocriptine. Le troisième composé commercialisé, la quinagolide (Norprolac®), n'est pas un dérivé de l'ergot de seigle, mais n'a pas d'AMM pendant la grossesse.

Lorsque l'hyperprolactinémie est seule en cause dans l'infertilité, le pronostic est excellent avec des taux de conception à 12 mois équivalents à ceux de la population générale une fois contrôlée l'hyperprolactinémie. En cas de microadénome, le traitement agoniste dopaminergique est interrompu dès le diagnostic de la grossesse et la surveillance est clinique. En cas de macroadénome, le traitement est poursuivi et la surveillance multidisciplinaire, clinique et paraclinique, doit être organisée.

Lorsqu'il existe une autre cause d'infertilité nécessitant un recours à l'AMP, faut-il traiter l'hyperprolactinémie ? En cas de macroadénome, le traitement agoniste dopaminergique permet le contrôle du volume tumoral et doit être poursuivi. En cas de microadénome, dans la mesure où l'anovulation va être résolue par la stimulation ovarienne, l'interruption du traitement agoniste dopaminergique est souhaitable. Il n'y a pas d'arguments dans la littérature pour dire que l'hyperprolactinémie ait un impact (notamment endométrial) qui pourrait réduire les chances de succès de l'AMP. Au contraire, certains auteurs ont même démontré une amélioration des taux d'implantation en cas d'hyperprolactinémie induite par la stimulation (34).

Insuffisances ovariennes prématurées

Les insuffisances ovariennes prématurées (IOP) représentent 4 à 18 % des aménorrhées primaires et 10 à 28 % des aménorrhées secondaires. Elles

constituent un ensemble de tableaux de sévérité variable et de pronostic en général moins favorable que les autres causes endocrines d'infertilité (tableau IV). Des formes fluctuantes existent, si bien que l'information donnée aux couples ne doit pas être excessivement pessimiste, sans toutefois leur faire prendre trop de retard dans la mise en œuvre d'une demande de don d'ovocyte ou d'adoption éventuelle. Le diagnostic des formes sévères est facile, avec la constatation à deux reprises d'un taux de FSH supérieur à 40 UI/L en regard d'un taux d'estradiol inférieur à 20 pg/mL. Dans les formes moins sévères, des cycles peuvent persister et les taux d'estradiol sont alors non effondrés voire élevés en début de cycle. L'évaluation de la réserve ovarienne a été développée chapitre 17.

Le mécanisme des IOP peut relever d'une accélération de l'atrésie folliculaire ou au contraire d'une diminution du stock initial. Enfin, un dysfonctionnement folliculaire peut être en cause. Les différentes étiologies correspondant à ces mécanismes sont résumées tableau III.

Le bilan comporte (35) un caryotype à la recherche notamment d'un syndrome de Turner, le plus souvent actuellement dans une forme en mosaïque, les formes complètes étant dépistées en anténatal. Ce caryotype est complété en cas de diagnostic avéré d'une recherche de matériel du chromosome Y dont la découverte conduira à une annexectomie en raison du risque de développement de gonadoblastomes (36). Un bilan à la recherche de malformations cardiaques ou aortiques par la réalisation notamment d'une angio-IRM avec normalisation des mesures à la surface corporelle, de malformations rénales, d'une hypothyroïdie sera également

Tableau IV – Causes des insuffisances ovariennes prématurées en fonction du mécanisme.

Mécanismes	Pathologies
Anomalies de formation du pool folliculaire	– Syndrome ataxie-télangiectasie
Blocage de maturation folliculaire	– Mutation des gènes du récepteur à FSH, GDF 19- connexine 37, Fox-l 2 – Auto-immunité
Épuisement accéléré du stock folliculaire	– Anomalie du chromosome X (nombre, structure et translocation : • Sd de Turner • triple X • prémutation FMR1 (Sd de l'X fragile) • mutation des gènes BMP15, SF1, DIA – Anomalie autosomique (chromosomes 11 et 3) – Toxique (chimio- et radiothérapie) – Agents viraux – Galactosémie – Auto-immunité

réalisé (37). Le pronostic de la grossesse est réservé avec risque de dissection aortique fatale (38).

La recherche d'un syndrome de l'X fragile doit également être discutée. Ce syndrome peut donner des tableaux fluctuants alternant des périodes d'aménorrhée avec bouffées de chaleur et élévation de la FSH et des périodes de reprise de la fonction ovarienne et potentiellement grossesse spontanée. Le dépistage des anomalies du gène *FMR1* (*fragile mental retardation 1*) (39) est recommandé dans les formes complètes d'insuffisance ovarienne prématurée. Dans les formes plus modérées d'insuffisance ovarienne sans troubles des cycles, diagnostiqués par exemple devant un taux d'estradiol élevé à j3, un taux d'AMH et un compte folliculaire antral bas pour l'âge, les seuils d'âge et de taux d'AMH au-delà desquels doit se faire cette recherche n'ont pas encore été définis en France. L'American College of Obstetricians and Gynecologists a publié en 2009 des recommandations préconisant la recherche de prémutation chez toute femme ayant des troubles du cycle ou un taux augmenté de FSH avant l'âge de 40 ans. Cette recherche doit s'accompagner d'une consultation de conseil génétique et d'un support psychologique en raison de conséquences d'un tel diagnostic.

Le diagnostic des causes auto-immunes d'IOP est porté devant l'association d'autres endocrinopathies auto-immunes, telles que hypothyroïdie ou diabète dont le dépistage doit être fait avant la grossesse, et la négativité du reste du bilan notamment moléculaire et caryotypique. Le dosage des Ac anti-ovaires peu sensible et spécifique n'est pas réalisé en pratique.

La prise en charge de l'infertilité dans le cadre des IOP comporte en fonction de la sévérité du tableau une stimulation ovarienne utilisant un protocole adapté au risque de mauvaise réponse, par exemple administration de fortes doses de FSH en protocole long après synchronisation de la cohorte folliculaire par estroprogestatifs, ou au contraire un don d'ovocyte ou une adoption.

À plus long terme, le risque d'insuffisance ovarienne prématurée et la prise en charge par un traitement hormonal substitutif doivent être anticipés et expliqués à la patiente. Le risque d'ostéoporose est important, en particulier si les dosages d'œstrogènes sont trop faibles (40, 41), ainsi que le risque cardiovasculaire.

Causes surrénaliennes d'infertilité

Les anomalies surrénaliennes en relation avec l'infertilité sont les hypercorticismes et les déficits enzymatiques surrénaliens responsables d'hyperplasie bilatérale des surrénales avec hyperandrogénie, au premier rangs desquels le déficit en 21-hydroxylase.

Les hypercorticismes sont évoqués sur un aspect clinique évocateur d'emblée ou lors du diagnostic d'un syndrome des ovaires poly kystiques dont ils constituent un diagnostic d'exclusion. Le dosage du cortisol libre urinaire des 24 heures permet d'éliminer ce diagnostic s'il est normal, en dehors des très rares cas d'hypercorticisme fluctuants. Le dosage du cortisol plasmatique à minuit est plus discriminant mais moins facile à mettre en œuvre. La prise en charge de l'infertilité en cas de syndrome de Cushing est contre-indiquée jusqu'à guérison et ne peut être menée qu'après un bilan métabolique et vasculaire complet compte tenu des complications de ce syndrome.

Le déficit en 21-hydroxylase pose de nombreuses questions d'intérêt dans le cadre de la prise en charge de l'infertilité. Il peut être connu dans le cas d'une forme sévère avec virilisation, voire insuffisance surrénalienne. Il peut au contraire être dépisté dans le bilan d'infertilité en cas de forme à révélation tardive. Cette pathologie mime en tout point le syndrome des ovaires polykystiques et doit être systématiquement exclue pour confirmer le diagnostic de SOPK (42) en cas d'hyperandrogénie. Le dosage de la 17-hydroxyprogestérone de base est recommandé dans ce contexte pour éliminer un déficit en 21-hydroxylase, avec une fiabilité de 92 % (8). Un résultat supérieur ou égal à 2 ng/mL demande confirmation par la réalisation d'un test au Synacthène® ordinaire sur la 17-hydroxyprogestérone.

Une fois le diagnostic de déficit en 21-hydroxylase établi sur les critères biologiques, un bilan génétique est indispensable. Le déficit en 21-hydroxylase est une pathologie de transmission autosomique récessive. Un même individu peut être hétérozygote composite pour deux mutations différentes. Toutes les mutations n'ont pas le même impact fonctionnel. Certaines vont induire une activité enzymatique très altérée alors que d'autres vont maintenir une activité compatible avec un fonctionnement enzymatique subnormal. Chez un sujet hétérozygote composite, le phénotype dépendra de la mutation induisant la fonction enzymatique la moins altérée. La mutation induisant la fonction enzymatique la plus altérée est donc « masquée ». En admettant qu'une patiente de phénotype subnormal, porteuse d'une mutation très délétère et d'une mutation peu délétère, ait pour conjoint un homme porteur d'une mutation très délétère à l'état hétérozygote, l'enfant aura une chance sur quatre d'hériter de deux mutations très délétères et de développer une forme sévère de la maladie (virilisation des fœtus de sexe féminin, insuffisance surrénale néonatale). Cette situation n'est pas exceptionnelle dans la mesure où 1 individu sur 50 est porteur hétérozygote de mutations du gène CYP 21, tous types de mutations confondus,

ces taux augmentant dans certaines populations, notamment du pourtour méditerranéen. Le diagnostic moléculaire réalisé chez la femme permet donc de définir le type de mutation dont elle est porteuse, de définir la nécessité de dépistage de son conjoint et de définir *a priori* la prise en charge obstétricale ultérieure adaptée (43). Ces couples doivent par ailleurs être adressés en consultation de conseil génétique lorsqu'une mutation délétère est mise en évidence.

La prise en charge thérapeutique du déficit comporte dans les formes sévères un traitement de supplémentation de l'insuffisance surrénale, parfois insuffisant pour rétablir la fertilité qui est souvent plurifactorielle chez ces femmes (44, 45). Le recours à l'AMP est alors nécessaire avec organisation de la prise en charge adaptée dès le début de la grossesse.

Dans les formes moins sévères, la supplémentation en hydrocortisone permet en théorie de casser le cercle vicieux du déficit enzymatique qui induit hyperandrogénie et anovulation. Des doses plus élevées, sous forme de dexaméthasone, peuvent être nécessaires pour rétablir la fertilité spontanée (et interrompues dès le diagnostic de grossesse si le risque d'atteinte fœtale sévère a pu être écarté). En cas d'échec ou de cause associée d'infertilité justifiant le recours à l'AMP, le déficit en 21-hydroxylase peut induire des difficultés lorsque les taux de progestérone sont élevés dès le début du traitement. Un impact endométrial délétère des taux de progestérone élevés a notamment été suggéré (46). On peut alors proposer l'administration de dexaméthasone, dont ni la date de début par rapport à l'AMP ni les doses ne sont consensuelles. Chez une femme présentant une élévation de la progestérone en début de cycle, la dose minimale efficace de dexaméthasone permettant de normaliser la progestérone doit être proposée, compte tenu des effets indésirables des traitements corticoïdes.

Dysthyroïdies et infertilité

Compte tenu de l'impact sur le développement psychomoteur des enfants nés de mère hypothyroïdienne (47), le bilan thyroïdien est désormais recommandé chez les femmes consultant pour infertilité de façon systématique (29) selon le consensus international. Dans le contexte particulier du désir de grossesse, le taux de TSH doit être inférieur à 4 mUI/L selon les recommandations françaises (30). L'existence d'Ac anti-thyroïdiens est associée à un sur risque de fausse couche spontanée (48). L'augmentation des besoins en L thyroxine chez les femmes traitées pour hypothyroïdie

est très précoce (49) et doit donc être anticipée à partir du centre d'AMP ou en étroite collaboration avec le médecin référent.

La découverte d'une hyperthyroïdie est plus rare. Le bilan étiologique et l'équilibre thérapeutique doivent être menés avant la prise en charge. Le diagnostic de maladie de Basedow chez une femme désirant une grossesse amènera à préférer un traitement médical (par le propyl thio uracile) ou chirurgical car le traitement pas l'iode contre-indique la grossesse pendant au moins 6 mois et pourrait favoriser la persistance des anticorps anti-récepteur de la TSH (50), dont l'impact fœtal est bien connu.

Diabète et infertilité

Le diabète est une pathologie de plus en plus fréquente chez les femmes en âge de procréer en raison de l'augmentation de l'incidence du diabète de type 2, y compris chez les sujets jeunes. En dehors de l'association SOPK, diabète et hypofertilité, dans laquelle l'hypofertilité n'est pas univoque, il existe différents arguments pour un impact endométrial de l'hyperglycémie pouvant être en relation avec des anomalies de l'implantation. Un rôle de l'hyperglycémie ou des anomalies hormonales associées au diabète de type 2 (hyperleptinémie, hyperinsulinémie, dysrégulation des IGFs) a été rapporté dans les anomalies de l'implantation (51, 52) et de la placentation (53) dans des modèles animaux, ou *ex vivo* humains (54). Le diabète est une cause de fausses couches spontanées à répétition (55). La prise en charge comporte en priorité l'équilibre du diabète pour éviter les diverses complications obstétricales qui lui sont liées. L'équilibre diabétique est reflété par le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1C), et une valeur inférieure ou égale à 6,9 % n'induit pas de sur-risque de malformation fœtale ou d'issue défavorable de la grossesse (56). L'HbA1C est d'interprétation difficile en cas d'hémoglobinopathie ou de carence martiale, on peut alors lui substituer la fructosamine qui est un reflet sur 3 semaines de l'équilibre (au lieu de trois mois pour l'HbA1C). Le bilan avant la prise en charge doit également comporter la recherche de complications du diabète par un dosage de microalbuminurie, un bilan cardiologique et un fond d'œil, et la recherche de facteurs de risque cardiovasculaires associés (tabagisme à sevrer, hypertension artérielle et dyslipidémie). Dans la période préconceptionnelle, on peut tenter d'équilibrer le diabète par la metformine (57, 58), qui sera relayée par l'insuline en début de grossesse. En cas d'échec, une mise à l'insuline préconceptionnelle est nécessaire.

Conclusion

Les infertilités endocriniennes représentent donc un spectre étendu de pathologies dont la connaissance approfondie est nécessaire pour mener la prise en charge des couples dans l'optique de leur permettre d'avoir un jour « un bébé en bonne santé à la maison ». La recherche de pathologies rares fait courir le risque d'alourdir encore un bilan déjà pesant pour bien des couples. L'anamnèse et la clinique doivent donc toujours et avant tout orienter les examens complémentaires éventuels. La place de la pluridisciplinarité et de la prise en charge globale est particulièrement importante dans ce champ.

Références

1. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) (2004) Human reproduction (Oxford, England) 19: 41-7
2. Jonard S, Dewailly D (2001) Actualités sur le syndrome des ovaires polykystiques. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée* 16: 302-5
3. Edwards RG, Lobo R, Bouchard P (1996) Time to revolutionize ovarian stimulation. Human reproduction (Oxford, England) 11: 917-9
4. ANAES (1996) Stérilité du couple. Recommandations et références médicales. www.anaes.fr
5. Schwartz JL, Creinin MD, Pymar HC *et al.* (2002) Predicting risk of ovulation in new start oral contraceptive users. *Obstet Gynecol* 99: 177-82
6. Landgren BM, Uden AL, Diczfalusy E (1980) Hormonal profile of the cycle in 68 normally menstruating women. *Acta Endocrinol* 94: 89-98
7. Bukulmez O, Arici A (2004) Luteal phase defect: myth or reality. *Obstetrics and Gynecol Clin North Am* 31: 727-44
8. Young J, Tardy V, Brac de la Perrière A *et al.* (2010) French Society of Endocrinology – 2008 Consensus: Detection and Management of Late-Onset 21-Hydroxylase Deficiency in Women with Hyperandrogenism. *Ann Endocrinol* 71: 14-8
9. Zorn JR (2006) Place actuelle du test de Hühner dans l'exploration de la stérilité conjugale. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34: 142-6
10. Caron P, Chauvin S, Christin-Maitre S *et al.* (1999) Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 990-6
11. Mohamed KA, Davies WA, Lashen H (2006) Antimüllerian hormone and pituitary gland activity after prolonged down-regulation with goserelin acetate. *Fertil Steril* 86: 1515-7
12. Streuli I, Fraisse T, Pillet C *et al.* (2008) Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril* 90: 395-400
13. La Marca A, Giulini S, Orvieto R *et al.* (2005) Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)* 20: 1569-72
14. Fraisse T, Ibecheole V, Streuli I *et al.* (2008) Undetectable serum anti-Müllerian hormone levels and occurrence of ongoing pregnancy. *Fertil Steril* 89: 723-9
15. Younis JS, Jadaon J, Izhaki I *et al.* (2010) A simple multivariate score could predict ovarian reserve, as well as pregnancy rate, in infertile women. *Fertil Steril* 94: 655-61
16. Levy T, Orvieto R, Homburg R *et al.* (1996) Severe ovarian hyperstimulation syndrome despite low plasma oestrogen concentrations in a hypogonadotrophic, hypogonadal patient. *Human reproduction (Oxford, England)* 11: 1177-9
17. Salihu HM, Lynch ON, Alio AP *et al.* (2009) Extreme maternal underweight and foeto-infant morbidity outcomes: a population-based study. *J Maternal-Fetal & Neonatal Med* 22: 428-34
18. Pizzi C, Evans SA, De Stavola BL *et al.* (2008) Lifestyle of UK commercial aircrews relative to air traffic controllers and the general population. *Aviation, space, & Environ Med* 79: 964-74
19. Dode C, Hardelin JP (2009) Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 17: 139-146
20. Bringer J, Boulet F, Clouet S *et al.* (1990) Pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone in the female. Diagnostic and therapeutic indications. *Presse Med* 19: 1276-81
21. Christin-Maitre S, de Crecy M (2007) Pregnancy outcomes following pulsatile GnRH treatment: results of a large multicenter retrospective study. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 36: 8-12
22. Martin K, Hall J, Adams J *et al.* (1993) Comparison of exogenous gonadotropins and pulsatile gonadotropin-releasing hormone for induction of ovulation in hypogonadotropic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 125-9
23. The European Recombinant Human LH Study Group (1998) Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1507-14
24. Tsilchorozidou T, Conway GS (2004) Uterus size and ovarian morphology in women with isolated growth hormone deficiency, hypogonadotrophic hypogonadism and hypopituitarism. *Clinical Endocrinology* 61: 567-72
25. de Muinck Keizer-Schrama SM (2007) Introduction and management of puberty in girls. *Horm Res* 68 Suppl 5: 80-3
26. Campo S, Campo V, Lanzzone A (2002) Twin pregnancy using recombinant gonadotropins in a woman with hypogonadotrophic hypogonadism. *Gynecol Endocrinol* 16: 27-32
27. Brue T, Delemer B (2007) Diagnosis and management of hyperprolactinemia: expert consensus - French Society of Endocrinology. *Ann Endocrinol (Paris)* 68: 58-64
28. Bonneville JF, Bonneville F, Cattin F (2005) L'IRM hypophysaire : indications et résultats en gynécologie et en obstétrique. *Gynécologie Obst & Fertil* 33: 147-53
29. Abalovich M, Amino N, Barbour LA *et al.* (2007) Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92: S1-47
30. HAS (2007) Hypothyroïdies frustes chez l'adulte : diagnostic et prise en charge. www.has-santefr
31. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ (2005) Clinical relevance of macroprolactin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62: 633-43
32. Carranza-Lira S, González-Sánchez JL, Martínez-Chequer JC (1999) Vaginal bromocriptine administration in patients with hyperprolactinemia. *Intern J Gynecol & Obstet* 65: 77-8
33. Darwish AM, Farah E, Gadallah WA *et al.* (2007) Superiority of Newly Developed Vaginal Suppositories Over Vaginal Use of Commercial Bromocriptine Tablets: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Reproductive Sciences* 14: 280-5
34. Mendes MC, Ferriani RA, Sala MM *et al.* (2001) Effect of transitory hyperprolactinemia on in vitro fertilization of human oocytes. *J Reprod Med* 46: 50

35. Nelson LM (2009) Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360: 606-14
36. Bianco B, Lipay M, Guedes A *et al.* (2009) SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome. *Int J Gynecol Pathol* 28: 197-202
37. Agence de Biomedecine/CNGOF (2009) Syndrome de Turner et grossesse. http://www.cngofasso.fr/D_PAGES/ACCUFRSTHTM
38. Boissonnas CC, Davy C, Bornes M *et al.* (2009) Careful cardiovascular screening and follow-up of women with Turner syndrome before and during pregnancy is necessary to prevent maternal mortality. *Fertil & Steril* 91: 929.e925-929.e927
39. Pembrey ME, Barnicoat AJ, Carmichael B *et al.* (2001) An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health Technol Assess* 5: 1-95
40. Leite-Silva P, Bedone A, Pinto-Neto AM *et al.* (2009) Factors associated with bone density in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Arch Gynecol Obstet* 280: 177-81
41. Uygur D, Sengul O, Bayar D *et al.* (2005) Bone loss in young women with premature ovarian failure. *Arch Gynecol Obstet* 273: 17-9
42. Falhammar H, Thoren M, Hagenfeldt K (2008) A 31-year-old woman with infertility and polycystic ovaries diagnosed with non-classic congenital adrenal hyperplasia due to a novel CYP21 mutation. *J Endocrinol Invest* 31: 176-80
43. Nimkarn S, New MI (2009) Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 300: 192-6
44. Bachelot A, Chakhtoura Z, Rouxel A *et al.* (2007) Hormonal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Endocrinol (Paris)* 68: 274-80
45. Bachelot A, Plu-Bureau G, Thibaud E *et al.* (2007) Long-term outcome of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res* 67: 268-76
46. Cohen MA, Sauer MV, Lindheim SR (1999) 21-hydroxylase deficiency and Turner's syndrome: a reason for diminished endometrial receptivity. *Fertil & Steril* 72: 937-9
47. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC *et al.* (1999) Maternal Thyroid Deficiency during Pregnancy and Subsequent Neuropsychological Development of the Child. *N Engl J Med* 341: 549-55
48. Carp HJ, Meroni PL, Shoenfeld Y (2008) Autoantibodies as predictors of pregnancy complications. *Rheumatology (Oxford, England)* 47 Suppl 3: iii6-8
49. Alexander EK, Marqusee E, Lawrence J *et al.* (2004) Timing and Magnitude of Increases in Levothyroxine Requirements during Pregnancy in Women with Hypothyroidism. *N Engl J Med* 351: 241-9
50. Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L *et al.* (2008) TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. *Eur J Endocrinol* 158: 69-75
51. Dimitriadis E, White CA, Jones RL *et al.* (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reprod Updates* 11: 613-30
52. Henson MC, Castracane VD (2006) Leptin in Pregnancy: An Update. *Biol Reprod* 74: 218-29
53. Giachini FRC, Carriel V, Capelo LP *et al.* (2008) Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *J Anat* 212: 31-41
54. Galettis A, Campbell S, Morris JM *et al.* (2004) Monocyte Adhesion to Decidual Endothelial Cells Is Increased in Pregnancies Complicated by Type 1 Diabetes but not by Gestational Diabetes. *Diabetes Care* 27: 2514-5
55. Lejeune V (2006) Fausses couches spontanées précoces répétées : quelle prise en charge proposer en 2006 ? *Gynécob Obst & Fertil* 34: 927-37
56. Jensen DM, Korsholm L, Ovesen P *et al.* (2009) Peri-conceptional A1C and risk of serious adverse pregnancy outcome in 933 women with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 32: 1046-8
57. Langer O (2007) Oral anti-hyperglycemic agents for the management of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Clin North Am* 34: 255-74, ix
58. Nicholson W, Bolen S, Witkop CT *et al.* (2009) Benefits and risks of oral diabetes agents compared with insulin in women with gestational diabetes: a systematic review. *Obstet Gynecol* 113: 193-205

J.-N. Hugues

Syndrome des ovaires polykystiques

Introduction

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a été initialement décrit en 1935 par Stein et Leventhal (1). Ce syndrome entraîne des répercussions aussi bien sur l'axe gonadotrope qu'au niveau métabolique et vasculaire. Il représente l'un des troubles hormonaux les plus fréquents chez la femme. Sa prévalence est estimée entre 5 et 10 % de la population féminine (2-4). La prévalence varie selon les populations, en raison probablement de l'origine ethnique et de facteurs environnementaux (5, 6). Le diagnostic de SOPK a fait l'objet de nombreuses discussions en raison de l'hétérogénéité des symptômes et de leur variabilité dans le temps.

La prise en charge médicale concerne non seulement l'hirsutisme et l'infertilité mais également les risques à long terme, associés à l'insulinorésistance.

Critères diagnostiques : consensus de Rotterdam

En 1990, la conférence sous l'égide du NIH (National Health Institute) a proposé les critères diagnostiques suivants (tableau I) :

- hyperandrogénie clinique et/ou biologique associée à anovulation chronique ;
- après exclusion des autres diagnostics d'hyperandrogénie (hyperplasie congénitale des surrénales, tumeurs sécrétant des androgènes, syndrome de Cushing) (7).

Ces critères ont permis de standardiser le diagnostic et ont été utilisés dans de nombreux essais cliniques randomisés multicentriques.

Néanmoins, la place grandissante de l'échographie en pratique clinique ainsi que la nécessité d'évaluer les risques à long terme liés au SOPK ont conduit les experts européens et américains, réunis en 2003, lors de la conférence de consensus de Rotterdam, organisée sous l'égide de l'ESHRE/ASRM (8) à retenir au moins deux critères parmi les trois suivants (tableau I) :

- oligo- et/ou anovulation ;
- hyperandrogénie clinique et/ou biologique ;
- aspect échographique d'OPK (fig. 1).

Les critères établis par le groupe de Rotterdam sont donc moins restrictifs que ceux précédemment proposés. En effet, une patiente avec une hyperandrogénie clinique ou biologique et un aspect d'OPK à l'échographie peut être considérée comme un SOPK, alors que ses cycles sont ovulatoires au même titre qu'une patiente présentant une oligo- et/ou anovulation avec un aspect échographique caractéristique (9) mais sans hyperandrogénie.

De la sorte, il est indispensable de bien définir le profil des patientes. Dans le cadre de cette revue, qui concerne les troubles de l'ovulation, nous ferons référence principalement aux patientes anovulatoires.

Tableau I – Critères diagnostiques du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

Critères du NIH (1990)

Les 2 critères sont exigés :

- Anovulation chronique
 - Hyperandrogénie clinique et/ou biologique
- Avec exclusion des autres étiologies

Critères de la conférence de consensus de Rotterdam (2003)

2 critères sur 3 sont exigés :

- Oligo- et/ou anovulation
- Hyperandrogénie clinique et/ou biologique
- Aspect échographique d'OPK

Avec exclusion des autres étiologies : hyperplasie congénitale des surrénales, tumeurs androgénosécrétantes, syndrome de Cushing

NIH : National Health Institute ; OPK : ovaires polykystiques.

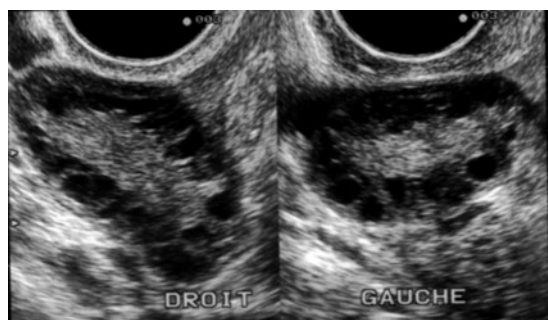


Fig. 1 – Aspect échographique d'ovaires polykystiques.

res avec un aspect échographique typique quel que soit le contexte androgénique. En effet, la plupart des études publiées dans le domaine du traitement de l'anovulation concernent des patientes européennes, en général sans hyperandrogénie.

Oligo- et/ou anovulation

L'anovulation se traduit le plus souvent par une spanioménorrhée (cycles irréguliers de plus de 45 jours), parfois par une aménorrhée (absence de règles depuis plus de trois mois). Plus rarement, les cycles paraissent réguliers mais sont anovulatoires comme en attestent l'absence de décalage thermique (mis en évidence sur la courbe de température) et un taux de progestérone plasmatique < 3 Ng/mL en phase lutéale présumée.

Le SOPK appartient au groupe II b de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) qui est caractérisée par une anovulation normogonadotrope normo-œstrogénique. Il est aisé d'éliminer le diagnostic d'hypogonadisme hypogonadotrope (insuffisance hypothalamique ou hypophysaire : groupe I de la classification de l'OMS) et d'insuffisance ovarienne prématurée (groupe III) par la mesure des concentrations sériques de FSH et d'œstradiol (E2).

Dans le cadre d'une oligo- et/ou anovulation, un dosage systématique de la prolactine plasmatique est habituellement réalisé. Cependant, la prolactinémie est souvent dans les valeurs supérieures de la normale chez les patientes SOPK et cette hyperprolactinémie modérée est fonctionnelle, en rapport avec l'hyperœstrogénie chronique. En cas d'hyperprolactinémie franche confirmée à deux reprises, des explorations complémentaires, en particulier chromatographie de la prolactine et imagerie, seront nécessaires.

Hyperandrogénie

Le principal critère d'hyperandrogénie clinique est la présence d'un hirsutisme (8) dont l'intensité est évaluée à l'aide du score de Ferriman. L'acné est considérée comme un symptôme d'hyperandrogénie mineure, controversé dans la littérature (10).

Le diagnostic d'hyperandrogénie biologique pose encore actuellement de nombreux problèmes méthodologiques. En effet, les méthodes actuellement disponibles pour le dosage de la testostérone plasmatique sont imprécises et les valeurs dites normales varient d'une méthode à l'autre. De plus, cette mesure varie dans la population normale avec l'âge et l'indice de masse corporelle (IMC) (11). À la conférence de Rotterdam, il a été considéré que la mesure de la testostérone libre ou de l'index

de testostérone libre (ITL) permet l'évaluation la plus sensible d'hyperandrogénie. L'ITL représente le rapport de la testostérone et de la *sex hormone binding globulin* (SHBG), protéine porteuse des androgènes. Il n'est pas nécessaire de mesurer l'androstènedione plasmatique en raison de l'absence de normes établies et de données cliniques fiables. Les taux plasmatiques de *luteinizing hormone* (LH) ainsi que le rapport LH/FSH (*follicle stimulating hormone*) sont parfois plus élevés chez les patientes ayant un SOPK (12) que chez les femmes normo-ovulantes du même âge. Liée à l'augmentation de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH (13), cette élévation de la LH n'a pas été retenue pour établir le diagnostic car elle est loin d'être constante et les effets négatifs potentiels d'une élévation de la LH sur la fertilité sont très controversés.

Il est essentiel d'éliminer les autres causes d'hyperandrogénie en fonction de la symptomatologie clinique et du contexte familial éventuel :

- un déficit en 21 hydroxylase par le dosage de la 17 hydroxyprogestérone. Une valeur basale < 2 Ng/mL en début de phase folliculaire ou une réponse au Synacthène® < 10 Ng/mL élimine le diagnostic de déficit en 21 hydroxylase (14) ;
- un syndrome de Cushing par la mesure du cortisol libre urinaire (FLU) des 24 heures ;
- devant une testostérone plasmatique $> 1,2$ Ng/mL, il est indispensable d'éliminer une tumeur ovarienne ou surrénalienne par la réalisation d'examens complémentaires, en particulier l'imagerie.

Aspect échographique d'OPK

C'est un critère diagnostique essentiel du SOPK ainsi défini : « présence dans chaque ovaire d'au moins 12 follicules mesurant 2 à 9 mm de diamètre et/ou un volume ovarien ≥ 10 mL » (15) (volume ovarien = longueur $\times$ largeur $\times$ épaisseur $\times 0,523$) (fig. 1).

Ces critères ont une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour la définition du SOPK. L'augmentation de volume du stroma et son hyperéchogénicité ne font pas partie des critères de définition (16), car la mesure du volume ovarien, plus simple, reflète également l'augmentation de volume du stroma (17). Lorsqu'un seul ovaire présente les caractéristiques échographiques, le critère échographique peut être retenu.

Les experts de la conférence de Rotterdam ont insisté sur les recommandations techniques : l'échographie doit être réalisée par voie vaginale, surtout chez les patientes obèses. Le matériel utilisé doit être récent et le médecin échographiste doit avoir reçu une formation adaptée. L'échographie peut être réalisée en début de cycle lorsque les cycles sont réguliers. Le plus souvent, du fait d'une

spanioménorrhée, l'échographie est réalisée après des métrorragies induites par un progestatif.

Caractéristiques métaboliques et cardiovasculaires. Risques à long terme

Les patientes SOPK présentent souvent une insulino-résistance, parfois renforcée par une surcharge pondérale. De ce fait, elles sont exposées à un risque de perturbations métaboliques et de complications cardiovasculaires.

Obésité

L'obésité, définie par un IMC ≥ 30 , est présente chez environ 30 % des patientes SOPK. Sa prévalence peut même atteindre 75 % dans les populations nord-américaines. L'augmentation de la graisse, notamment de la graisse viscérale (estimée par un tour de taille > 88 cm ou par un rapport taille/hanches élevé), est un marqueur clinique fiable d'insulino-résistance. De ce fait, les patientes obèses présentent fréquemment une intolérance au glucose et une dyslipidémie (18).

Insulino-résistance

Elle se définit par une relative incapacité des tissus périphériques à l'utilisation du glucose sous l'influence de l'insuline. Estimée chez les patientes SOPK à 50 %, elle concerne les femmes obèses mais également les femmes non obèses (19). En effet, Dunaif *et al.* (20) ont mis en évidence une sensibilité à l'insuline moindre chez les patientes SOPK que chez des femmes contrôles appariées sur l'IMC, la masse maigre et la répartition de la graisse. Cette insulino-résistance s'explique par un défaut de la voie de signalisation de l'insuline au niveau de l'adipocyte et du muscle squelettique et cette altération est spécifique au SOPK (21, 22). Cependant, l'insulino-résistance n'affecte pas tous les tissus périphériques. En effet, l'ovaire conserve une sensibilité à l'insuline qui agit comme une coganodotrophine.

Cependant, la mesure du degré d'insulino-résistance n'a pas été systématiquement préconisée. En effet, les méthodes simples de mesure (rapport glycémie/insulinémie à jeun (23) ou le HOMA (*homeostasis model assessment*) (24) manquent de précision par rapport à la méthode de référence : le clamp euglycémique hyperinsulinique (25), qui est une méthode invasive non réalisable en pratique courante. La diminution de la SHBG (*sex hormone binding globuline*) plasmatique pourrait être

un témoin indirect d'insulino-résistance. En effet, l'insuline réduit la production hépatique de SHBG avec, pour conséquence, une augmentation de la fraction libre des androgènes circulants (26).

L'insulino-résistance jouant un rôle clef dans la survenue d'un syndrome métabolique, il est recommandé de dépister chez les patientes SOPK le syndrome métabolique, a fortiori obèses, un syndrome métabolique défini par la présence d'au moins trois des cinq critères suivants :

- tour de taille > 88 cm ;
- triglycérides ≥ 150 mg/dL ;
- HDL-C < 50 mg/dL ;
- pression artérielle (PA) systolique ≥ 130 ou PA diastolique ≥ 85 mmHg ;
- intolérance aux hydrates de carbone : glycémie à jeun comprise entre 1,10 g/L et 1,26 g/L et/ou glycémie deux heures après hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) comprise entre 1,40 g/L et 1,99 g/L.

Intolérance aux hydrates de carbone et diabète de type 2

Il est estimé que 30 à 40 % des femmes SOPK jeunes présentent une intolérance au glucose et que 10 % auront un diabète de type 2 après 40 ans (27, 28). Ainsi, le risque de développer un diabète de type 2 est trois à sept fois plus élevé que chez des patientes du même âge indemne de SOPK. L'insulino-résistance ne peut expliquer à elle seule la prédisposition à développer un diabète de type 2 car la plupart des patientes SOPK sont capables de compenser l'insulino-résistance. Seule une partie d'entre elles dont la réponse des cellules β -pancréatiques est insuffisante lors des repas ou en cas de test au glucose (29, 30) risque de développer un diabète de type 2 du fait d'antécédent familial de diabète au premier degré (31), les autres facteurs prédisposant étant l'anovulation et l'obésité (32).

La mesure de la glycémie et de l'insulinémie à jeun n'étant pas suffisante pour dépister une intolérance au glucose, il est recommandé de réaliser une HGPO (glycémie à jeun et deux heures après une charge orale glucosée de 75 g) chez les patientes ayant un IMC > 27 . Quant au risque de diabète gestationnel, il serait multiplié par dix chez les patientes SOPK (33).

Hypertension artérielle et dysfonction endothéliale

Une hypertension artérielle (HTA) peut être observée avant la ménopause (34) et son incidence est également plus élevée au-delà (35). Ceci serait lié à une diminution de la compliance vasculaire et une dysfonction endothéliale, sans relation avec l'obésité (36).

Pathologies coronarienne et vasculaire

Une prédisposition aux macro-angiopathies et à la thrombose a été rapportée chez les patientes SOPK (37, 38) car l'insulinorésistance et l'hyperandrogénie sont des facteurs de risque de maladie coronarienne. En effet, l'hypertriglycéridémie, l'augmentation des *very low density lipoproteins* (VLDL), des *low density lipoproteins* (LDL) et la diminution des *high density lipoproteins* (HDL), fréquemment observées chez les patientes SOPK, prédisposent aux pathologies cardiovasculaires (39). Cependant, les études épidémiologiques réalisées chez des patientes dont l'âge moyen était de 55 ans n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la mortalité par maladies coronariennes et vasculaires (40, 41).

Syndrome d'apnées du sommeil

La prévalence de l'apnée du sommeil est plus élevée chez les femmes avec SOPK et ce fait ne peut être expliqué par l'obésité seule (42-44). L'insulinorésistance serait un facteur plus prédisposant que l'âge, l'IMC ou les taux plasmatiques de testostérone (42).

Pathologie cancéreuse

L'hyperplasie endométriale et le cancer de l'endomètre sont plus fréquemment observés dans la population SOPK (45, 46) du fait de la stimulation permanente de l'endomètre par les estrogènes (par l'estrone essentiellement) et par la carence en progestérone qui s'oppose à la prolifération et à la différenciation de l'endomètre. L'obésité et le diabète sont des facteurs associés de risque de carcinome endométrial. Une augmentation de la fréquence des cancers du sein et des cancers de l'ovaire a été également rapportée chez les patientes SOPK (46), favorisée par de nombreux facteurs confondants tels que l'obésité, l'anovulation, l'infertilité et le traitement hormonal de l'infertilité.

Prise en charge thérapeutique

Dans ce chapitre thérapeutique, nous aborderons brièvement la prise en charge des désordres hormonaux et/ou métaboliques pour discuter plus longuement de la stratégie dans le cadre de l'infertilité.

Prise en charge des désordres hormonaux et métaboliques (hors infertilité)

L'anovulation chronique augmentant le risque d'hyperplasie de l'endomètre et de carcinome

endométrial, l'administration de progestatifs de façon séquentielle pendant la phase lutéale théorique ou d'un traitement œstroprogestatif a été préconisée afin d'inhiber la prolifération endométriale. Cependant, l'usage des contraceptifs oraux est controversé chez les patientes SOPK, du fait de leurs propres risques métabolique et thrombotique (47). Un bilan métabolique initial et un interrogatoire sur les antécédents personnels/familiaux sont donc indispensables ainsi qu'une surveillance pendant la prise de contraceptifs oraux.

Hirsutisme et acné

Les traitements hormonaux de l'hirsutisme et de l'acné ont pour but de réduire les taux d'androgène en diminuant la production d'androgènes et en augmentant la liaison à la protéine porteuse (SHBG) et/ou de s'opposer à l'action des androgènes au niveau des tissus cibles.

Antiandrogènes

L'acétate de cyprotérone (Androcur®) inhibe de façon compétitive la liaison de la testostérone et de la dihydrotestostérone (DHT) au récepteur des androgènes. Il a, de plus, une activité antigonadotrope puissante (48). La carence œstrogénique induite par ce composé doit être corrigée par l'apport d'un estrogène (17 bêta-œstradiol naturel par voie orale ou percutanée selon le terrain).

La spironolactone est un antagoniste de l'aldostérone initialement proposé comme traitement anti-hypertenseur. Cette molécule inhibe également de façon compétitive la liaison de la testostérone et de la DHT à leurs récepteurs. Ainsi, la spironolactone, à forte dose, est efficace sur les symptômes cliniques d'hyperandrogénie chez environ 50 % des patientes lorsqu'elle est utilisée seule. Compte tenu du risque théorique de retentissement sur la masculinisation d'un fœtus masculin en cas de grossesse, l'association avec une contraception orale est recommandée avec surveillance du ionogramme sanguin du fait de son effet antiminéralocorticoïde.

Le flutamide est un antiandrogène non stéroïdien qui agit également par inhibition compétitive au niveau du récepteur des androgènes et permet donc une diminution de l'hirsutisme. Des effets secondaires hépatocellulaires graves et sa tératogénicité potentielle limitent, cependant, son utilisation.

Œstroprogestatifs

Les œstroprogestatifs peuvent être également utilisés pour traiter l'hirsutisme et l'acné chez les patientes SOPK. L'éthyniloœstradiol, par son effet antigonadotrope, freine la production d'androgènes. De plus, les estrogènes augmentent la

production hépatique de SHBG, diminuant ainsi la fraction libre de testostérone plasmatique. Le choix de la pilule est important car la plupart des progestatifs ont des effets androgéniques. Le norgestimate et le désogestrel n'auraient pas d'effet androgénique important. La drospirénone, analogue de la spironolactone, peut être utilisée en association avec l'éthinylœstradiol pour traiter une hyperandrogénie clinique (49), en respectant toutefois les contre-indications métaboliques.

Insulinorésistance et intolérance au glucose

Mesures hygiénodietétiques

Les mesures hygiénodietétiques sont indispensables pour réduire le risque de survenue d'un diabète de type 2. En cas de surpoids, ces mesures jointes à l'activité physique sont les premières mesures à recommander (50, 51). En effet, la perte de poids ainsi que l'exercice physique agissent de façon synergique pour réduire l'insulinorésistance et l'hyperandrogénie (52, 53).

Une perte de poids, même modeste (2 à 7 %), permet ainsi une amélioration du profil hormonal, de la régularité menstruelle et des taux d'ovulation et de grossesse (50, 51). En pratique, l'aide d'une diététicienne ainsi qu'un soutien psychologique s'avèrent souvent nécessaires.

Agents insulinosensibilisants

Bien que les mesures hygiénodietétiques soient recommandées en première intention, l'administration d'agents insulinosensibilisants tels que la metformine peut retarder la survenue d'un diabète (54). Leur utilisation dans le cadre de l'infertilité sera développée plus loin.

Prise en charge de l'infertilité

Ce sont principalement les troubles intraovariens dont la conséquence clinique la plus apparente est l'anovulation qui expliquent l'infertilité des patientes SOPK.

La sensibilité toute particulière de ces patientes à la FSH et à la LH explique qu'une des préoccupations des cliniciens sera d'éviter deux complications majeures des traitements inducteurs de l'ovulation : l'hyperstimulation ovarienne et les grossesses multiples.

Plusieurs options thérapeutiques, en complément des mesures hygiénodietétiques, sont possibles et une conférence d'experts réunie récemment à Thessaloniki (55) a fait l'état des lieux des connaissances et des incertitudes qui persistent.

Citrate de clomifène

Le citrate de clomifène (CC) est classiquement et demeure, à ce jour, le traitement de première intention dans la stratégie de stimulation des patientes dont l'anovulation est en rapport avec un SOPK. C'est un traitement simple, administré par voie orale, peu coûteux et qui est associé à peu d'effets secondaires. Le principal inconvénient potentiel est le risque de grossesses multiples lorsqu'une surveillance de l'efficacité du traitement n'est pas effectuée.

Mécanisme d'action

Le CC se lie au récepteur de l'œstradiol où il exerce essentiellement des effets antioestrogéniques au niveau des organes cibles :

- au niveau hypothalamique, son effet est antioestrogénique. Il accélère la fréquence des pulses de GnRH, favorisant ainsi la sécrétion de LH et de FSH. Ainsi, en mimant un état de carence œstrogénique normalement induit par la lutéolyse, le CC reproduit l'élévation intercyclique de FSH ;
- au niveau ovarien, au contraire, le CC a un effet œstrogène-like et synergique de l'action de la FSH sur l'aromatase ;
- au niveau du col et de l'endomètre, le CC exerce un effet antioestrogénique : il diminue le volume, la filance de la glaire et il modifie l'épaisseur de l'endomètre en altérant sa vascularisation.

Posologie et mode d'administration

Le seuil de sensibilité au CC diffère d'une patiente à l'autre, surtout en fonction de l'IMC. Le CC sera donc prescrit par paliers posologiques progressifs en commençant, chez la patiente non obèse, par une dose de un comprimé/jour (50 mg) pendant 5 jours. L'administration est débutée entre le 2^e et le 5^e jour du cycle. En l'absence d'ovulation, la dose est augmentée à 100 puis 150 mg/jour pendant 5 jours.

Le SOPK étant associé à un risque de réponse multifolliculaire, une surveillance échographique entre le 12^e et le 14^e jour est indispensable, au moins lors du premier cycle de traitement. Cette échographie permet d'évaluer le nombre de follicules préovulatoires (16-18 mm) et intermédiaires (11-15 mm) et de dépister un éventuel effet négatif du CC sur l'endomètre. Un test de Hühner doit être prescrit afin de détecter un effet délétère du CC sur la glaire : si le test de Hühner est négatif, il est recommandé de s'opposer à l'effet antioestrogénique du CC par l'addition d'œstrogènes ou de gonadotrophines.

Efficacité

Le CC multiplie par 7,5 les chances d'ovuler et par 6 les chances de grossesse (56). Le taux cumulé d'ovulation est estimé à 60-80 % par patiente. Le

taux de grossesse se situe autour de 15 à 25 % par cycle et de 40 à 80 % par patiente. Il dépend néanmoins des autres facteurs d'infertilité éventuellement associés.

Imani *et al.* (57) ont identifié certains facteurs prédictifs de résistance au CC, définie par une absence d'ovulation avec une dose de 150 mg/j. Ce sont : une aménorrhée, un volume ovarien élevé, une hyperandrogénie, un hyperinsulinisme et surtout un surpoids, facteur positivement corrélé à la dose requise efficace (58). De plus, l'âge et un état d'aménorrhée sont associés à un risque majoré de non-conception malgré l'obtention d'une ovulation (59).

Traitements adjuvants

Un prétraitement œstroprogestatif permettrait d'augmenter l'efficacité du CC, en freinant l'hyperandrogénie ovarienne (60). L'utilisation de corticoïdes (dexaméthasone) a une certaine efficacité pour freiner l'hyperandrogénie surrénalienne mais l'effet délétère sur le poids doit faire limiter leur utilisation aux véritables blocs enzymatiques surrénaliens. En revanche, l'adjonction de bromocriptine pour freiner l'hyperprolactinémie fonctionnelle modérée, souvent associée au SOPK, est sans intérêt.

Les échecs du CC, qu'ils soient liés à une inefficacité à rétablir l'ovulation (dans environ 25 % des cas) ou à obtenir une grossesse après six cycles ovulatoires (environ 40 % des patientes), ont conduit à remettre dernièrement en question la place du CC comme traitement de première intention du SOPK qui pouvait lui être disputé par la metformine qui agit sur la composante métabolique du SOPK.

Agents insulinosensibilisants

L'insulinorésistance et l'obésité étant fréquentes chez les patientes ne répondant pas au CC, la place des agents insulinosensibilisants a été discutée mais ils ne remplacent, en aucun cas, les mesures hygiénodététiques.

Metformine

Mode d'action

La metformine, biguanide utilisé depuis 1957 dans le traitement du diabète de type 2, améliore la sensibilité à l'insuline au niveau du foie et du muscle squelettique (61). Ce traitement améliore la tolérance au glucose en inhibant la néoglycogénèse hépatique et réduit l'hyperinsulinémie et l'oxydation des acides gras. Bien que la metformine ait probablement un effet inhibiteur direct sur la production des androgènes par les cellules de la thèque (62, 63), la diminution inconstante des taux plasmatiques d'androgènes

est plus probablement secondaire à la diminution de la sécrétion d'insuline. En effet, l'insuline favorise l'hyperandrogénie biologique en agissant de façon synergique avec la LH sur la production thécale d'androgènes et en diminuant la production hépatique de SHBG. En revanche, le traitement par la metformine n'améliore pas significativement l'IMC, ni le rapport taille/hanches. La meilleure prise en charge nutritionnelle explique les effets bénéfiques rapportés dans les différentes études (64).

Ses effets secondaires, bien que bénins (nausées, diarrhée) et réversibles, peuvent être à l'origine d'une mauvaise observance. Il est donc nécessaire d'en informer les patientes et conseillé d'introduire le traitement à posologie croissante, pendant ou après les repas. La posologie optimale est de 500 mg trois fois/jour ou 850 mg matin et soir.

Efficacité

Au début des années 2000, deux méta-analyses ont conclu à une efficacité de la metformine versus un placebo : ovulation chez 50 % des patientes (65) et taux d'ovulation multiplié par quatre (66). Cependant, bien que les taux de grossesse n'aient pas été significativement améliorés, ces données ont jeté le doute sur la place classiquement attribuée au CC comme traitement de première intention.

Plusieurs études prospectives randomisées ont, de ce fait, comparé l'efficacité de la metformine et du CC. Dans la première étude (67) analysant les effets de la metformine et ceux de fortes doses de CC (150 mg/jour) administrés en première intention pendant 6 mois à des patientes anovulatoires non obèses (IMC < 30), il a été rapporté des taux d'ovulation non significativement différents. Cependant, les taux de grossesse évolutive par cycle et les taux cumulatifs de grossesse étaient significativement supérieurs chez les patientes recevant la metformine du fait, principalement, d'une réduction des taux de fausse couche spontanée.

Cependant, ces conclusions favorables à la metformine n'ont pas été confirmées par deux études récentes réalisées en Europe (68) et aux États-Unis (69). En effet, l'analyse d'un nombre important de cycles, avec un protocole proposant une augmentation progressive des doses de metformine et de CC sur six cycles a montré, de manière définitive, que les taux d'ovulation, de grossesse et de naissance étaient significativement supérieurs avec le CC qu'avec la metformine. Néanmoins, les taux de grossesses multiples paraissaient plus élevés chez les patientes traitées par le CC. On peut donc conclure que le CC doit être toujours considéré comme le traitement de première intention dans l'anovulation chronique en rapport avec un SOPK.

Dans l'étude américaine, cette conclusion est valide quel que soit l'IMC des patientes.

L'efficacité de la metformine est-elle dépendante de l'IMC ? La question n'est pas close. En effet, si la metformine améliore les taux d'ovulation chez les patientes obèses en association à une réduction des taux de leptine (70), elle est également efficace chez les patientes non obèses et sans insulino-résistance (71). De plus, une tendance à l'amélioration des taux de grossesses au décours de cycles de FIV/micro-injection intracytoplasmique (ICSI) a été rapportée chez les seules patientes de poids normal (72).

Il a été suggéré d'associer la metformine au CC, notamment en cas de résistance au CC (65, 66). L'étude américaine (69) met également en évidence un taux d'ovulation significativement supérieur avec l'association qu'avec le CC seul. Cependant, il reste à préciser si cette association peut bénéficier à l'ensemble des patientes SOPK ou seules présentant une obésité morbide (IMC > 35) ou une résistance au CC qui sont, en général, les plus hyperinsuliniques et hyperandrogéniques.

Metformine et fausses couches spontanées

Chez les patientes SOPK, le taux de fausses couches spontanées précoces (30 à 50 %) est d'environ trois fois supérieur à celui de la population générale. Les mécanismes invoqués sont un rôle délétère de l'hyperandrogénie et/ou de l'insulino-résistance. L'administration de metformine a donc été proposée afin de diminuer l'incidence des FCS. Les études publiées, portant sur de petits effectifs, tendent à montrer une diminution du taux de FCS précoces lorsque la metformine est poursuivie pendant le 1^{er} trimestre de grossesse (73, 74) mais ceci n'est pas confirmé dans l'étude américaine (69). Par ailleurs, bien que la metformine soit considérée comme non tératogène chez l'animal, son utilisation chez la femme enceinte pose problème en l'absence d'innocuité prouvée. En l'état actuel des connaissances, son utilisation n'est pas recommandée pendant la grossesse.

Thiazolidinediones

Les thiazolidinediones, autres agents antidiabétiques actuellement disponibles, se lient au récepteur PPAR gamma et diminuent l'insulino-résistance périphérique en améliorant l'action de l'insuline au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux. Comme la metformine, ils agissent également sur la stéroïdogenèse ovarienne, mais la diminution des taux d'androgènes est également due à la diminution des taux d'insuline (75). Cependant, la prise de poids habituellement observée en limite l'utilisation chez les patientes SOPK.

La troglitazone, efficace sur les taux d'ovulation chez les patientes SOPK obèses (76) a été retirée

du marché en raison de la survenue de nécrose hépatique sévère.

La rosiglitazone (Avandia®) et la pioglitazone (Actos®) sont actuellement disponibles. La rosiglitazone améliore les taux d'ovulation spontanée chez les patientes obèses ayant une insulino-résistance sévère (77) mais également chez les patientes non obèses (78). Cependant, en pratique, les thiazolidinediones n'ayant pas l'AMM dans cette indication sont peu utilisées.

Inhibiteurs de l'aromatase

Récemment proposés pour l'induction de l'ovulation, les inhibiteurs de l'aromatase réduisent la production des œstrogènes à partir des androgènes par une inhibition de l'action de l'aromatase, étape limitante de cette voie de synthèse. Ils permettent ainsi une libération de la FSH endogène. À la différence du CC, le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur la FSH est préservé, ce qui limite le risque théorique de développement multifolliculaire. Du fait de l'absence d'effets anti-œstrogéniques, ils n'auraient pas les effets délétères sur la glaire et l'endomètre, habituellement observés avec le CC. Il s'agit donc de molécules intéressantes au plan théorique. Deux études publiées par le même groupe ont conclu à une absence de différence entre le létrozole et le CC (79) mais à un avantage de l'anastrozole sur le CC (80). Ces données confirment, en partie, le potentiel des inhibiteurs de l'aromatase quant à leur capacité à réduire le nombre de follicules en croissance, à améliorer l'épaisseur de l'endomètre. De plus, une analyse de 1 387 cycles comparant le létrozole à la FSH seule ou associée au CC confirme que les inhibiteurs de l'aromatase peuvent trouver une place chez les patientes SOPK (81).

Cependant, l'incidence anormalement élevée de malformations de l'appareil locomoteur et d'anomalies cardiaques a conduit l'industrie pharmaceutique à émettre un avertissement concernant son utilisation dans le cadre de l'induction d'ovulation. Même si des données récentes sont plus rassurantes, la plus grande prudence s'impose donc et des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer leur potentiel tératogène.

Stimulation par les gonadotrophines

En cas de résistance au CC ou d'absence de grossesse après six cycles de CC, une stimulation par les gonadotrophines est classiquement recommandée en deuxième intention. Elle peut être associée à un risque important de complications telles que l'hyperstimulation ovarienne mais, surtout, les

grossesses multiples (82). De plus, le coût est plus élevé qu'avec le CC. Il convient donc de trouver le bon équilibre entre une optimisation des chances de conception et une réduction du risque de complications.

Efficacité

La stimulation ovarienne par les gonadotrophines permet d'obtenir des cycles ovulatoires dans 60 à 70 % des cas. Les taux de grossesses cumulatifs après sept cycles de traitement sont de l'ordre de 55 % (83). Chez les patientes SOPK, la stimulation doit être particulièrement prudente en raison de la difficulté d'obtenir une stimulation mono- ou bifolliculaire.

Différents protocoles de stimulation

Afin d'éviter le risque de développement multifolliculaire, il est important d'évaluer, lors du premier cycle de stimulation, la valeur seuil de FSH permettant le recrutement des follicules les plus sensibles de la cohorte. Imani *et al.* (84) ont mis en évidence plusieurs facteurs prédictifs du seuil de FSH : l'IMC, la résistance au CC, le taux plasmatique d'IGF1 et la concentration de FSH. L'évaluation du terrain est donc essentielle pour déterminer la dose de départ (50 à 75 UI) qui doit se situer, par prudence, légèrement en dessous de la valeur seuil estimée de FSH.

Il est actuellement bien démontré que la manière de conduire la stimulation est un facteur essentiel pour prévenir une éventuelle réponse multifolliculaire. Plusieurs protocoles ont été évalués (fig. 2).

Le protocole *step-up* consiste à administrer des doses progressivement croissantes de FSH jusqu'à l'apparition du (ou des) follicule(s) recruté(s), repérable(s) à l'échographie par son (leur) diamètre de 10 mm environ. Après un contrôle au 7^e jour de stimulation, si un follicule de 10 mm est apparu, la même dose de FSH est maintenue jusqu'au déclenchement de l'ovulation. En l'absence de repérage échographique d'un follicule de 10 mm, selon le principe du protocole *chronic low dose*, la dose de départ est maintenue 14 jours avant d'être augmentée de 50 % par paliers de sept jours. Cette approche extrêmement prudente se justifie par le fait que les protocoles *low dose*, avec ajustement (50 ou 100 %) de la dose initiale après seulement sept jours de stimulation, ont conduit à des taux inacceptables de grossesse multiple et d'hyperstimulation. Une revue regroupant 11 études (85) utilisant un protocole *step up low dose* a montré qu'une ovulation mono-folliculaire est obtenue dans 70 % des cas et que le taux de grossesses par cycle est de 20 %. Le taux de grossesses multiples est faible (5,7 %) ainsi que celui d'hyperstimulation sévère (0,14 %).

Le protocole *step-down* consiste, au contraire, à donner une dose initiale de FSH élevée, supérieure au seuil de FSH de la plupart des follicules de la cohorte. Le recrutement est alors multifolliculaire. La posologie de FSH est secondairement réduite de moitié afin de diminuer le nombre de follicules en croissance et de favoriser l'atrésie des follicules de taille intermédiaire. Cette stratégie de diminution secondaire des doses de FSH est particulièrement recommandée lorsque le nombre de follicules sélectionnés est trop important.

Une étude multicentrique récente (86) comparant les protocoles *step-up* et *step-down* a mis en évidence que le protocole *step-up* permet d'obtenir davantage de cycles avec développement monofolliculaire que le protocole *step-down* qui expose au risque d'hyperstimulation. Le protocole *step-up chronic low dose* paraît donc être le « Gold Standard » même si la durée de la stimulation est supérieure à celle des protocoles *step-down*.

Le protocole séquentiel (87) consiste en une approche initiale de type *step up chronic low dose* permettant d'atteindre le seuil de FSH, suivie d'une approche de type *step down* lorsque le follicule dominant est sélectionné. Comparativement à un protocole *step up* classique, le nombre de follicules de taille intermédiaire est significativement diminué ainsi que le taux plasmatique d'œstradiol au moment du déclenchement.

En pratique clinique, il est ainsi recommandé de privilégier, pour le premier cycle de stimulation, une approche de type *step-up chronic low dose* qui permet de déterminer le seuil individuel de FSH. En deuxième intention, une approche de type *step-down* peut alors être proposée en choisissant une dose de départ légèrement supérieure à la dose seuil de FSH, déterminée durant le 1^{er} cycle.

Parmi les facteurs prédictifs de la réponse ovarienne à la FSH, des taux élevés de LH, de testostérone plasmatiques sont associés de façon significative à un risque de développement multifolliculaire (83).

En ce qui concerne le nombre optimal de follicules préovulatoires, la stimulation devrait être clairement à visée monofolliculaire chez les patientes jeunes (< 35 ans). Il en est de même en cas de contre-indication absolue à une grossesse multiple (malformation utérine, anomalie chromosomique, etc.). L'objectif devrait être bifolliculaire après échec préalable de plusieurs cycles de stimulation monofolliculaire.

L'adjonction de metformine à un traitement par les gonadotrophines pourrait permettre de réduire les doses de gonadotrophines, de diminuer la durée de la stimulation et d'obtenir plus de cycles à développement monofolliculaire qu'une stimulation par les gonadotrophines seules (88). Ces données préliminaires méritent confirmation.

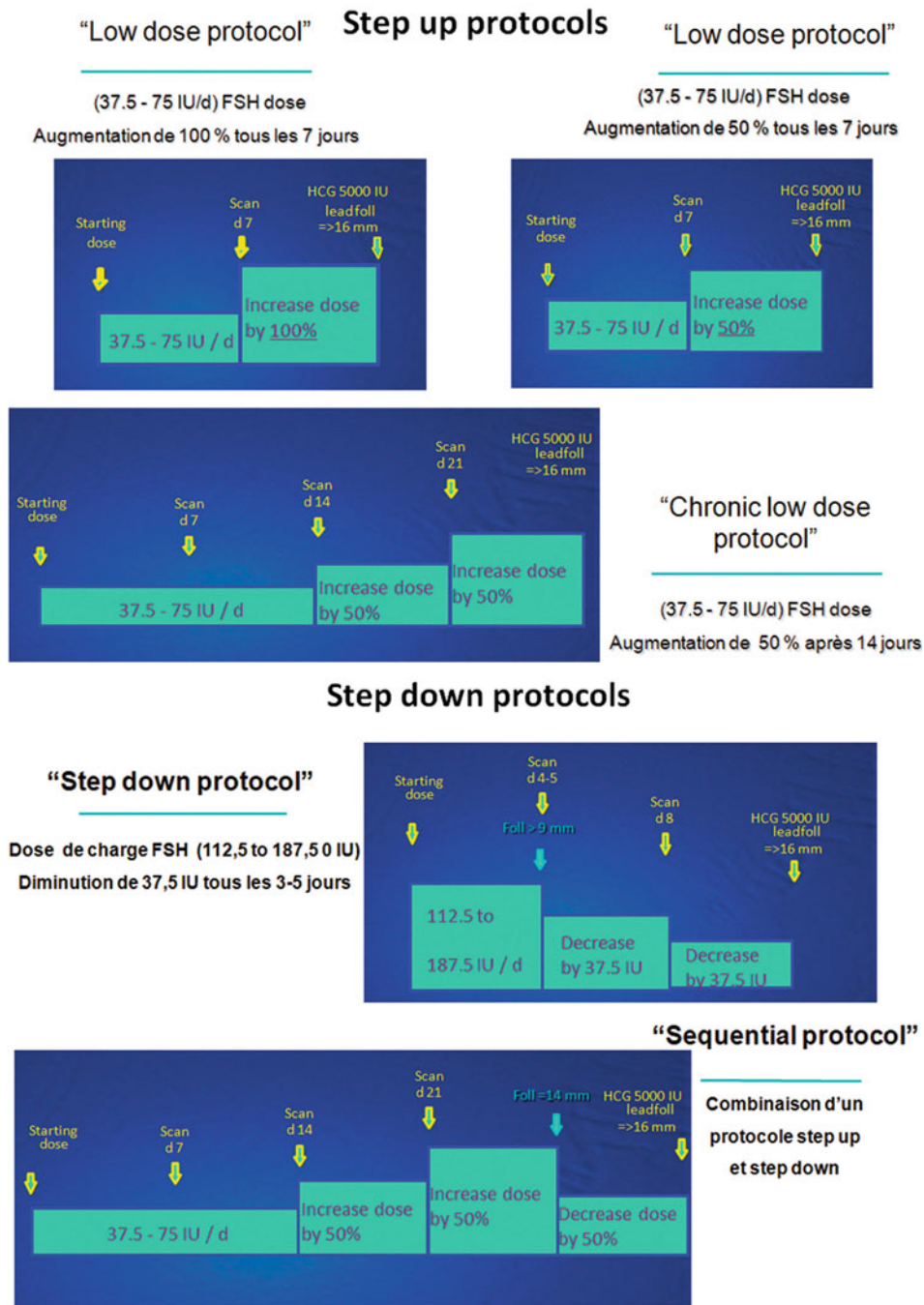


Fig. 2 – Les protocoles *step* en vue d'induction d'ovulation chez les patientes SOPK.

Drilling ovarien

C'est une technique de chirurgie ovarienne visant, dans sa description initiale par Stein et Leventhal, à une résection cunéiforme des ovaires par laparotomie (1). Par la suite, bien que différentes techniques habituellement réalisées par voie coelioscopique aient été rapportées, l'électrocoagulation monopolaire (dia-

thermie) et le laser sont recommandés à ce jour, sans différence apparente d'efficacité (89). Récemment, une nouvelle voie d'abord chirurgical moins invasive a été proposée : la fertiloscopie (90, 91). La plupart des investigateurs réalisent quatre à dix points de ponction, avec un risque, au-delà, d'insuffisance ovarienne prématurée (92, 93). L'expertise du chirurgien est essentielle pour le succès de cette technique.

Mode d'action

Le mode d'action du drilling ovarien n'est pas encore bien déterminé. Les taux sériques d'androgènes et notamment de testostérone diminuent rapidement après un drilling de l'ovaire ainsi que la LH plasmatique, tandis que la FSH plasmatique s'élève, normalisant ainsi le rapport FSH/LH. La diminution observée des taux plasmatiques d'œstradiol serait, quant à elle, liée à une diminution de l'activité aromatase intraovarienne.

Indications

L'indication princeps concerne les patientes PCOS anovulatoires et résistantes au CC. Le drilling semble également pouvoir être recommandé chez les patientes dont la LH plasmatique est augmentée en cycle spontané ou après administration de CC. Il peut être également proposé chez les patientes SOPK qui nécessitent une coelioscopie de bilan dans le cadre de leur infertilité ou qui habitent trop loin du centre qui prend en charge les inductions de l'ovulation. Cette technique chirurgicale ne permet pas de prévenir l'hyperstimulation par les gonadotrophines (94) et n'est pas indiquée pour traiter les troubles du cycle et l'hyperandrogénie chez les patientes non désireuses de conception (95).

Efficacité

Une étude observationnelle (96) réalisée chez 1 083 patientes SOPK anovulatoires traitées par différentes techniques (679 résections cunéiformes par laparotomie, 720 électrocoagulations par coelioscopie, 322 vaporisations au laser et 82 biopsies multiples coelioscopiques) a rapporté des taux d'ovulation spontanée de 80 % et de grossesse cumulé sur deux ans de 50 %.

Cependant, chez environ 50 % des patientes traitées par drilling ovarien, une thérapeutique adjuvante sera nécessaire pour obtenir des cycles ovulatoires. Il est recommandé d'introduire le CC après trois mois de suivi sans ovulation spontanée (97) et les gonadotrophines au sixième mois de suivi post-drilling (98).

L'analyse de cinq essais thérapeutiques (97-101) comparant l'efficacité du drilling et celle d'un traitement médical par gonadotrophines chez des patientes résistantes au CC n'a pu mettre en évidence de différence entre les taux de grossesse débutante et d'enfants nés dans les deux groupes (89). Cependant, les taux de grossesse multiple étaient significativement supérieurs chez les patientes traitées par les gonadotrophines, tandis que les taux de fausses couches précoces et d'hyperstimulation ovarienne étaient comparables.

Une analyse économique a montré que le drilling ovarien serait moins coûteux que la stimulation

par les gonadotrophines d'un tiers à 22 % selon la population étudiée (102, 103).

Les facteurs prédictifs de succès du drilling sont : un âge inférieur à 35 ans, des taux de LH > 10 UI/L et une durée d'infertilité relativement courte. À l'inverse, l'obésité (IMC élevé) et le tabagisme (plus de dix cigarettes par jour) diminuent les chances de succès (104).

L'efficacité du drilling ovarien a été également comparée à celle de la metformine dans une étude prospective randomisée (105) réalisée chez des patientes en surpoids et résistantes au CC. Les taux d'ovulation après un traitement de 6 mois par metformine étaient similaires à ceux obtenus dans les six mois suivant le drilling. Cependant, les taux de grossesse et de naissances vivantes étaient plus élevés chez les patientes ayant reçu la metformine principalement du fait d'un taux plus faible de fausses couches spontanées. Cette étude mérite confirmation sur un effectif plus large.

Complications du drilling ovarien

Les complications peropératoires sont rares. Deux cas d'hémorragies et un cas de perforation digestive ont été rapportés dans une série de 778 cas (106). Les risques à long terme incluent la formation d'adhérences et la survenue d'une ménopause précoce. Cependant, très peu d'études analysant les effets à long terme par une coelioscopie de second look ont été réalisées et les conclusions sont assez divergentes : 2 sur 17 (107) ou 100 % (108). Le risque d'insuffisance ovarienne prématurée est augmenté avec le nombre de points de ponction mais l'analyse à long terme est plutôt rassurante (109, 110). Ces données confirment que cette chirurgie doit être réalisée par les seuls chirurgiens expérimentés.

Insémination intra-utérine

Le traitement de l'anovulation est l'élément déterminant chez les patientes SOPK anovulatoires mais une insémination peut être associée s'il existe un facteur masculin modéré associé (110, 111). De même, en cas d'échec de plusieurs cycles de stimulation bien conduits, l'association à une insémination peut être considérée. Cependant, il n'existe aucune étude prouvant l'intérêt de cette stratégie. Les protocoles de stimulation doivent être extrêmement prudents et contrôlés par échographie. En effet, selon les quelques études publiées (112-114), les taux de grossesse par cycle sont satisfaisants mais ceux de grossesses multiples sont trop élevés.

Fécondation *in vitro*

Bien que l'anovulation ne soit pas une indication théorique de fécondation *in vitro* (FIV), cette thérapeutique alternative peut être considérée en cas d'anovulation persistante après traitement médical et/ou chirurgical. De plus, le risque de grossesse multiple associé aux traitements par les gonadotrophines a conduit à préconiser la FIV avec transfert d'un seul embryon (115). Enfin, en présence d'une pathologie associée (tubaire, endométriose sévère, infertilité masculine ou recours au DPI), la FIV ou l'ICSI sont d'emblée indiquées.

Protocoles de FIV

Bien que de nombreux schémas de stimulation ovarienne aient été proposés (CC + hMG ; FSH ou hMG seules, agoniste ou antagoniste du GnRH), il n'existe pas d'études comparatives randomisées montrant la supériorité d'un protocole par rapport à un autre. Le risque d'hyperstimulation ovarienne naturellement redouté chez les patientes SOPK a conduit à proposer un « double freinage », associant une inhibition gonadotrope induite par un traitement œstroprogestatif et des agonistes du GnRH afin de diminuer la production de LH et d'androgènes (116). De même, l'utilisation d'un protocole antagoniste du GnRH paraît logique puisqu'il est associé à une réduction du risque d'OHSS (117). L'adaptation de la dose de gonadotrophines de départ en fonction de l'IMC est également un paramètre important pour la prévention de l'hyperstimulation (118).

En cas de réponse ovarienne excessive, le recours au *coasting* peut s'avérer nécessaire : cela consiste à suspendre les injections de gonadotrophines pendant quelques jours lorsque l'œstradiol plasmatique dépasse un certain seuil (3 000 à 5 000 Pg/mL selon les équipes) alors que les critères de déclenchement ne sont pas encore atteints.

Efficacité

Une méta-analyse récente (119) de neuf études a comparé les résultats obtenus après stimulation pour FIV chez 793 patientes SOPK et 1 116 patientes sans SOPK. Le taux d'annulation a été significativement augmenté chez les patientes SOPK (12,8 vs 4,1 %). Le nombre d'ovocytes obtenus par ponction était significativement plus important en cas de SOPK. Le taux de fécondation était similaire dans les deux groupes de même que le taux de grossesses cliniques par cycle initié. L'incidence des syndromes d'hyperstimulation était rarement rapportée. Ainsi, les résultats en FIV chez les patientes SOPK semblent équivalents à ceux des patientes contrôles mais le risque de complica-

tions, notamment d'hyperstimulation ovarienne doit être mieux évalué, de même que son rapport coût/efficacité. L'adjonction de metformine pourrait augmenter les taux de grossesse et réduire le risque d'OHSS (120), donnée intéressante à confirmer.

Une étude récente (121) suggère que le taux de fécondation pourrait être amélioré par la réalisation d'une ICSI mais des données complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer son éventuel bénéfice sur les taux de grossesse.

Maturation *in vitro*

La maturation *in vitro* (MIV) consiste à prélever les ovocytes issus de petits follicules antraux (2 à 7 mm) par ponction transvaginale écho-guidée, en l'absence de stimulation ovarienne. Les ovocytes sont ensuite mis en culture pendant 24 à 48 heures dans un milieu de culture spécifique jusqu'à la maturation des ovocytes au stade métaphase II. Les ovocytes matures obtenus sont fécondés par ICSI. Parallèlement, la patiente reçoit un traitement par estrogènes auquel on ajoute ensuite de la progestérone, ce qui permet de préparer l'endomètre à l'implantation. Deux à trois embryons sont ensuite transférés. L'avantage majeur de cette technique est de prévenir totalement le risque d'hyperstimulation ; de plus, ce traitement est moins coûteux qu'un traitement de stimulation ovarienne en vue d'une FIV. Les taux de grossesse par cycle atteignent jusqu'à 20 % (122). Mais le principal écueil pour les équipes pratiquant la MIV reste les taux insuffisants d'implantation (10 à 15 % dans les meilleures séries) (123). De plus, nous manquons encore de données sur le devenir des enfants issus de cette technique. Ainsi, la maturation *in vitro* doit probablement être réservée à une population particulièrement à risque d'OHSS.

Stratégie d'induction de l'ovulation

La Conférence de consensus de Thessaloniki (55) a conduit aux recommandations suivantes pour la stratégie de prise en charge de l'anovulation des patientes SOPK :

- les mesures hygiéno-diététiques sont un préalable indispensable à tout traitement chez les patientes en surpoids ;
- le CC est le traitement de première intention ;
- l'adjonction de metformine au CC en cas d'échec du CC seul n'a pas fait la preuve de son efficacité en terme de taux de grossesse ;
- le drilling ovarien peut être proposé en l'absence de grossesse après traitement par CC et metformine, surtout si la LH sérique est élevée ;
- la stimulation par les gonadotrophines est recommandée en deuxième intention chez les

patientes résistantes au CC ou chez celles dont les cycles restent anovulatoires après drilling ovarien. Le protocole *step-up chronic low dose* avec un premier palier de 14 jours et une augmentation des doses par palier de sept jours est nécessaire pour évaluer la dose seuil de FSH. Une surveillance attentive est indispensable et les critères d'annulation de cycles doivent être respectés pour prévenir les risque de grossesse multiple et d'OHSS ;

- l'adjonction de metformine pourrait améliorer l'efficacité des gonadotrophines ;
- la FIV n'est proposée qu'en cas de pathologie associée ou d'échec des autres traitements. L'intérêt de réaliser une FIV après échec du CC chez les patientes de plus de 35 ans mérite d'être évalué.

Références

1. Stein IF, Leventhal ML (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *J Obstet Gynecol* 29: 181-91
2. Ehrmann DA (2005) Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352: 1223-36
3. Knochenhauer E, Key TJ, Kahsar-Miller M *et al.* (1998) Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3078-82
4. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL *et al.* (2000) A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2434-8
5. Kauffman RP, Baker VM, DiMarino P *et al.* (2002) Polycystic ovarian syndrome and insulin resistance in white and Mexican American women: a comparison of two distinct populations. *J Obstet Gynecol* 187: 1362-9
6. Williamson K, Gunn A, Johnson N, Milsom SR (2001) The impact of ethnicity on the presentation of polycystic ovarian syndrome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41: 202-6
7. Zawadzki JK, Dunaif A (1992) Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: *Polycystic Ovary Syndrome*. Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, eds. Boston: Blackwell Scientific: 377-84
8. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004 19: 41-7
9. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC (2002) New approaches to PCOS and other forms of anovulation. *Obstet Gynecol Surv* 57: 755-67
10. Slayden SM, Moran C, Sams Jr WM *et al.* (2002) Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril* 75: 889-92
11. Moran C, Knochenhauer E, Boots LR, Azziz R (1999) Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil Steril* 71: 671-4
12. Fauser BC, Pache TD, Lamberts SW *et al.* (1991) Serum bioactive and immunoreactive LH and FSH levels in women with cycle abnormalities, with or without PCOD. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 811-7
13. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall HJ *et al.* (1988) Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence of partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 165-72
14. Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES *et al.* (1999) Screening for 21-hydroxylase deficient non-classic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril* 72: 915-25
15. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D (2003) Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 9: 505-14
16. Bucket WM, Bouzayen R, Watkin KL *et al.* (2003) Ovarian stromal echogenicity in women with normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 18: 598-603
17. Dewailly D, Robert Y, Helin I *et al.* (1994) Ovarian stromal hypertrophy in hyperandrogenic women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 41: 557-62
18. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection (2002). Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106: 3143-421
19. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB (2000) Female partner. In: *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*. Cambridge University Press 40-67
20. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A (1989) Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38: 1165-74
21. Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E (2001). Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Physiol Endocrinol Metab* 281: 392-9
22. Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18: 774-800
23. Legro RS, Finegood D, Dunaif A (1998) A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2694-8
24. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP (2004) Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 59:141-54
25. Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Alexandraki K, Spina G (2004) Failure of mathematical indices to accurately assess insulin resistance in lean, overweight, or obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1273-6
26. Nestler JE, Powers LP, Matt DW *et al.* (1991) A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 83-9
27. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL *et al.* (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22: 141-6
28. Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 165-9
29. O'Meara NM, Blackman JD, Ehrmann DA *et al.* (1999) Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1241-7
30. Dunaif A, Finegood DT (1996) Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 942-7
31. Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM *et al.* (1995) Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome: relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 96: 520-7
32. Norman RJ, Masters L, Milner CR *et al.* (2001) Relative risk of conversion from normoglycemia to impaired glu-

- cose tolerance or non-insulin dependent diabetes mellitus in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 9: 1995-8
33. Glueck CJ, Wang P, Kobayashi S *et al.* (2002) Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 77: 520-5
34. Glueck CJ, Papanna R, Wang P *et al.* (2003) Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 52: 908-15
35. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S *et al.* (1992) Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction: evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71: 599-604
36. Orio Jr. F, Palomba S, Cascella T *et al.* (2004) Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4588-93
37. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M (2002) Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3871-5
38. Orio Jr. F, Palomba S, Spinelli L *et al.* (2004) The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3696-701
39. Talbott E, Guzick D, Clerici A *et al.* (1995) Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 821-6
40. Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P (2000) Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Hum Fertil* 3: 101-5
41. Legro RS (2003) Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association? *Endocr Rev* 24: 302-12
42. Vgontzas AN, Legro RS, Bixler EO *et al.* (2001) Polycystic ovary syndrome is associated with obstructive sleep apnea and daytime sleepiness: role of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 517-20
43. Fogel RB, Malhotra A, Pillar G *et al.* (2001) Increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1175-80
44. Gopal M, Duntley S, Uhles M, Attarian H (2002) The role of obesity in the increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in patients with polycystic ovary syndrome. *Sleep Med* 3: 401-4
45. Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W (2003) Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet* 361: 1810-2
46. Balen A (2001) Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum Reprod Update* 7: 522-5
47. Diamanti-Kandarakis E, Baillargeon JP, Iuorno MJ *et al.* (2003) A modern medical quandary: polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and oral contraceptive pills. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1927-32
48. Golland IM, Elstein ME (1993) Results of an open one-year study with Diane-35 in women with polycystic ovarian syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 687: 263-71
49. Guido M, Romualdi D, Giuliani M *et al.* (2004) Drosiprenone for the treatment of hirsute women with polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrinological, metabolic pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2817-23
50. Huber-Buchholz MM, Carey DG, Norman RJ (1999) Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1470-4
51. Hoeger KM, Kochman L, Wixom N *et al.* (2004) A randomized, 48-week, placebo-controlled trial of intensive lifestyle modification and/or metformin therapy in overweight women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Fertil Steril* 82: 421-9
52. Crosignani PG, Colombo M, Vegetti W *et al.* (2003) Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Hum Reprod* 18: 1928-32
53. Goodyear LJ, Kahn BB (1998) Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49: 235-61
54. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE *et al.* (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403
55. The Thessaloniki ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2008) Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 89: 505-522
56. Beck JI, Boothroyd C, Proctor M *et al.* (2005) Oral anti-estrogens and medical adjuncts for subfertility associated with anovulation. *Cochrane Database Syst Rev* (CD002249)
57. Imani B, Eijkemans MJ, Te Velde ER *et al.* (1998) Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotrophic oligomenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 236-65
58. Imani B, Eijkemans MJ, Te Velde ER *et al.* (2000) Free, rogen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotrophic oligomenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 676-82
59. Imani B, Eijkemans MJ, Te Velde ER *et al.* (1999) Predictors of chances to conceive in ovulatory patients during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotrophic oligomenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1617-22
60. Branigan EF, Estes MA (2003) A randomized clinical trial of treatment of clomiphene citrate-resistant anovulation with the use of oral contraceptive pill suppression and repeat clomiphene citrate treatment. *J Obstet Gynecol* 188: 1424-8
61. Klip A, Leiter LA (1990) Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care* 13: 696-704
62. Mansfield R, Galea R, Brincat M *et al.* (2003) Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril* 79: 956-62
63. Attia GR, Rainey WE, Carr BR (2001) Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 76: 517-24
64. Crave JC, Fimbel S, Lejeune H *et al.* (1995) Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2057-62
65. Kashyap S, Wells GA, Rosenwaks Z (2004) Insulin-sensitizing agents as primary therapy for patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 19: 2474-83
66. Lord JM, Flight IH, Norman RJ (2003) Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327: 951-6
67. Palomba S, Orio Jr. F, Falbo A *et al.* (2005) Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4068-74
68. Moll E, Bossuyt PM, Korevaar JC *et al.* (2006) Effect of clomifene citrate plus metformin and clomifene citrate plus placebo on induction of ovulation in women with newly diagnosed polycystic ovary syndrome: randomised double blind clinical trial. *BMJ* 332: 1485

69. Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD *et al.* (2007) Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 356: 551-66
70. Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Tomas C *et al.* (1998) Decreased serum leptin concentrations during metformin therapy in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2566-8
71. Baillargeon JP, Jakubowicz DJ, Iuorno MJ *et al.* (2004) Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril* 82: 893-902
72. Kjotrod SB, von Düring V, Carlsen SM (2004) Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized, double blind study. *Hum Reprod* 19: 1315-22
73. Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S *et al.* (2002) Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 524-9
74. Glueck CJ, Phillips H, Cameron D *et al.* (2001) Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 75: 46-52
75. Seto-Young D, Paliou M, Schlosser J *et al.* (2005) Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6099-105
76. Azziz R, Ehrmann D, Legro RS *et al.* (2001) Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1626-32
77. Sepilian V, Nagamani M (2005) Effects of rosiglitazone in obese women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 60-5
78. Belli SH, Graffigna MN, Oneto A *et al.* (2004) Effect of rosiglitazone on insulin resistance, growth factors, and reproductive disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 624-9
79. Badawy A, Abdel Aal I, Abulatta M (2009) Clomiphene citrate or letrozole for ovulation induction in women with polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 92: 849-52
80. Badawy A, Abdel Aal I, Abulatta M (2009) Clomiphene citrate or anastrozole for ovulation induction in women with polycystic ovarian syndrome: a prospective controlled trial. *Fertil Steril* 92: 860-3.
81. Ganesh A, Goswamy SK, Chattopadhyay R *et al.* (2009) Comparison of letrozole with continuous gonadotropins and clomiphene-gonadotropin combination for ovulation induction in 1387 PCOS women after clomiphene citrate failure: a randomized prospective clinical trial. *J Assist Reprod Genet* 26: 19-24
82. Fauser BC, Van Heusden AM (1997) Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 18: 71-106
83. Mulders A, Eijkemans MJ, Imani B, Fauser BC (2003) Prediction of chances for success or complications in gonadotropin ovulation induction in normogonadotropic anovulatory infertility. *RBM Online* 7: 170-8
84. Imani B, Eijkemans MJ, Faessen GH *et al.* (2002) Prediction of the individual follicle-stimulating hormone threshold for gonadotropin induction of ovulation in normogonadotropic anovulatory infertility: an approach to increase safety and efficiency. *Fertil Steril* 77: 83-90
85. Homburg R, Howles CM (1999) Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. *Hum Reprod Update* 5: 493-9
86. Christin-Maitre S, Hugues JN, Recombinant FSH Study Group (2003) A comparative randomized multicentric study comparing the step-up versus step-down protocol in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 18: 1626-31
87. Hugues JN, Cedrin-Durnerin I, Avril C *et al.* (1996) Sequential step-up and step-down dose regimen: an alternative method for ovulation induction with follicle-stimulating hormone in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 11: 2581-4
88. Palomba S, Falbo A, Orio Jr. F *et al.* (2005) A randomized controlled trial evaluating metformin pre-treatment and co-administration in non-obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome treated with controlled ovarian stimulation plus timed intercourse or intrauterine insemination. *Hum Reprod* 20: 2879-86
89. Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, Vandekerckhove P (2007) Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD001122
90. Watrelot A, Dreyfus JM, Andine JP (1999) Evaluation of the performance of fertiloscopy in 160 consecutive infertile patients with no obvious pathology. *Hum Reprod* 14: 707-11
91. Fernandez H, Alby JD, Gervaise A *et al.* (2001) Operative transvaginal hydrolaparoscopy for treatment of polycystic ovary syndrome: a new minimally invasive surgery. *Fertil Steril* 75: 607-11
92. Amer SA, Li TC, Cooke ID (2003) A prospective dose-finding study of the amount of thermal energy required for laparoscopic ovarian diathermy. *Hum Reprod* 18: 1693-8
93. Malkawi HY, Qublan HS, Hamaideh AH (2003) Medical vs. surgical treatment for clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol* 23: 289-93
94. Rimington MR, Walker SM, Shaw RW (1997) The use of laparoscopic ovarian electrocautery in preventing cancellation of in-vitro fertilization treatment cycles due to risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 12: 1443-7
95. Balen A (2006) Surgical management of PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 271-80
96. Campo S (1998) Ovulatory cycles, pregnancy outcome and complications after surgical treatment of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Surv* 53: 297-308
97. Bayram N, van Wely M, Kaaijk EM *et al.* (2004) Using an electrocautery strategy or recombinant follicle stimulating hormone to induce ovulation in polycystic ovary syndrome: randomised controlled trial. *BMJ* 328: 192
98. Lazovic G, Milacic D, Terzic M *et al.* (1998) Medicaments or surgical therapy of PCOS. *Fertil Steril* 70 (Suppl): S472
99. Farquhar CM, Williamson K, Guder G *et al.* (2002) A randomized controlled trial of laparoscopic ovarian diathermy versus gonadotropin therapy for women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 78: 404-11
100. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O (2005) Evaluation of a new surgical approach for the treatment of clomiphene citrate-resistant infertility in polycystic ovary syndrome: laparoscopic ovarian multi-needle intervention. *J Minim Invasive Gynecol* 12: 355-8
101. Vegetti W, Ragni G, Baroni E *et al.* (1998) Laparoscopic ovarian versus low-dose pure FSH in anovulatory clomiphene-resistant patients with polycystic ovarian syndrome: randomized prospective study [abstract]. *Hum Reprod* 13: 120
102. Farquhar CM, Williamson K, Brown PM, Garland J (2004) An economic evaluation of laparoscopic ovarian diathermy versus gonadotropin therapy for women with clomiphene citrate resistant polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 19: 1110-5

103. van Wely M, Bayram N, van der Veen F, Bossuyt PM (2004) An economic comparison of a laparoscopic electrocautery strategy and ovulation induction with recombinant FSH in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 19: 1741-5
104. Amer SA, Li TC, Ledger WL (2004) Ovulation induction using laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovarian syndrome: predictors of success. *Hum Reprod* 19: 1719-24
105. Palomba S, Orio Jr F, Nardo LG *et al.* (2004) Metformin administration versus laparoscopic ovarian diathermy in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome: a prospective parallel randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4801-9
106. Cohen J, Audebert A (1989) De la "mécanique" au fonctionnel : place des traitements chirurgicaux. In : *Dystrophies ovariennes*. Paris, Masson 183-92
107. Gurgan T, Urman B, Aksu T *et al.* (1992) The effect of short-interval laparoscopic lysis of adhesions on pregnancy rates following Nd-YAG laser photocoagulation of polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 80: 45-7
108. Greenblatt EM, Casper RF (1993) Adhesion formation after laparoscopic ovarian cautery for polycystic ovarian syndrome: lack of correlation with pregnancy rate. *Fertil Steril* 60: 766-70
109. Amer SA, Banu Z, Li TC, Cooke ID (2002) Long-term follow-up of patients with polycystic ovary syndrome after laparoscopic ovarian drilling: endocrine and ultrasonographic outcomes. *Hum Reprod* 17: 2851-7
110. Kaaijk EM, Hamerlynck JV, Beek JF, van der Veen (1999) Clinical outcome after unilateral oophorectomy in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 14: 889-92
111. Cohlen BJ, Vandekerckhove P, de Velde ER, Habbema JD (2000) Timed intercourse versus intra-uterine insemination with or without ovarian hyperstimulation for subfertility in men. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD000360
112. Gerli S, Casini ML, Unfer V *et al.* (2004) Recombinant versus urinary follicle-stimulating hormone in intrauterine insemination cycles: a prospective, randomized analysis of cost effectiveness. *Fertil Steril* 82: 573-8
113. Mitwally MF, Casper RF (2004) Aromatase inhibition reduces the dose of gonadotropin required for controlled ovarian hyperstimulation. *J Soc Gynecol Investig* 11: 406-15
114. Palomba S, Falbo A, Orio F Jr *et al.* (2005) A randomized controlled trial evaluating metformin pre-treatment and co-administration in non-obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome treated with controlled ovarian stimulation plus timed intercourse or intrauterine insemination. *Hum Reprod* 20: 2879-86
115. Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C *et al.* (2007) A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 369: 743-9
116. Damaro MA, Barmat L, Liu HC *et al.* (1997) Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing-hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients. *Hum Reprod* 12: 2359-65
117. Griesinger G, Diedrich K, Tarlatzis BC, Kolibianakis EM (2006) GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 13: 628-38
118. Kolibianakis E, Zikopoulos K, Albano C *et al.* (2003) Reproductive outcome of polycystic ovarian syndrome patients treated with GnRH antagonists and recombinant FSH for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 7: 313-8
119. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG *et al.* (2006) A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 12: 13-21
120. Tang T, Glanville J, Orsi N *et al.* (2006) The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 21: 1416-25
121. Hwang JL, Seow KM, Lin YH *et al.* (2005) IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 20: 1261-5
122. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK *et al.* (2002) A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 100: 665-70
123. Chian RC, Buckett WM, Tan SL (2004) In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 8: 148-66

M. Grynberg et R. Fanchin

Évaluation du statut folliculaire ovarien

Introduction

L'évaluation du statut folliculaire ou réserve ovarienne constitue le préambule indispensable à toute prise en charge en assistance médicale à la procréation, permettant de guider la prise en charge thérapeutique. En effet, cette réserve ovarienne, ou âge fonctionnel ovarien, inclut à la fois un aspect quantitatif, caractérisé par la taille du pool folliculaire restant, et un aspect qualitatif relatif aux ovocytes. Le déclin de cette réserve, étroitement corrélé au vieillissement ovarien, est responsable d'une baisse de la fertilité par réduction du nombre des follicules primordiaux et altération de la qualité ovocytaire.

La réserve ovarienne qui se constitue au cours de la vie fœtale ne va cesser de décroître jusqu'à l'âge de la ménopause, avec une accélération de la vitesse de décroissance après 38 ans (1). L'âge des femmes lors de la première grossesse reculant, la proportion de femmes âgées de plus de 38 ans prises en charge pour infertilité ne cesse d'augmenter. Dans ce contexte, une évaluation optimale de la réserve ovarienne s'avère nécessaire afin d'apprécier au mieux la capacité ovarienne à répondre aux stimulations et de choisir le protocole le plus approprié. L'évaluation de la réserve est basée sur des données cliniques, des paramètres hormonaux et échographiques. Ces différents marqueurs n'ont pas tous la même valeur pronostique. Il est nécessaire de souligner le fait que ces critères ont tous été étudiés chez des femmes infertiles, prises en charge dans des centres de d'assistance médicale à la procréation. Il n'existe pas de données chez des femmes normalement fertiles.

Âge

La fertilité de la femme diminue progressivement avec l'âge (2). Ce phénomène a pour origine l'épuise-

ment de la réserve ovarienne par entrée des follicules en apoptose ou en croissance (3), car la réceptivité utérine ne semble pas s'altérer avec le temps (4). Les travaux de Block, réalisés à partir d'ovaires prélevés au cours d'autopsie, illustrent bien la perte folliculaire avec le vieillissement chez la femme (5). En effet, le nombre médian de follicules décroît de 104 000 chez la femme de 20 ans, à 33 000 chez la femme de 30 ans, puis à 7 900 chez la femme de 40 ans. La taille de la réserve diminue de façon relativement constante jusqu'à l'âge de 37-38 ans puis de manière plus accélérée jusqu'à la ménopause (1). Cette accélération se produit lorsque le nombre de follicules est voisin de 25 000 (1). Bien que ses causes restent inconnues, elle coïncide avec la diminution progressive de la fertilité. Néanmoins, cette diminution peut se manifester beaucoup plus tôt, à partir de l'âge de 30 ans, ou avant, mais d'une manière moins prononcée (6). Finalement, bien que très variable d'une femme à l'autre, l'âge médian d'« arrêt » de la fertilité se situerait vers 40-41 ans (7), avec des limites très larges.

Lorsqu'une AMP doit être envisagée, l'évaluation précise du statut folliculaire ovarien constitue un préalable. Elle a pour but de bien informer le couple sur ses chances de procréer et de lui proposer la meilleure alternative thérapeutique. Il faut cependant remarquer que le recours aux techniques d'AMP touche surtout les femmes infertiles ayant dépassé la trentaine et dont la fonction ovarienne est susceptible d'être déjà altérée. En effet, le vieillissement ovarien quantitatif, mais aussi qualitatif, est reconnu comme étant le facteur le plus limitant en AMP (8). Le vieillissement ovarien peut se manifester de manière discrète par des anomalies minimes du cycle, sans que le caractère ovulatoire de celui-ci soit altéré. Ce phénomène est alors appelé syndrome d'insuffisance ovarienne « dissimulée ». Il inclut l'infertilité et l'élévation des concentrations de FSH chez des femmes ayant des cycles réguliers (9). Toutefois, dans l'estimation du

degré de vieillissement ovarien, l'âge de la femme, bien que souvent corrélé à la fertilité potentielle, s'avère parfois être un paramètre insuffisant et, dans certains cas, complètement dissocié de l'« âge » ovarien réel (10).

Afin de pallier la limitation diagnostique liée à l'âge, différentes approches cliniques et biologiques visant à quantifier le statut folliculaire ovarien ont été développées.

Caractéristiques menstruelles

Bien avant les premiers signes cliniques de la survenue de la ménopause, comme les irrégularités menstruelles majeures et l'anovulation, le vieillissement ovarien entraîne des modifications dans les caractéristiques du cycle menstruel. Elles sont souvent discrètes mais tout de même appréciables. La plus commune d'entre elles, qui doit être retenue sur le plan clinique, est sans doute la diminution de la durée moyenne des cycles (11). Elle se caractérise par un raccourcissement exclusif de la phase folliculaire (11-13), qui passe de 14,2 jours chez les femmes âgées de 18 à 24 ans à 10,4 jours chez les femmes âgées de 40 à 44 ans. La phase lutéale aurait, quant à elle, tendance à s'allonger légèrement chez la femme âgée (11) bien que cette notion reste encore discutée (13).

La diminution de la durée de la phase folliculaire pourrait résulter soit de la croissance accélérée (13), soit du développement précoce (11, 14) du follicule dominant jusqu'à l'ovulation. Le raccourcissement des cycles constitue un signe d'appel clinique important pour le diagnostic de l'insuffisance ovarienne « compensée » où le caractère ovulatoire des cycles est maintenu. Ce phénomène se traduit d'ailleurs par la diminution du nombre d'embryons et du taux de grossesse en FIV lorsque la durée modale des cycles est inférieure à 27 jours (15).

Dosages hormonaux

Aux perturbations de la croissance folliculaire liées au vieillissement ovarien évoquées ci-dessus s'associent, dans la majorité des cas, d'importantes perturbations hormonales. La plus caractéristique est l'élévation sélective ou « monotropique » de la FSH (16), celle de la LH n'ayant lieu que 5 à 10 ans plus tard. L'élévation des concentrations de FSH est vraisemblablement le résultat de l'exiguité de la cohorte de follicules sélectionnables disponibles. Le faible capital folliculaire détermine la baisse des concentrations circulantes d'inhibine B pendant la phase folliculaire (16-18), d'inhibine A produite

par le corps jaune pendant la phase lutéale (17), et des deux hormones pendant la transition lutéofolliculaire, avec pour conséquence l'augmentation des concentrations de FSH.

En pratique, chez la femme jeune, l'élévation intercyclique de FSH débute progressivement quelques jours avant la lutéolyse complète et la survenue des règles. Bien que les causes à ce phénomène restent indéterminées, il est concevable que la diminution progressive de la production d'hormones à forte activité antigonadotrope, en particulier, l'inhibine A et l'estradiol, par le corps jaune entraîne l'élévation de la FSH endogène avant que les menstruations n'interviennent suite à l'effondrement de la progestérone. Il est d'ailleurs fort possible que cette élévation commence encore plus tôt chez les patientes âgées ou ayant des ovaires vieillissants (11), probablement due à un mauvais fonctionnement endocrinien du corps jaune, avec pour conséquence une croissance folliculaire antrale prématurée chez ces individus (14).

Le développement précoce et/ou accéléré des follicules au cours de la transition lutéofolliculaire semble contribuer à la production d'estradiol en début de phase folliculaire. Ce phénomène a été rapporté chez les patientes qui présentent un déclin de leur potentiel ovarien (19), d'où l'intérêt de retenir le taux circulant d'estradiol comme marqueur biologique du potentiel ovarien. Il est important de souligner que, chez les femmes dotées d'une réserve ovarienne d'effectif normal, les follicules sélectionnables n'expriment pas de P450_{arom} et ne produisent pas d'estradiol avant d'avoir atteint une taille de 8-10 mm (20). Ce déficit enzymatique explique pourquoi les femmes normales sont peu estrogénisées pendant les premiers jours de la phase folliculaire, tandis que les femmes présentant au moins un follicule ayant atteint la taille critique proche de 8-10 mm produiront beaucoup d'estradiol pendant cette période (19).

Ainsi, c'est sur les rapports entre les concentrations des hormones ovariennes, en particulier inhibine B et estradiol, et hypophysaires, en particulier FSH, dosées pendant la transition lutéofolliculaire, que reposent les tests hormonaux utilisés pour l'évaluation du statut folliculaire. D'une façon schématique, ils analysent la capacité des follicules sélectionnables à produire de l'inhibine B et peuvent refléter la présence précoce d'un follicule sélectionné synthétisant de l'estradiol en réponse à l'élévation intercyclique de FSH.

Approches hormonales « statiques »

Les premières études cliniques montrant l'importance des dosages sanguins de FSH en début de phase folliculaire pour évaluer le statut folliculaire

ovarien ont été réalisés par le groupe de Norfolk aux États-Unis à la fin des années 1980 (21, 22). Cette équipe a montré que la concentration de FSH mesurée au début de la phase folliculaire est prédictive de la réponse ovarienne à la stimulation et du pourcentage de grossesse obtenu en FIV (21, 22). Peu après, d'autres auteurs ont montré que la concentration de FSH, dosée le 3^e jour du cycle, est un marqueur du statut folliculaire ovarien plus fiable que l'âge de la patiente (23) ou certainement complémentaire à ce dernier. C'est sur la base de ces données que de nombreux centres de médecine de la reproduction ont adopté l'utilisation systématique des dosages de FSH au 3^e jour du cycle pour établir le pronostic de fertilité ovarienne avant toute prise en charge en AMP.

Pourtant, quelques publications récentes ont mis en cause la valeur prédictive des concentrations de FSH au 3^e jour du cycle (24, 25) et la fiabilité diagnostique réelle de ce paramètre, par rapport à l'âge de la patiente (26). La place des dosages isolés de FSH comme facteur d'inclusion ou d'exclusion des patientes candidates à une AMP a ainsi fait l'objet d'un ajustement. Des études cliniques ultérieures ont montré que les dosages de FSH au 3^e jour du cycle renseigneraient plus sur l'effectif du patrimoine folliculaire que sur sa qualité (27, 28).

Ces dernières observations sont cependant contredites par le fait que l'élévation des taux circulants de FSH est associée à une augmentation correspondante des taux d'aneuploidie (29) et de fausses couches spontanées (30), suggérant bien que les dosages de FSH au 3^e jour du cycle pourraient renseigner sur la qualité ovocytaire. Pour d'autres auteurs, les dosages de FSH ont davantage de valeur chez la femme âgée de plus de 35 ans que chez les femmes plus jeunes (31), ce qui restaure la valeur pronostique du facteur âge. Enfin, une analyse récente portant sur 19 682 cycles de FIV a montré que les concentrations sanguines de FSH, et à un moindre degré d'estradiol, mesurées au 3^e jour du cycle, restent des paramètres prédictifs, fiables, et indépendants de l'âge pour l'obtention d'une grossesse (32).

Un autre point sensible relatif au dosage de FSH au 3^e jour du cycle concerne sa variabilité intercycle non négligeable (33), surtout chez les femmes âgées (33). Bien entendu, cette donnée contraste avec la relative stabilité à court terme du potentiel folliculaire ovarien et de la fertilité féminine (2). Toutefois, l'existence d'au moins un dosage anormal de FSH semblerait suffisante pour établir un mauvais pronostic et toute normalisation ultérieure des dosages sanguins de cette hormone ne saurait être rassurante (22).

Pour clarifier cet aspect, (34) Jurema *et al.* (2003) ont évalué, chez 230 patientes, la relation directe entre les concentrations de FSH au 3^e jour du cycle

et les résultats de la stimulation ovarienne réalisée au cours du même cycle. Ces auteurs ont ainsi pu confirmer la valeur pronostique, sur la réponse ovarienne à la stimulation et sur le taux de grossesse, de la concentration de FSH, mesurée au début de traitement. De plus, ils suggèrent que le fait d'attendre la normalisation éventuelle du dosage de FSH, appelée « fenêtre d'opportunité », avant de démarrer une stimulation ovarienne pour FIV, peut se révéler fructueuse. Toutefois, comme l'estradiol peut faire varier artificiellement la concentration de FSH, certains auteurs (35) contestent l'efficacité de la stratégie diagnostique proposée par Jurema *et al.* (34).

Par ailleurs, certaines dysynchronies de la croissance folliculaire observées pendant la transition lutéo-folliculaire semblent fournir une explication plausible à la controverse sur la valeur prédictive des dosages de FSH au 3^e jour du cycle. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines femmes, particulièrement celles qui souffrent d'un déficit ovarien, présentent une croissance accélérée (12) ou une sélection folliculaire précoce (11, 14) pendant la transition lutéo-folliculaire. Il en résulte que certains follicules sont anormalement développés en début de phase folliculaire. Or, plus un follicule sain est gros, plus il possède de cellules de la granulosa et, si c'est le follicule sélectionné, il exprime la P450_{arom} (20). Ces follicules sont alors capables de produire d'importantes quantités d'estradiol (36), et probablement d'inhibine B (37). Par conséquent, chez certaines femmes ayant un déficit folliculaire, il pourrait se produire une normalisation artificielle de leurs concentrations de FSH au 3^e jour du cycle résultant d'une production prématurée d'estradiol (38) et d'inhibine B.

Fanchin *et al.* ont tenté d'améliorer la coordination de la croissance folliculaire pendant la transition lutéo-folliculaire pour optimiser la valeur diagnostique des dosages hormonaux sur le statut folliculaire ovarien. L'administration d'estradiol en phase lutéale entraîne une diminution de la sécrétion de FSH qui ralentit la croissance des follicules sélectionnables et restaure la valeur prédictive des dosages de FSH et d'inhibine B réalisés au début de la phase folliculaire (39).

Au milieu des années 1990, d'autres paramètres hormonaux, destinés à évaluer le statut folliculaire ovarien, ont été étudiés. Sur la base des concepts discutés précédemment, certains auteurs ont proposé avec succès l'utilisation d'un dosage sanguin d'estradiol au 3^e jour du cycle pour prédire le statut folliculaire et la capacité de l'ovaire à répondre à une stimulation par les gonadotrophines exogènes (40). Pourtant, la valeur prédictive de la mesure exclusive de l'estradiol au 3^e jour du cycle n'a pu être confirmée par des publications ultérieures (41). Pour d'autres auteurs, la concentration d'estradiol

au 3^e jour ne présenterait d'intérêt que si elle est analysée conjointement avec la concentration de FSH (34). D'autre part, une étude rétrospective portant sur 2 476 patientes candidates à la FIV a mis en évidence que le dosage isolé de l'estradiol au 3^e jour n'est prédictif que du pourcentage d'annulations de la stimulation et que, chez les patientes ayant bénéficié d'un transfert embryonnaire, le taux de grossesse est indépendant de l'estradiolémie mesurée au début du cycle (42).

L'autre paramètre hormonal proposé dans l'évaluation du statut ovarien est l'inhibine B. Jusqu'à la fin des années 1980, le dosage sanguin de cette glycoprotéine et, par conséquent, l'étude de son rôle sur la sécrétion de FSH, ont été entravés par l'utilisation de dosages peu spécifiques (43). En effet, ces derniers présentaient d'importantes réactions croisées avec des précurseurs inactifs. En 1994, des techniques ELISA utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des deux différents types d'inhibine, la A et la B, ont été mis au point (37, 44). Ces dosages spécifiques ont permis d'approfondir notre connaissance de la sécrétion de ces protéines au cours du cycle menstruel (37) et de leur action sur la FSH (45).

L'utilisation clinique du dosage d'inhibine B pour évaluer le potentiel folliculaire ovarien a été proposée (46, 47), puisque la possibilité de mesurer une protéine produite par les cellules de la granulosa et régulée par FSH paraissait être une avancée diagnostique considérable. En effet, l'inhibine B est une glycoprotéine hétérodimérique constituée de deux sous-unités α et β , appartenant à la superfamille des TGF- β , produite par les cellules de la granulosa des follicules antraux et préantraux, cette production augmentant avec la croissance folliculaire. Cependant, la fiabilité des mesures d'inhibine B au 3^e jour du cycle en tant que marqueur du statut folliculaire ovarien a été mise en cause par la suite (48, 49). Récemment, une étude a montré que le dosage de l'inhibine B au 3^e jour du cycle était influencé par la taille des follicules antraux (50). Ainsi, une sélection folliculaire précoce, phénomène fréquemment retrouvé chez les patientes ayant une altération du statut folliculaire ovarien, peut altérer la relation attendue entre le nombre de follicules antraux visibles en échographie et le dosage d'inhibine B (50).

Approches hormonales « dynamiques »

Pour pallier l'insuffisance diagnostique des dosages hormonaux réalisés en début de phase folliculaire et d'augmenter leur valeur prédictive, certains auteurs ont proposé de recourir à des manipulations hormonales. Ainsi, le premier test « dynamique » pour évaluer le fonctionnement ovarien a été

proposé en 1987 (51). Basé sur l'action antiœstrogène du citrate de clomifène, il permet d'évaluer la capacité des follicules à produire de l'inhibine B, et donc à freiner l'élévation de la FSH endogène (51). Cependant, si certains auteurs lui accordent une valeur discriminante plus fine que les dosages de FSH au 3^e jour du cycle (52), d'autres auteurs la réfutent (53). Comme pour les autres paramètres hormonaux, les résultats du test au citrate de clomifène sont susceptibles de varier d'un cycle à l'autre (54), même si une bonne corrélation avec la réserve folliculaire analysée par histologie leur a été attribuée (55).

Par la suite, d'autres tests dynamiques ont été mis au point. De façon schématique, ils analysent la capacité de réponse des ovaires à la sécrétion de FSH endogène, comme celle résultant du « flare-up » produit par les agonistes de la GnRH, ou de l'action de la FSH exogène, décrite dans le test « EFORT » (56). La réponse ovarienne à FSH est alors évaluée par l'élévation de l'estradiolémie (56) ou de la concentration d'inhibine B (57). Ainsi, l'EFORT a été reconnu comme étant le marqueur le plus étroitement associé au nombre de follicules et à la capacité ovarienne de réponse à une stimulation, aussi bien chez les femmes normo-ovulantes (58) que chez celles qui présentent un dysfonctionnement ovarien comme dans le syndrome des ovaires polykystiques (59). De plus, le degré de variabilité intercyclique de l'EFORT semble être inférieur à celui des dosages isolés de FSH ou du test au citrate de clomifène (54).

Échographie ovarienne

L'observation des follicules ovariens par échographie est le fruit du développement, puis du perfectionnement technologique des sondes vaginales de haute fréquence. L'échographie a offert ainsi une alternative intéressante à l'histologie pour l'étude de certains aspects de la dynamique de la croissance folliculaire et du vieillissement ovarien. De nos jours, l'échographie ovarienne par voie vaginale est un outil précieux pour l'étude de la folliculogenèse terminale. Ainsi, certains auteurs ont pu dénombrer d'une façon simple et non invasive par échographie les follicules sélectionnables pour évaluer le degré de vieillissement ovarien (60) et, sur le plan clinique, la capacité de réponse ovarienne à la stimulation (61).

Le nombre de follicules sélectionnables est corrélé à l'âge (62, 63) et mieux corrélé que ce dernier à la réponse ovarienne après stimulation (64) et aux taux de grossesses obtenus en FIV (65). Il présente, lui aussi, des variations intercycliques perceptibles qui n'auraient pas d'impact significatif sur les résul-

tats de la stimulation ovarienne (66). On peut en conclure que les mesures répétées de ces effectifs folliculaires sont d'un intérêt discutable (67). Pour optimiser le compte des follicules sélectionnables à l'échographie, d'autres approches ont été proposées telles que l'échographie en trois dimensions (68), l'emploi des harmoniques tissulaires, technique qui augmente la résolution des images et facilite l'identification des limites folliculaires (69), et plus récemment des logiciels de mesure automatisée de follicules (Virtual Organ Computer-aided Analysis [VOCAL], Sonography-based Automated Volume Count [SonoAVC]) (70, 71). Une étude a récemment démontré la bonne reproductibilité de la mesure du volume folliculaire par les techniques de mesure automatisée, ouvrant de nouvelles perspectives dans l'évaluation échographique de la fonction ovarienne (72).

De plus, l'échographie permet également d'évaluer d'autres données potentiellement associées au statut folliculaire ovarien comme la perfusion stromale et périfolliculaire, souvent positivement associés à la réponse à la stimulation (73) et aux résultats de la FIV (74).

L'approche échographique pour la mesure de la réserve folliculaire présente des nombreuses limites. Les plus importantes d'entre elles résident dans son inaptitude à détecter la présence de follicules de plus petite taille que les follicules sélectionnables et dans son manque d'information qualitative sur les follicules observés.

Contraintes physiologiques des tests actuels

Le bref aperçu de la littérature concernant les approches cliniques et biologiques actuellement disponibles pour évaluer le statut folliculaire ovarien montre leur faible fiabilité diagnostique. En effet, tout indique que l'analyse des taux hormonaux mesurés en début de phase folliculaire, bien qu'utile, n'est pas suffisante (24, 25).

Comme nous l'avons vu précédemment, la croissance folliculaire terminale peut débiter, de façon prématurée, en fin de phase lutéale (11, 13, 14), en particulier chez les femmes présentant un déficit folliculaire. Ce phénomène est susceptible d'altérer la valeur prédictive des mesures hormonales (37), puisque alors le choix du 3^e jour du cycle pour effectuer des dosages hormonaux reflète mal les événements observés pendant la transition lutéo-folliculaire chez ces patientes. En outre, seuls les follicules dont la croissance est très dépendante de la FSH produisent, en réponse à cette hormone, des quantités mesurables de l'inhibine B (16-18, 37), et seul le follicule sélectionné possédant la P450_{arom} produit de l'estradiol (20). Il est donc fort possible que la triade hormo-

nale classique, représentée par les dosages de base ou dynamiques de FSH, d'inhibine B et d'estradiol, ne renseigne que sur le statut d'une petite fraction de la réserve totale, constituée par les plus grands follicules sélectionnables, voire par un follicule sélectionné pour ovuler quelques jours plus tard.

De même, l'approche échographique pour la mesure de la réserve folliculaire présente des nombreuses limites. Les plus importantes d'entre elles résident dans son inaptitude à détecter la présence de follicules de plus petite taille que les follicules sélectionnables et dans son manque d'information qualitative sur les follicules observés.

Hormone antimullérienne

L'hormone antimullérienne (AMH), également appelée *mullerian inhibiting substance* (MIS), est une glycoprotéine homodimérique de la superfamille du TGF- β (75). Le rôle physiologique princeps de l'AMH chez les mammifères concerne la différenciation sexuelle. Elle permet, chez les fœtus mâles, la régression des canaux de Muller, à l'origine chez les fœtus femelles, des trompes, de l'utérus, et de la partie supérieure du vagin. Chez la femme, cette glycoprotéine est exprimée exclusivement dans les cellules de la granulosa ovarienne (76) à partir de la 36^e semaine de vie intra-utérine jusqu'à la survenue de la ménopause (77). On observe une augmentation progressive de son expression entre la naissance et la puberté (77).

L'AMH est produite par un large éventail de follicules de manière croissante à partir du stade primaire (78) jusqu'au stade antral précoce (79-81). S'il a été démontré que, pendant la phase de maturation folliculaire finale, le follicule devient moins apte à exprimer l'AMH (79), pour certains auteurs son expression persisterait jusqu'au stade préovulatoire. Au sein de chaque follicule, l'AMH est souvent irrégulièrement exprimée.

Chez la femme, l'AMH pourrait jouer un rôle dans certains mécanismes clés de la folliculogenèse. Son rôle a été évoqué dans l'initiation de la croissance folliculaire puisqu'il existe une déplétion accélérée du stock de follicules primordiaux chez des souris AMH-déficientes par rapport à des souris contrôles (82). En outre, les souris AMH-déficientes présentent un nombre de follicules préantraux et à antrum débutant plus important que chez les contrôles. Ces résultats ont été confirmés par la suite dans des ovaires néonataux de souris cultivés en présence d'AMH une diminution de 40 à 50 % du nombre de follicules en croissance (80). L'ensemble de ces résultats suggère que l'AMH exerce une action paracrine inhibitrice sur l'initiation de la croissance folliculaire.

L'autre rôle possible de l'AMH serait l'inhibition de la croissance folliculaire induite par la FSH (83). Cette hypothèse peut expliquer que des souris AMH-déficientes possèdent plus de follicules en croissance que des souris contrôles, malgré des concentrations circulantes de FSH plus basses (82). De plus, la culture de follicules préantraux en présence d'AMH inhibe la prolifération des cellules de la granulosa induite par la FSH d'une manière temps-dépendante (83).

Ces résultats ont été néanmoins contestés par des travaux similaires réalisés chez la rate (84) et dans des conditions méthodologiques différentes (85). En outre, plus récemment, d'autres auteurs ont montré que, chez la femme, l'AMH pourrait, au contraire, exercer un effet stimulateur sur la croissance des follicules primaires après 4 semaines de culture (86). Ces résultats font appel à d'autres investigations pour établir le rôle exact de l'AMH sur la croissance folliculaire.

L'AMH exerce d'autres effets sur le follicule : suppression de la synthèse de l'enzyme P450^{arom} (87-89) et de l'expression des récepteurs à LH (rate, truie) (89). Ces résultats montrent que l'AMH est un inhibiteur de la différenciation des cellules de la granulosa induite par FSH. Ainsi, l'AMH jouerait un rôle non seulement dans le recrutement folliculaire initial (82) mais aussi dans le recrutement cyclique, au niveau des follicules plus développés (85). La mise en évidence de concentrations élevées d'AMH chez les femmes qui ont une altération importante de réponse folliculaire à la FSH, comme les patientes présentant un syndrome d'ovaires polykystiques (SOPK) (90-92), conforte cette hypothèse.

L'ensemble de ces données suggère que l'AMH maintient les follicules au repos. D'autres facteurs susceptibles d'être impliqués dans le maintien des follicules de la réserve au repos sont la somatostatine (93), et le TGF- β , en particulier le TGF- β 1 qui a la propriété de bloquer le système kit, et le TGF- β 2 qui peut amplifier l'action de la somatostatine.

Le besoin de trouver un marqueur du statut folliculaire ovarien qui soit à la fois fiable et facile à mesurer est donc toujours d'actualité. Ce marqueur idéal devrait renseigner non seulement sur l'effectif des follicules sélectionnables mais également sur celui des plus petits follicules en croissance basale. Il devrait être peu dépendant des oscillations des concentrations de FSH et insensible aux perturbations de la croissance folliculaire pouvant se produire pendant la transition lutéo-folliculaire du cycle menstruel chez certaines patientes.

D'un point de vue clinique, il existe au moins trois raisons pour considérer l'AMH comme un marqueur différent des paramètres hormonaux mentionnés précédemment.

- La première résulte du fait que cette hormone est produite par les follicules depuis le stade primaire (78) jusqu'au stade antral débutant chez la souris et la rate (79, 80) ou jusqu'à une taille comprise entre 2 et 4 mm chez la femme (81). Donc, le nombre de follicules qui synthétisent de l'AMH est plus important que celui de ceux qui produisent de l'inhibine B.
- La seconde raison repose sur des observations suggérant que cette molécule n'est pas régulée par FSH chez la femme. La production d'AMH par les follicules au stade de croissance basale (< 2 mm), dont le développement est peu dépendant de FSH, peut en effet suggérer que la production de cette molécule n'est pas stimulée par FSH (79, 94). En outre, chez un groupe de femmes ayant reçu, en début de phase folliculaire, 225 UI de FSH, aucune variation significative entre les concentrations d'AMH mesurées avant et 24 heures après l'injection n'a été observée (95).
- Enfin, les concentrations d'AMH au 3^e jour du cycle ne sont pas soumises aux variations inter-cycliques observées avec l'estradiol, l'inhibine B et la FSH (96).

Étant donné la faible production d'AMH chez la femme adulte, la mesure précise des concentrations de cette hormone dans le sang périphérique n'a été possible qu'après la mise au point d'une technique de dosage ELISA ultrasensible.

La première publication associant les concentrations sanguines d'AMH et le fonctionnement ovarien date de 1997 (90). Ces auteurs ont montré que, comparées à des patientes ayant une stérilité tubaire ou endométriosique, les femmes présentant un SOPK ont des concentrations d'AMH sanguines et intrafolliculaires plus élevées et corrélées à des taux de maturation ovocytaire et de fécondation plus bas. Ces résultats ont été confirmés par la même équipe, en comparant des patientes ayant un SOPK à des femmes normo-ovulantes (97). Ces auteurs ont également mis en évidence, chez les femmes présentant un SOPK, une corrélation négative entre les concentrations d'estradiol et d'AMH (97). Ce phénomène résulte probablement des effets inhibiteurs de l'AMH sur l'activité 450^{arom} (87-89, 91). L'association de concentrations d'AMH élevées et l'excès de follicules sélectionnables qui caractérise le SOPK ont été ensuite montrés par d'autres équipes (92).

L'évolution des concentrations sanguines d'AMH au cours du cycle menstruel reste mal connue. Une étude, réalisée chez 20 femmes pendant les trois périodes du cycle menstruel (97), montre que les taux circulants d'AMH sont plus élevés pendant la phase périovulatoire qu'en début de phase folliculaire ou en phase lutéale. Ces résultats contredisent les données montrant une diminution de l'expression de l'AMH avec la maturation folliculaire finale

(79). L'absence de variation significative des concentrations d'AMH pendant les premiers jours de la phase folliculaire (94, 98) suggère que l'expression d'AMH reste stable pendant cette phase du cycle.

Il est donc possible que la production d'AMH par les follicules non dominants masque la diminution des concentrations circulantes d'AMH que l'on devrait observer pendant la phase finale de la folliculogénèse. Nous avons montré que, chez la femme, la capacité des follicules à produire de l'AMH diminue au-delà du stade antral précoce, lors de la phase terminale de la folliculogénèse (99).

En ce qui concerne la phase lutéale et l'influence possible des processus de lutéinisation et de formation du corps jaune (79) sur les concentrations circulantes d'AMH, les données se résument à l'observation de Cook (97). Pour clarifier ce point, nous avons mené une étude du profil de la sécrétion d'AMH pendant la phase lutéale en utilisant la stimulation ovarienne comme modèle d'étude (96).

Les premières démonstrations de l'intérêt clinique de l'AMH en tant que marqueur du statut folliculaire ovarien sont relativement récentes. De Vet *et al.* (2002) ont suivi, de manière longitudinale, une cohorte de 41 femmes normo-ovulantes pour mettre en évidence d'éventuelles variations des marqueurs hormonaux (AMH, FSH, estradiol, et inhibine B) et échographiques (nombre de follicules sélectionnables) évalués le 3^e jour du cycle et leur association avec le vieillissement ovarien (100). Cette étude a montré une diminution significative des concentrations d'AMH entre les deux visites médicales effectuées à $2,6 \pm 1,8$ ans d'intervalle, qui contraste avec la stabilité des autres marqueurs analysés. Ces résultats renforcent la place de l'AMH en tant que marqueur de choix dans l'évaluation du vieillissement ovarien.

Simultanément, Seifer *et al.* (2002), van Rooij *et al.* (2002), et Muttukrishna *et al.* (2004) ont montré qu'il existe une corrélation entre les concentrations sanguines d'AMH mesurées en début de phase folliculaire et l'intensité de la réponse ovarienne à une stimulation (101-103).

De plus, le nombre de follicules sélectionnables est étroitement associé aux concentrations sanguines d'AMH (100). Cette association est significativement plus intense que celle entre la FSH, l'inhibine B et l'estradiol et le nombre de follicules sélectionnables le 3^e jour du cycle (104, 105).

Par ailleurs, van Rooij *et al.* (2002) ont montré que, pour l'évaluation du statut folliculaire ovarien, la valeur prédictive des concentrations d'AMH est comparable à celle du nombre des follicules sélectionnables. Plus récemment, cette même équipe a mis en évidence que, associée à l'inhibine B, l'AMH est également un marqueur fiable de l'apparition des troubles du cycle menstruel révélateurs de la pré-ménopause (102, 106). De plus, chez des

femmes ayant subi une chimiothérapie pendant l'enfance, l'AMH en association avec la mesure du volume ovarien présente une excellente sensibilité pour la détection d'éventuelles altérations ovariennes (95). Ces observations suggèrent que l'AMH est un marqueur prédictif de la réponse ovarienne à la stimulation.

Conclusion

L'évaluation du statut folliculaire ovarien, prérequis indispensable à la prise en charge d'une infertilité du couple par des techniques d'AMP, repose sur un faisceau d'arguments tant cliniques que biologiques et iconographiques. La faible sensibilité des paramètres hormonaux usuels tels que la FSH, l'estradiol ou l'inhibine B doit faire du compte folliculaire antral le principal marqueur de la réserve ovarienne. Cependant, il paraît de plus en plus évident que le dosage de l'AMH sérique soit un excellent complément de l'échographie pour améliorer la sensibilité de l'évaluation de statut folliculaire.

Références

1. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC (1994) Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 50: 653-63
2. Fédération CECOS, Schwartz D, Mayaux MJ (1982) Female fecundity as a function of age. *N Engl J Med* 306: 404-6
3. Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17: 121-55
4. Legro RS, Wong IL, Paulson RJ, Lobo RA, Sauer MV (1995) Recipient's age does not adversely affect pregnancy outcome after oocyte donation. *Am J Obstet Gynecol* 172: 96-100
5. Block E (1952) Quantitative morphological investigations of the follicular system in women: variations at different ages. *Acta Anat* 14: 108-23
6. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J (1991) Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Br Med J* 302: 1361-5
7. Wood JW (1989) Fecundity and natural fertility in humans. In: Milligen SR, ed. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford, Oxford University Press, Volume 2: 61-109.
8. Templeton A, Morris JK, Parslow W (1996) Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 348: 1402-6
9. Cameron IT, O'Shea FC, Rolland JM, Hughes EG, de Kretser DM, Healy DL (1988) Occult ovarian failure: a syndrome of infertility, regular menses, and elevated follicle-stimulating hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 1190-4
10. El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P (2002) Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve--an eight year study. *Hum Reprod* 17: 1519-24

11. van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJ *et al.* (2003) Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Hum Reprod* 18: 495-501
12. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR (1996) Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1946-51
13. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ, Soules MR (1996) Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1038-45
14. Klein NA, Harper AJ, Houmard BS, Sluss PM, Soules MR (2002) Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5746-50
15. Pampiglione JS, Sharma V, Riddle AF, Mason BA, Campbell S (1988) The effect of cycle length on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 50: 603-6
16. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR (1996) Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2742-5
17. Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE (1999). Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 105-11
18. Klein NA, Houmard BS, Hansen KR *et al.* (2004) Age-related analysis of inhibin A, inhibin B, and activin a relative to the intercycle monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2977-81
19. Lenton EA, Landgren BM, Sexton L, Harper R (1984) Normal variation in the length of the follicular phase of the menstrual cycle: effect of chronological age. *Br J Obstet Gynaecol* 91: 681-4
20. Hillier SG, Reichert LE Jr, Van Hall EV (1981) Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 847-5
21. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z (1989) Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 51: 651-4
22. Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ (1990) Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54: 297-302
23. Cahill DJ, Prosser CJ, Wardle PG, Ford WC, Hull MG (1994) Relative influence of serum follicle stimulating hormone, age and other factors on ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 999-1002
24. Bancsi LF, Huijs AM, den Ouden CT *et al.* (2000) Basal follicle-stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 73: 552-7
25. van Rooij IA, de Jong E, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER (2004) High follicle-stimulating hormone levels should not necessarily lead to the exclusion of subfertile patients from treatment. *Fertil Steril* 81: 1478-85
26. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS (2003) Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 79: 63-8
27. Toner JP (2004) Modest follicle-stimulating hormone elevations in younger women: warn but don't disqualify. *Fertil Steril* 81: 1493-5
28. Abdalla HI, Thum MY (2004) An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod* 19: 893-8
29. Nasser A, Mukherjee T, Grifo JA, Noyes N, Krey L, Coperman AB (1999) Elevated day 3 serum follicle-stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril* 71: 715-71
30. Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT Jr (2001) Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 76: 666-9
31. Akande VA, Keay SD, Hunt LP, Mathur RS, Jenkins JM, Cahill DJ (2004) The practical implications of a raised serum FSH and age on the risk of IVF treatment cancellation due to a poor ovarian response. *J Assist Reprod Genet* 21: 257-62
32. Frazier LM, Grainger DA, Schieve LA, Toner JP (2004) Follicle-stimulating hormone and estradiol levels independently predict the success of assisted reproductive technology treatment. *Fertil Steril* 82: 834-40
33. Jain T, Klein NA, Lee DM, Sluss PM, Soules MR (2003) Endocrine assessment of relative reproductive age in normal eumenorrheic younger and older women across multiple cycles. *Am J Obstet Gynecol* 189: 1080-4
34. Jurema MW, Bracero NJ, Garcia JE (2003) Fine tuning cycle day 3 hormonal assessment of ovarian reserve improves in vitro fertilization outcome in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles. *Fertil Steril* 80: 1156-6
35. Keay SD, Jenkins JM (2004) Ovarian reserve and a slightly different perspective. *Fertil Steril* 81: 1426
36. van Dessel HJHM, Schipper I, Pache TD *et al.* (1996) Normal human follicle development: an evaluation of correlations with oestradiol, androstenedione and progesterone levels in individual follicles. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44: 191-8
37. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M *et al.* (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1401-5
38. Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM (1997) Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol* 104: 521-7
39. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Righini C, de Ziegler D, Frydman R (2003) Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil Steril* 79: 585-9
40. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA (1998) Elevated levels of basal E₂-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69: 1010-4
41. Phopphong P, Ranieri DM, Khadum I, Meo F, Serhal P (2000) Basal 17beta-estradiol did not correlate with ovarian response and in vitro fertilization treatment outcome. *Fertil Steril* 74: 1133-6
42. Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT (2000) Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 74: 518-24
43. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM (1987) Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 954-61
44. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M *et al.* (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 717-23
45. Welt CK, Martin KA, Taylor AE *et al.* (1997) Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during

- the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2645-52
46. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA (1997) Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 67: 110-4
 47. Seifer DB, Scott RT Jr, Bergh PA *et al.* (1999) Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 72: 63-5
 48. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR (1999) Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod* 14: 2818-21
 49. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F *et al.* (2000) Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod* 15: 2341-6
 50. Grynberg M, Feyereisen E, Scheffer JB, Koutroubis P, Frydman R, Fanchin R (2010) Early follicle development alters the relationship between antral follicle counts and inhibin B and follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3. *Fertil Steril* 93: 894-9
 51. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ (1987) Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 2: 645-7
 52. Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikh E, Racowsky C (2003) Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age. *Fertil Steril* 80: 111-5
 53. Jain T, Soules MR, Collins JA (2004) Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 82: 180-5
 54. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB, Schoemaker J (2004) Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 19: 590-5
 55. Gulekli B, Bulbul Y, Onvural A *et al.* (1999) Accuracy of ovarian reserve tests. *Hum Reprod* 14: 2822-6
 56. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R (1994) Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 9: 1607-11
 57. Dzik A, Lambert-Messerlian G, Izzo VM, Soares JB, Pinotti JA, Seifer DB (2000) Inhibin B response to EFORT is associated with the outcome of oocyte retrieval in the subsequent in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 74: 1114
 58. Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J (2003) Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomised study. *Hum Reprod* 18: 1422-7
 59. Elting MW, Kwee J, Schats R, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J (2001) The rise of estradiol and inhibin B after acute stimulation with follicle-stimulating hormone predict the follicle cohort size in women with polycystic ovary syndrome, regularly menstruating women with polycystic ovaries, and regularly menstruating women with normal ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1589-95
 60. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER (1999) Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 72: 845-51
 61. Ng EH, Tang OS, Ho PC (2000) The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. *Hum Reprod* 15: 1937-42
 62. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW *et al.* (2003) The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 18: 700-6
 63. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, Te Velde ER (2004) Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause* 11: 607-14
 64. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER (2002) Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 77: 328-36
 65. Nahum R, Shifren JL, Chang Y, Leykin L, Isaacson K, Toth TL (2001) Antral follicle assessment as a tool for predicting outcome in IVF—is it a better predictor than age and FSH? *J Assist Reprod Genet* 18: 151-5
 66. Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR (2003) Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril* 80: 577-83
 67. Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER (2004) Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 81: 35-41
 68. Kupesic S, Kurjak A (2002) Predictors of IVF outcome by three-dimensional ultrasound. *Hum Reprod* 17: 950-5
 69. Thomas JD, Rubin DN (1998) Tissue harmonic imaging: why does it work? *J Am Soc Echocardiogr* 11: 803-8
 70. Mercé LT, Bau S, Barco MJ, Troyano J, Gay R, Sotos F, Villa A (2006) Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 21: 1218-26
 71. Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, Clewes J *et al.* (2008) SonoAVC: a novel method of automatic volume calculation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 691-6
 72. Salama S, Arbo E, Lamazou F, Levaillant JM, Frydman R, Fanchin R (2010) Reproducibility and reliability of automated volumetric measurement of single preovulatory follicles using SonoAVC. *Fertil Steril* 93: 2069-73
 73. Zaidi J, Barber J, Kyei-Mensah A, Bekir J, Campbell S, Tan SL (1996) Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in vitro fertilization program. *Obstet Gynecol* 88: 779-84
 74. Kim SH, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Moon SY, Lee JY (2002) Clinical significance of transvaginal color Doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 19: 103-12
 75. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C *et al.* (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45: 685-98
 76. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N (1984) Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114: 1315-20
 77. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T *et al.* (1996) Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 571-6
 78. Munsterberg A, Lovell-Badge R (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-24
 79. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P *et al.* (1995) Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136: 4951-62

80. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P *et al.* (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143: 1076-84
81. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR *et al.* (2004) Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 10: 77-83
82. Durlinger AL, Kramer P, Karels B *et al.* (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140: 5789-96
83. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P *et al.* (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142: 4891-9
84. McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ (2001) Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* 64: 293-8
85. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124: 601-9
86. Schmidt, KLT, Byskov A, Nyboe Andersen A, Muller J, Yding Andersen C (2003) Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 18: 1158-64
87. Vigier B, Forest MG, Eychenne B *et al.* (1989) Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3684-8
88. di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB *et al.* (1992) A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development* 114: 721-7
89. di Clemente N, Goxe B, Remy JJ *et al.* (1994) Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 2: 253-8
90. Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A (1997) Müllerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril* 67: 962-5
91. Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME (2002) Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 77: 141-6
92. Pigny P, Merlen E, Robert Y *et al.* (2003) Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5957-62
93. Nestorovic N, Lovren M, Sekulic M *et al.* (2004) Chronic somatostatin treatment affects pituitary gonadotrophs, ovaries and onset of puberty in rats. *Life Sci* 74: 1359-73
94. La Marca A, Malmusi S, Giulini S *et al.* (2004) Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 19: 2738-41
95. Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA (2003) Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 18: 2368-74
96. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Louafi N, Achour-Frydman N, Frydman R, Taieb J (2005) Dynamics of serum anti-Müllerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 20: 747-51
97. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME (2000) Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 73: 859-61
98. van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP *et al.* (2008) Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2129-34
99. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J (2003) Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 18: 328-32
100. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC (2002) Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77: 357-62
101. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM (2002) Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 77: 468-71
102. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER *et al.* (2002) Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 17: 3065-71
103. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M (2004) Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 111: 1248-53
104. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J (2003) Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 18: 323-7
105. Fanchin R, Taieb J, H Mendez Lozano D, Ducot B, Frydman R, Bouyer J (2005) High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 20: 923-7
106. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ *et al.* (2004) Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 11: 601-6

P. Madelenat, G. Schemoul,
J. Juras et C. Yazbeck

Hystérosalpingographie

En hommage à René Musset¹

Introduction

Durant longtemps, l'hystérosalpingographie (HSG) est demeurée la seule imagerie de l'appareil génital féminin avant que les techniques concurrentes, échographie, hystérocopie, tomodensitométrie et imagerie par résonance magnétique ne viennent contester une situation monopolistique.

Aujourd'hui l'HSG est de fait tombée dans une situation de relative désuétude et pourrait même sembler condamnée à disparaître. L'exploration de la cavité utérine revient maintenant à l'hystérocopie et celle de la paroi myométriale aux ultrasons et à l'IRM. L'endométriose comme la pathologie ovarienne relèvent désormais d'autres méthodes que l'opacification génitale.

Toutefois, l'HSG garde sa pleine valeur dans l'exploration de la trompe chez les femmes infertiles. Aux différents niveaux de celle-ci, cornual, médiotubaire et ampullo-infundibulaire, la salpingographie conserve une place privilégiée que les autres explorations ultrasonores ou radiologiques ne sauraient raisonnablement lui contester.

La désaffection certaine qu'a toutefois indiscutablement connue cette exploration en termes d'indications n'est pas sans conséquence. Sa pratique sur le plan technologique, l'interprétation de ses clichés, son enseignement ont à l'évidence souffert de cette situation.

Il n'est pas contestable qu'une tendance excessive et manichéenne, consistant à recourir trop rapidement et trop systématiquement à l'assistance médicale à la procréation (AMP) devant les nombreuses situations d'infertilité conjugale, a ajouté sa connotation négative à une situation déjà préoccupante. Il faut pourtant insister sur la nécessité persistante d'explorer les femmes infertiles et éviter les courts circuits trop faciles qui pourraient conduire à des prises en charge thérapeutiques simplistes.

La fonction tubaire et le contrôle de sa normalité sont un temps important du bilan de fertilité. L'exa-

men de première intention sur lequel elle se pose est l'hystérosalpingographie. Penser que l'on peut négliger ce temps important du bilan est une erreur dont la prise en charge thérapeutique est susceptible de souffrir. Toutefois, pour tirer la quintessence de cette exploration il convient :

- d'en connaître les impératifs et les évolutions techniques récentes ;
- d'en cerner le positionnement en terme d'indications devant une situation d'infertilité ;
- d'en exploiter les données de manière exhaustive aux différents segments du conduit tubaire.
- sans oublier les quelques circonstances où l'HSG a encore sa justification au niveau utérin.

Principes techniques

L'indication de l'hystérosalpingographie dans le cadre du bilan d'une infertilité primaire ou secondaire est l'exploration de la pathologie et de la perméabilité tubaire (1). Elle garde toutefois un intérêt lors de l'exploration de certaines pathologies utérines et joue également un rôle en cas de fausses couches à répétition (béance isthmique, malformation).

Deux contre-indications sont formelles :

- la notion d'infection génitale ;
- la possibilité d'une grossesse débutante : au moindre doute de grossesse ou en cas de cycle très irrégulier, il est prudent de demander un dosage de l'HCG avant d'envisager l'examen ;

D'autres contre-indications sont relatives :

- les métrorragies abondantes, il est préférable dans ce cas de surseoir à l'examen ;
- la notion d'allergie à l'iode doit faire envisager une prémédication (antihistaminique) (2). En cas de terrain hautement allergique ou d'antécédent de choc à l'iode, l'examen doit être réalisé au gadolinium (3).

Précautions de réalisation

L'hystérosalpingographie est réalisée impérativement en première phase de cycle, entre le cinquième et le treizième jour. Aucune prémédication ne s'impose de façon formelle, en revanche devant une

1. Musset R, Netter A, Poitout Ph, Rioux JE (1977) Précis d'hystérosalpingographie. Les presses de l'Université Laval

valvulopathie, il faut prescrire une couverture antibiotique à large spectre, de principe. En pratique, l'examen est de plus en plus souvent réalisé après prise systématique d'antalgiques ou de sédatifs et couverture antibiotique débutée trois jours avant l'examen et poursuivie cinq jours après. Toutefois, une antibiothérapie lourde sera prescrite au décours de l'examen lorsqu'il a objectivé un hydrosalpinx ou un important trouble de la diffusion péritonéale (triple antibiothérapie associant un dérivé de la pénicilline, une tétracycline et du Flagyl®).

Le produit de contraste utilisé est un hydrosoluble iodé fluide.

L'examen radiologique doit toujours être précédé d'un examen clinique qui appréciera : la taille de l'utérus, l'absence d'anomalie pelvienne représentant une éventuelle contre-indication, la situation du col utérin et permettra également de choisir la taille du spéculum.

Technique

La patiente est installée en position gynécologique sur une table de radiologie, de préférence numérique. La technique numérique a permis une nette diminution des doses reçues et du temps de l'examen (deux à quatre minutes).

On réalise d'abord un cliché du pelvis sans préparation.

L'injection du produit de contraste peut se faire à l'aide de plusieurs matériels : le plus utilisé est la tulipe à usage unique, branchée sur une double tubulure, l'une pour injecter le produit de contraste, l'autre pour faire le vide à l'aide d'une simple seringue de 10 à 20 cc.

En cas d'impossibilité par cette technique (col trop petit ou trop gros, béance de l'orifice externe), l'injection se fera après mise en place d'une ou plusieurs pinces de Pozzi sur le col à l'aide d'une canule rigide munie d'un embout en caoutchouc (olive) qui assure une bonne étanchéité au niveau du col. Cette méthode est réalisable dans tous les cas.

Il existe également la possibilité d'injecter le produit de contraste à l'aide d'une sonde souple à ballonnet placée au niveau de l'isthme. Cette technique présente l'inconvénient de masquer le col, l'isthme et la région sus-isthmique. Elle ne permet pas non plus une traction efficace sur l'utérus.

Après avoir retiré le spéculum, on contrôle la bonne position de l'appareillage ainsi que la progression du produit de contraste sur l'amplificateur de brillance. Le temps de scopie doit être le plus bref possible.

L'examen standard comporte sept clichés.

1. Un pelvis sans préparation, de face.
2. Un cliché de face dit en *couche mince*, réalisé après injection de 0,5 à 3 cm de produit de contraste

selon la taille de l'utérus, il permet de visualiser une éventuelle pathologie endométriale.

3. Un cliché de face en réplétion utérine complète avec opacification tubaire, sans passages péritonéaux, permettant l'analyse de la morphologie des trompes.

4. Un cliché de face avec passages péritonéaux du produit de contraste.

5. Un cliché de profil strict, sans traction sur le col, permettant de situer la position de l'utérus et des trompes, d'apprécier la qualité d'une cicatrice de césarienne et de mettre en évidence une éventuelle béance de l'isthme, uniquement visible sur le cliché de profil.

6. Un cliché de face, après retrait du matériel d'injection, permettant de visualiser l'endocol et d'avoir une seconde vue en couche mince de l'utérus.

7. Un cliché de face, dit *tardif*. C'est un cliché essentiel dans l'exploration d'une stérilité d'origine tubaire, et pourtant souvent négligé. Il doit être pratiqué 20 minutes après l'évacuation. C'est sur ce cliché qu'on appréciera la qualité du brassage péritonéal, les rétentions tubaires du produit de contraste et les poches péritonéales.

Difficultés techniques

Une *sténose de l'orifice externe* peut être constitutionnelle, secondaire à une amputation du col ou à une conisation. Plutôt que de réaliser une dilatation douloureuse de l'orifice externe à l'aide d'une bougie, il est préférable d'injecter le produit de contraste à l'aide d'une aiguille fine à bout mousse ou à l'aide d'un fin cathéter souple.

En présence d'un *col déchiré ou béant*, l'examen ne peut être réalisé qu'à la canule rigide et l'étanchéité du produit de contraste ne sera obtenue qu'après rétrécissement de l'orifice externe par la pose d'une ou de plusieurs pinces de Pozzi.

En cas de *polype* : s'il existe un gros polype accouché par le col, l'injection du produit peut être impossible si l'on ne repère pas préalablement à l'aide d'une sonde de Dalsace le méridien selon lequel le col est cathétérisable. La présence d'un polype intracervical « en battant de cloche » peut empêcher l'opacification de la cavité utérine (polype obturant). Il conviendra alors de réaliser l'examen à l'aide d'une canule à embout long permettant d'injecter le produit de contraste au-dessus de la base d'implantation du polype.

Les *spasmes isthmiques* ou cornuaux doivent être levés par l'administration de trinitrine.

En cas de *cloison vaginale*, il conviendra d'injecter les deux hémicavités successivement. En cas de cloison vaginale asymétrique, le second col peut n'être accessible qu'avec un spéculum de vierge.

En cas de *diaphragme vaginal* extrêmement serré empêchant l'exposition du col utérin, une vaginographie permet parfois d'opacifier l'utérus par pénétration transcervicale du produit de contraste.

Incidents

Quelques *éruptions cutanées* d'allure urticarienne peuvent survenir juste après l'examen.

Quant aux allergies vraies à l'iode, elles sont très rares et immédiates, exceptionnellement, elles peuvent être retardées et nécessitent un traitement classique (corticothérapie par voie intraveineuse).

Les *douleurs* sont rarement très vives et dépendent, d'une part, de la perception nociceptive de la patiente et, d'autre part, de la perméabilité des trompes. Celles-ci peuvent toutefois entraîner une lipothymie ou une crise de spasmodie liée à l'hyperventilation.

Les *perforations utérines* sont rares et pratiquement toujours localisées à l'isthme, elles sont secondaires soit à une hystérométrie, soit à une tentative de forage d'une synéchie ou à l'utilisation d'un embout long alors que l'utérus est fortement antéversé ou rétroversé.

Les *passages vasculaires* ou interstitiels du produit de contraste sont sans conséquence.

Complications

Les complications les plus fréquentes et les plus redoutées sont les complications infectieuses, surtout en cas d'hydrosalpinx ou le risque de pyosalpinx ou de pelvipéritonite n'est pas négligeable, de l'ordre de 10 % (4).

La constatation d'une obturation tubaire ampullaire distale impose donc la mise en route d'un traitement antibiotique lourd au décours immédiat de l'exploration.

Si l'hystérosalpingographie a été malencontreusement réalisée alors même qu'existait une grossesse débutante, il a été démontré que la dose délivrée lors de l'examen n'est pas tératogène et qu'il n'y a donc pas lieu d'envisager un avortement thérapeutique.

Perspectives d'avenir

Deux voies de recherche sont actuellement envisagées :

- l'hystérosalpingographie virtuelle par scanner, visualisant à la fois l'utérus et les trompes (5) ;
- l'hystérographie couplée à l'IRM permettant d'explorer à la fois l'utérus, les trompes et le pelvis (6).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude comparative permettant de valider ces pratiques dont l'évaluation doit se poursuivre.

Indications de l'hystérosalpingographie dans l'exploration de l'infertilité

Recommandations

Les recommandations de l'AFSSAPS sont très claires en ce qui concerne l'exploration et la prise en charge du couple infertile. Elle doit nécessairement comporter un contrôle de la perméabilité tubaire. Si l'on considère que l'insufflation tubaire appartient au passé et si l'on admet qu'une pratique extensive de la coelioscopie en première intention serait illégitime, il n'apparaît pas beaucoup d'autres solutions qu'une indication assez large de l'HSG dans cet objectif.

La réalité du terrain montre toutefois que ces recommandations sont loin d'être suivies. Une étude de la CNAMTS (Midi-Pyrénées) montrait que moins d'une femme sur deux proposée à une stimulation de l'ovulation (citrates de clomifène) avait été soumise à ce contrôle. On sait d'ailleurs qu'une tendance actuelle consiste, chez les patientes infertiles sans signe d'appel tubaire, à proposer sans aucun contrôle salpingien quatre cycles de stimulation associée aux inséminations intra-utérines. En cas d'échec, le passage en AMP de type fécondation *in vitro* est la suite logique de la demande thérapeutique, sans que la question de la perméabilité tubaire n'ait jamais été posée. Cette attitude réductrice doit être critiquée car elle revient à classer dans la catégorie des infertilités inexplicables certaines patientes dont la chirurgie aurait pu régler parfois simplement le problème.

La seconde question qui se trouve posée est la suivante : peut-on préjuger de la normalité tubaire ?

Par l'interrogatoire des patientes recherchant dans leurs antécédents les signes supposés d'une infection salpingienne ? Le travail de Hubacher *et al.* portant sur 321 patientes répond à cette proposition par la négative (7).

Par le résultat positif ou négatif d'un sérodiagnostic des infections à *Chlamydia* ?

Une revue de littérature colligeant les pathologies pelviennes retrouvées en coelioscopie chez des femmes séronégatives objective la faible sensibilité de cette proposition (tableau I).

Par l'échographie ? Le travail d'Ulbaldi (8) montre les limites de cette exploration en terme de sensibilité et spécificité pour la pathologie infundibulo-ovarienne. L'hystérosonographie pourrait être plus performante mais le travail comparatif reste à faire.

Ainsi donc doit-on continuer à vivre dans le principe que l'HSG reste l'examen de référence et de première intention dans le contrôle de la perméabilité tubaire chez les femmes infertiles.

Tableau I – Sérologie *chlamydia* et pathologies pelviennes.

Auteurs	Nbre de patientes avec sérologie (–)	Nbre de pathologies pelviennes en coelioscopie	Se (%)
Thejls, 1991	128	52	59
Dabekausen, 1994	43	9	79
Meikle, 1994	103	19	82
Eggert, 1997	1102	326	70
Johnson, 2000	45	21	53
Veenemans, 2002	67	7	89
Logan, 2003	167	40	76

Se pose alors une seconde question pratique et importante : quand faut-il demander cette exploration ? La réponse est loin d'être univoque tant les circonstances peuvent être différentes. (9)

La première circonstance est représentée par les patientes chez lesquelles il existe des antécédents certains, voire documentés par une coelioscopie antécédente d'infection génitale haute (IGH). Chez ces patientes dont il ne faut pas en outre méconnaître le risque d'ectopie gravidique, l'indication de l'HSG s'impose sans délai, à condition d'être certain de l'absence de toute évolutivité inflammatoire pelvienne. Son résultat conditionnera la pratique possible d'une coelioscopie d'inventaire et de traitement. Une situation est assez voisine. Elle concerne des femmes ayant des antécédents chirurgicaux pelviens à fort risque tubaire et adhérentiel (péritonite appendiculaire, myomectomies extensives, grossesse extra-utérine).

À un degré moindre, certains gestes chirurgicaux à plus faible risque adhérentiel doivent toutefois inciter à ne pas trop différer l'exploration des trompes (exérèse de kystes ovariens, myomectomie, endométriose minime ou modérée).

En revanche, l'endométriose dans ses formes extensives et sévères est plus une indication au contrôle global du pelvis par coelioscopie qu'à l'exploration ponctuelle par HSG des trompes, souvent d'ailleurs épargnées par le processus.

Mais le vrai problème réside dans l'indication de l'HSG chez les femmes où rien ne laisse attendre l'existence d'une pathologie pelvienne du fait de la normalité de l'interrogatoire, de l'examen clinique et de l'échographie qui appartient souvent de fait de bilan de première intention.

Faut-il, chez des patientes auxquelles est accolée parfois hâtivement l'étiquette de l'infertilité inexpliquée, demander une HSG de principe ou passer d'emblée à l'AMP comme précédemment évoqué ? En l'état actuel de la situation et dans le respect des recommandations officielles institutionnelles, il semble légitime d'envisager chez les femmes à bas risque tubaire la pratique d'une HSG après un an de tentatives inefficaces et il est certainement

critiquable de ne pas le faire lorsque l'infertilité dépasse la barrière des deux années. Toutefois, il est vrai qu'au nom d'une logique de rentabilité à laquelle tous les facteurs du choix ne sont d'ailleurs pas forcément intégrés (coûts de traitement, risque spécifiques des techniques, etc.), cette attitude n'est plus aujourd'hui consensuelle. On peut le regretter et se réjouir de voir un certain bon sens réapparaître à ce propos ces dernières années.

Troisième question : peut-on affirmer la valeur hautement prédictive de l'HSG ? Là encore, la réponse n'est pas univoque.

Le caractère normal de l'HSG ne garantit pas l'absence d'anomalies pelviennes. Il existe un pourcentage de faux négatifs qui demande toutefois à être relativisé (tableau II). La technique de l'exploration a-t-elle toujours été parfaite ? Les anomalies retrouvées en coelioscopie étaient-elles accessibles à l'exploration radiologique (10) ?

La méta-analyse de Swart (11) collige 4 179 patientes chez lesquelles ont été comparées les données de l'HSG et de la coelioscopie. L'HSG a une faible sensibilité pour le diagnostic d'obstruction tubaire (65 %), elle détecte une pathologie tubaire dans deux tiers des cas où elle existe. Cependant, avec une spécificité de 83 %, l'HSG normale garantit l'absence de pathologie tubaire dans cinq cas sur six. Ce travail confirme enfin la faible performance de l'HSG dans le diagnostic des adhérences péri-annexielles.

Le travail de Walcott (12) portant sur 278 patientes est une étude randomisée prospective. Elle conclut à la supériorité de l'HSG sur la coelioscopie pour le diagnostic d'obstruction tubaire proximale et à leur équivalence pour ce qui concerne les obstructions distales. Pour les pathologies périutébaires, la coelioscopie est plus performante.

Enfin il faut souligner les circonstances où l'aspect du salpingogramme témoigne de telles altérations que tout projet de fécondation spontanée peut être abandonnée au profit de l'AMP (tuberculose, parasitose, salpingite chronique sclérosité). Dans ces cas particuliers, l'HSG permet ainsi d'éviter une coelioscopie contraignante et parfaitement inutile (13).

Tableau II – HSG et pathologies pelviennes.

Auteurs	Nbre d'HSG « normales »	Nbre de pathologies pelviennes en coelioscopie	Faux (–) (%)
Wood, 1983	50	28	56
Henig, 1991	120	40	33
Opsahl, 1993	327	137	42
El Yahia, 1994	130	75	58
Cundiff, 1995	34	19	56
Belisle, 1996	177	92	52
Al-Badawi, 1999	265	129	49
Veenemans, 2002	30	3	10

Un dernier problème pratique peut se trouver posé : faut-il après une plastie tubaire sans résultat en termes de grossesse, demander une hystérosalpingographie de contrôle ?

La réponse est négative mais mérite d'être nuancée. On sait le rôle délétère sur l'implantation embryonnaire en AMP des hydrosalpinx et l'intérêt d'une salpingectomie préalable. Dans cette indication, la contrainte de l'HSG peut sembler excessive. L'identification d'un éventuel hydrosalpinx post-chirurgical pourrait alors revenir à l'échographie conventionnelle ou à l'hystérosonographie parfaitement adaptée à ce contexte.

Hystérosalpingographie et pathologie tubaire distale

Les anomalies les plus fréquentes de la perméabilité tubaire siègent au niveau de la partie distale de la trompe (ampoule et pavillon), soit dans deux tiers des cas. Les causes infectieuses et les maladies sexuellement transmissibles en sont la cause principale. Malgré leur décroissance relative depuis 20 ans, elles restent très fréquentes.

Intérêt de l'hystérosalpingographie

L'HSG présente un quadruple intérêt dans la pathologie tubaire distale :

- elle précise le siège de l'obstacle et met en évidence la rétention ampullaire d'amont ;
- elle montre l'état de la muqueuse tubaire qui, normalement, se présente sous forme de plis tubaires longitudinaux parallèles à l'axe de l'ampoule ;
- elle permet indirectement de mettre en évidence des adhérences péri-infundibulaires ;
- elle peut comporter un intérêt thérapeutique dans certaines atteintes distales minimales.

La reproductibilité de l'HSG est rassurante en ce qui concerne la pathologie ampullo-infundibulaire. D'après une étude comportant l'évaluation de 143 HSG par quatre radiologues experts, la variabilité intra-observateur (pour le même expert) était faible en ce qui concerne l'obstruction distale, les hydrosalpinx et les adhérences péri-tubaires. La variabilité inter-observateur (entre les différents experts) était faible pour les obstructions distales et les hydrosalpinx, et moyenne pour les adhérences péri-tubaires (14).

Anomalies de la portion ampullo-infundibulaire

Phimosi

L'orifice de l'ostium tubaire est rétréci au point de ne laisser passer que quelques gouttes de pro-

duit de contraste. Lors du remplissage tubaire, le pavillon se dilate et le passage péritonéal s'effectue très lentement avec une faible diffusion. Le cliché tardif montre à la fois un pavillon encore dilaté et un faible passage intrapéritonéal. Le pronostic est généralement favorable car la muqueuse tubaire de l'ampoule présente le plus souvent des plis muqueux persistants qui témoignent de son intégrité.

Hydrosalpinx

Il correspond à une obstruction complète de l'infundibulum de la trompe et à la présence d'une sérosité liquidienne d'abondance variable à l'intérieur de l'ampoule. L'HSG montre une distension plus ou moins importante de celle-ci, qui persiste sur les clichés tardifs mais sans aucun passage intrapéritonéal. Le produit de contraste opacifie d'une manière homogène les limites de l'ampoule. Par ailleurs, la présence de nombreux plis muqueux parallèles à l'axe de l'ampoule prouve que la muqueuse tubaire a conservé sa relative intégrité. À l'inverse, une disparition des plis muqueux est en faveur d'une atrophie muqueuse et d'une lésion de la musculature. Dans ce cas, le pronostic tubaire est beaucoup plus réservé. En cas de volumineux hydrosalpinx, l'étude de la résorption du produit sur un cliché très tardif (24 h après l'injection) permet également de mettre en évidence une persistance du liquide qui traduit une fibrose tubaire distale de mauvais pronostic opératoire.

Sactosalpinx

Le sactosalpinx, souvent peu dilaté, est le reflet d'une réaction d'épaississement de la musculature tubaire, qui est souvent d'un pronostic chirurgical plus médiocre qu'un large hydrosalpinx à paroi fine.

Hématosalpinx/pyosalpinx

Il est difficile de faire la distinction de ces pathologies qui ont les mêmes caractéristiques radiologiques que l'hydrosalpinx à une différence près : le produit de contraste, hydrosoluble, se mélange d'une façon incomplète avec le liquide hématique ou purulent épaissi entraînant ainsi une image moins homogène que celle d'un hydrosalpinx.

Adhérences péri-infundibulaires

Il s'agit souvent d'adhérences péri-tubo-ovariennes. Le brassage péritonéal est de mauvaise qualité. La diffusion du produit de contraste à l'extérieur du pavillon ne se fait pas d'une manière homogène mais reste localisée à certains endroits ou bien stagne à la partie latérale du pelvis dans des poches adhérentielles sous forme d'« images suspendues ». Il existe une stase du produit sur les clichés

tardifs d'évacuation. Ces anomalies de dispersion du produit de contraste sont également souvent associées à un phimosis.

HSG et pathologies distales

La valeur de l'HSG réside, en plus de la découverte d'une origine tubaire de l'infertilité féminine, dans la mise en évidence d'un diagnostic lésionnel. Dans certains cas, on peut reconnaître certaines étiologies lésionnelles dont les aspects sont très caractéristiques. Dans d'autres cas, l'étiologie reste une présumption nécessitant le concours d'autres examens.

Obturation médio-tubaire et ampullaire proximale

L'occlusion postinfectieuse médio-tubaire est peu fréquente. Elle s'observe essentiellement dans les suites de certaines infections spécifiques, la tuberculose surtout, mais aussi certaines parasitoses (bilharziose, par exemple).
La tuberculose génitale : l'atteinte se produit chez une adolescente et laisse des séquelles tubaires spécifiques. Pendant la période évolutive, l'HSG est proscrite. Les lésions comportent des sténoses médio-ampullaires bilatérales et fixées (aspect en croix de Malte, en trèfle ou en canne de golf).

Obturation infundibulaire

L'occlusion distale infundibulaire est habituelle dans les suites d'une infection génitale haute, que la salpingite soit non spécifique, conséquence d'une infection à entérobactéries, par exemple, ou spécifique, et l'on sait le rôle important tenu par le *Chlamydia* dans ce contexte.
Les salpingites par IST (*Chlamydiae trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*) : les séquelles d'une infection annexielle ou d'un abcès tubo-ovarien conduisent à l'agglutination des franges infundibulaires, à leur coalescence et, en dernier lieu, à l'oblitération complète du pavillon. Pendant la période aiguë, l'HSG est proscrite car elle peut aggraver l'état tubaire et transformer ainsi un hydrosalpinx en un pyosalpinx (15). Le liquide injecté s'ajoute alors au liquide sécrété par l'hydrosalpinx. Le processus cicatriciel post-infectieux n'aboutit pas toujours à l'occlusion tubaire complète ; la sténose luminale distale n'est pas exceptionnelle. Elle entre dans le cadre des phimosis infundibulaires conservant plus ou moins autour du pertuis sténotique des reliquats de franges.

Efficacité et valeur pronostique de l'HSG

Un des avantages de l'HSG est son effet thérapeutique potentiel dans les atteintes tubaires distales qui peuvent être traitées par un simple « flushing »

de la trompe. Il s'agit dans la plupart des cas d'une agglutination minime des franges tubaires qui est levée par le liquide traversant la trompe sous pression. Une méta-analyse Cochrane en 2005 a comparé l'HSG à produit de contraste liposoluble contre aucune intervention. Elle a montré une amélioration de la fertilité post-HSG, avec augmentation du taux de grossesse (OR = 3,3 ; IC à 95 % : 2,0-5,4) et du taux de naissances vivantes (OR = 3,0 ; IC à 95 % : 1,4-6,4). Il n'existe pas de données randomisées évaluant l'opacification tubaire par produits de contraste hydrosolubles à la chirurgie tubaire de l'infertilité (16).
Le pronostic tubaire en termes de fertilité peut être évalué par le ratio du taux de fécondité (FRR). Ce ratio exprime la probabilité de grossesse spontanée chez une patiente ayant une pathologie particulière par rapport à celle d'une patiente n'ayant pas cette pathologie. Ainsi, lorsqu'il s'agit d'une pathologie tubaire unilatérale à l'HSG, le FRR estimé à 0,81 (IC à 95 % : 0,47-1,4) n'est pas significatif, alors que pour une pathologie bilatérale, le FRR à 0,30 (IC à 95 % : 0,13-0,71) diminue significativement. Donc, une pathologie tubaire unilatérale identifiée à l'HSG indiquerait une valeur pronostique incertaine par rapport à une future fertilité spontanée (17).
Par ailleurs, une étude comparative française a proposé un score tubaire distal tenant compte de trois facteurs : la perméabilité tubaire, l'état de la paroi en coelioscopie ainsi que l'état de la muqueuse évalué par HSG, ce qui permet d'établir un pronostic tubaire précis réparti en quatre stades, corrélé aux chances de grossesse spontanée après l'intervention (tableau III). Ainsi, les taux de grossesse intra-utérine après néosalpingostomie dans les stades I, II, III et IV étaient de 50 %, 32 %, 8 % et 0 %, respectivement (18).
En conclusion, l'évaluation très attentive de la pathologie ampullo-infundibulaire sur les clichés de l'HSG est un temps essentiel de l'exploration d'une infertilité féminine. Elle permet en effet d'indiquer la coelioscopie et oriente les gestes qu'elle autori-

Tableau III – Trompe distale.
Score tubaire distal

Permeabilité Tubaire	Plissement muqueux	Paroi tubaire
Normale...0	Conservé...0	Normale...0
Phimosis...2	Diminué...5	Mince...5
Hydrosalpinx...5	Absent...10	Scléreuse...10

Résultats score distal

Stade	Nbre cas	% GIU	% GEU
I (2-5)	78	42,3	8,2
II (6-10)	53	33,9	11,1
III (11-15)	42	19,0	16,6
IV (>15)	24	4,1	0
Total	197	30,4	9,1

sera sur le plan de la restauration de la perméabilité tubaire ou sur celui de l'exérèse. Elle participe, de ce fait, au consentement éclairé de la patiente, aux gestes qu'elle aura à subir avec son accord, lorsque les données d'observation de la coelioscopie auront complété les arguments issus de l'HSG.

Hystérosalpingographie et pathologie cornuale

L'exploration de la jonction utéro-tubaire et de la trompe interstitielle proximale et isthmique est le domaine d'excellence de l'HSG. Les données qu'elle fournit sont irremplaçables sur un secteur tubaire qui n'appartient plus à l'exploration hystéroscopique et reste souvent mal visualisé par la coelioscopie.

Deux circonstances doivent être distinguées avec leurs conséquences fortes différentes sur le plan de la prise en charge thérapeutique. La première associe les situations où la jonction utéro-tubaire est perméable permettant l'opacification de la trompe interstitielle et isthmique. Les questions posées soulevées par la lecture attentive des clichés sont les suivantes.

La lumière tubaire est-elle normale ?

La présence d'un polype intraluminal siégeant habituellement dans la portion interstitielle proximale de la trompe est une situation qui pose alors le problème de son éventuelle ablation par salpingotomie microchirurgicale.

Les anomalies de calibre luminal à type de dilatation ou d'alternances de strictions et de dilatation siègent habituellement sur la trompe interstitielle distale ou isthmique ; elles évoquent une infection spécifique tuberculeuse ou parasitaire.

La paroi tubaire est-elle normale ?

On rencontre ici les images diverticulaires, dont l'aspect localisé (images en boules de gui) ou diffus traduit en fait plus souvent des lésions postinfectieuses qu'endométriosiques, plus souvent évoquées que confirmées par l'anatomopathologie. C'est en effet l'infection qui est la cause habituelle de ces situations. Mais il reste à en déterminer l'étiologie spécifique (tuberculose) ou autre (postgravidique).

Les données complémentaires issues de l'observation coelioscopique de la trompe sont essentielles aux discussions thérapeutiques éventuellement microchirurgicales. L'existence d'un nodule, son positionnement par rapport à la jonction utéro-tubaire, son volume sont des éléments importants de la décision. L'état de la trompe ampullo-infundibulaire est évidemment un facteur associé essentiel à celle-ci.

Comme pour la trompe distale, un score d'évaluation proposé en 1977 par la Société française d'endoscopie gynécologique permet de valider ces choix (tableau IV).

Dans un second cas de figure, la jonction utéro-tubaire n'est pas perméable. Il existe un obstacle au-delà duquel le trajet tubaire ne peut être apprécié. Cette situation est embarrassante car l'existence de facteurs spastiques est fréquente à ce niveau (jusqu'à 30 % des cas) et incite à la prudence, avant d'affirmer l'organocité de l'obstacle. Deux circonstances doivent être considérées.

- La première correspond aux situations où un segment tubaire interstitiel aussi modeste soit-il est opacifié par le produit de contraste. L'organocité est alors la règle et le spasme *a priori* exclus.
- La seconde est celle dite de l'obstruction à corne ronde où le facteur spastique est hautement probable. Avant d'indiquer une coelioscopie de bilan, hautement légitime dans la première circonstance, il faut alors recourir à une exploration complémentaire particulièrement intéressante dans ce contexte : le cathétérisme sélectif tubaire.

Tableau IV – Trompe proximale.

Score tubaire proximal

Perméabilité Tubaire	Nodule	Pathologie associée
Normale...0	Absence...0	Absence...0
Divert/polype...2	< 2 cm...5	Utérine...5
Occlusion...5	> 2 cm...10	Tub. Distale...10

Résultats score proximal

Stade	Nbre cas	% GIU	% GEU
I (2-5)	46	52,1	6,5
II (6-10)	38	52,6	10,5
III (11-15)	26	19,2	19,2
IV (>15)	2	0	0
Total	112	43,7	10,7

Place du cathétérisme tubaire

L'hystérosalpingographie est une exploration essentielle dans l'identification des pathologies canalaire de la trompe interstitielle et isthmique. Cependant l'analyse de la situation cornuale par hystérosalpingographie n'est pas toujours très précise.

Ainsi, beaucoup de cas étiquetés « obstruction tubaire proximale » ne sont en fait que des pseudo-obstructions (remplissage tubaire insuffisant secondaire à une fuite cervicale du produit de contraste), des obturations fonctionnelles (spasmes) ou des obturations intermittentes (bouchons muqueux) (19).

Il est donc indispensable de disposer d'une technique complémentaire permettant de mieux évaluer l'état des trompes.

Pour cela, l'arsenal radiologique s'est vu renforcé depuis quelques années d'un examen dérivé des techniques de radiologie interventionnelle : le cathétérisme tubaire.

Cette technique a totalement modifié la démarche diagnostique ainsi que l'approche thérapeutique de l'infertilité.

Dans quelles circonstances doit-on recourir au cathétérisme des trompes ?

Il est utile de recourir au cathétérisme tubaire à chaque fois que le diagnostic d'obstruction tubaire n'est pas certain à l'hystérosalpingographie, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de lésions typiques (bouquet d'endométrieose, lésions bipolaires d'une salpingite, etc.).

Quelles précautions doivent être prises avant de réaliser un cathétérisme tubaire ?

Les mêmes qu'avant la réalisation d'une hystérosalpingographie :

- s'assurer que la patiente n'est pas enceinte, pour cela il est habituel de réaliser l'examen en première partie de cycle. Cependant, au moindre doute, il est indispensable de prescrire des bêta-HCG et une échographie ;
- s'assurer qu'il n'y pas d'infection évolutive. Dans le doute un bilan doit être réalisé (sérologies, prélèvements vaginaux). Une couverture antibiotique est souhaitable ;
- s'assurer qu'il n'y a pas d'antécédent allergique. Dans le cas contraire une prémédication anti-allergique est ordonnée ;
- améliorer le confort de l'examen en prescrivant des antispasmodiques ;
- et enfin, et c'est essentiel, rassurer la patiente.

Quelles sont les étapes de réalisation pratique d'un cathétérisme tubaire ?

- Refaire un cliché d'hystérosalpingographie pour s'assurer de la pérennité de l'anomalie causale. Si un doute persiste, il est utile de recourir au cathétérisme ostial.
- Ce dernier se pratique en ambulatoire, sans anesthésie, et consiste à introduire sous scopie une sonde incurvée, éventuellement modelée manuellement, que l'on fait progresser au travers le col jusqu'à l'extrémité de la corne puis dans l'ostium tubaire (20).
- Un liquide de contraste iodé hydrosoluble est ensuite injecté par la sonde dans la trompe (salpingographie sélective). Si la trompe est entièrement opacifiée l'examen est terminé, s'il existe un arrêt de la colonne opaque dans le segment proximal de la trompe une désobstruction est tentée.
- La désobstruction (reperméabilisation) consiste à partir à la rencontre de l'obstacle à l'aide d'un fin guide métallique introduit dans la sonde et de

tenter de lever cet obstacle par des petits mouvements d'aller retour.

La durée de la procédure est variable, elle est le plus souvent d'une quinzaine de minutes. L'irradiation est limitée par l'utilisation d'une table numérisée.

Cette technique présente-t-elle des dangers et des limites ?

La technique du cathétérisme tubaire ne présente pas de danger particulier mais sa réalisation nécessite une bonne expérience.

L'asepsie « chirurgicale » au cours de l'examen, l'utilisation de matériel à usage unique (cathéter Schemoul-Zorn) et la couverture antibiotique permettent d'éliminer les risques infectieux.

Les perforations ou érosions des trompes sont exceptionnelles si des précautions sont prises : négocier les virages anatomiques avec douceur et en cas d'obstruction organique ne pas insister si l'obstacle est trop résistant.

Certains cas de grossesses ectopiques sont rapportés et la patiente doit être prévenue de ce risque en particulier si la désobstruction a été difficile, s'il existe une sténose résiduelle ou encore s'il y a des lésions distales associées.

Les limites de cet examen sont liées à la nature des obstacles (obstructions tuberculeuses par exemple) ou aux difficultés d'accès aux ostia (importantes rétroversions, malformations utérines complexes, etc.).

Quels sont les résultats et les bénéfices escomptés ?

En termes de performance technique, la grande majorité des ostia peut être cathétérisée, en s'aidant des opacifications sous scopie et surtout des sensations tactiles.

En termes de diagnostic, cette méthode est très fiable.

Si les passages péritonéaux du produit de contraste sont facilement obtenus il est possible d'affirmer l'absence de lésion sévère (pseudo-obturations, obturations fonctionnelles, bouchons muqueux, lésions organiques peu sévères).

Inversement, l'absence de passage du liquide iodé dans le péritoine traduit l'organocité et la sévérité des lésions obturantes, elle s'accompagne d'anomalies pariétales et d'une résistance importante ou d'une impossibilité à la progression du guide dans la trompe.

Les résultats concernant la survenue de grossesses sont de l'ordre de 30 % (21) ce qui en termes de rapport efficacité/coût (coût financier et également humain) fait de cette méthode la meilleure méthode d'AMP dans la pathologie tubaire proximale.

De quelle manière cette technique a-t-elle modifié la stratégie de prise en charge des patientes ?

Quand une patiente se voit proposer un diagnostic « d'obstruction tubaire proximale » à l'hystéro-

salpingographie sans lésion évidente, le recours au cathétérisme est indispensable.

Cela permet de réduire considérablement les « stérilités supposées d'origine tubaire » en éliminant les fausses obturations (pseudo-obturations, spasmes) et en désobstruant les trompes présentant des lésions proximales peu sévères tels les bouchons muqueux.

Les traitements plus lourds (plastie chirurgicale, FIV) sont ainsi réservés aux lésions organiques sévères concernant des trompes, non accessibles à la désobstruction sous contrôle radiologique.

En conclusion, le diagnostic « d'obstruction tubaire » à l'hystérosalpingographie doit être confirmé par cathétérisme tubaire, en particulier quand le praticien soupçonne une pseudo-obturation (fuites de produit sur les clichés) ou une obturation fonctionnelle (la patiente rapporte d'importantes douleurs dues à des spasmes) ou encore un obstacle mineur type bouchon muqueux (arrêt proximal du produit de contraste sans lésion pariétale associée).

Cet examen améliore l'identification des lésions tubaires cornuales réellement responsables d'infertilité et favorise l'obtention de grossesses à un moindre coût (22).

Utérus et infertilité

Si l'HSG a été pendant longtemps la seule exploration possible dans le diagnostic des causes utérines de l'infertilité, son indication est aujourd'hui supplantée par d'autres investigations (échographie, hystérosonographie, IRM et surtout hystérocopie).

Toutefois, une hystérosalpingographie demandée pour l'analyse du trajet tubaire peut induire la découverte d'une éventuelle pathologie utérine associée, pouvant être responsable plutôt d'une hypofertilité que d'une infertilité.

Il reste que l'HSG conserve une indication « utérine » dans certaines situations :

- échec ou impossibilité de l'hystérocopie ;
- exploration de synéchies utérines complexes ;
- analyse de certaines malformations utérines atypiques ;
- contrôle des cicatrices de césarienne ;
- contribution à l'identification des béances cervico-isthmiques.

Synéchies utérines

L'hystérogographie HSG reste un bon moyen d'exploration des synéchies utérines en association avec l'hystérocopie.

Elle met en évidence deux types d'images :

- soit une image en doigt de gant du défilé cervico-isthmique en cas de synéchie isthmique complète ;
- soit des images lacunaires en carte de géographie, plus ou moins étendues, au niveau des bords ou du corps. Le cliché de profil met en évidence une image pathognomonique de synéchie se manifestant par un rapprochement ou un pincement complet des parois antérieure et postérieure de l'utérus.

L'hystérocopie est certainement aujourd'hui l'exploration de référence en matière de synéchies.

On sait toutefois la difficulté des cures hystéroscopiques devant certains processus complexes et/ou extensifs. C'est dans ce sens que l'hystérogographie, par le repérage complémentaire qu'elle suppose, peut-être un complément utile à cette prise en charge chirurgicale parfois difficile.

Adénomyose

L'hystérosalpingographie peut mettre en évidence une adénomyose :

- soit par des signes directs se manifestant par des diverticules des bords ou du fond associés ou non à un bouquet diverticulaire de la jonction isthmo-interstitielle des trompes ;
- ou par des signes indirects se manifestant :
 - par une rétroversion fixée réalisant une image en parasol de l'utérus,
 - par une segmentation en ligne brisée des bords et du fond utérin,
 - par un aspect en baïonnette du défilé cervico-isthmique devant être également recherché sur le cliché de profil,
 - par un aspect en tuba erecta des cornes utérines.

Elle ne peut toutefois plus être considérée aujourd'hui comme un examen de référence en ce qui concerne cette pathologie.

Malformations utérines

Dans l'étude de certaines malformations utérines, l'hystérosalpingographie garde un intérêt dans l'appréciation d'une hypoplasie utérine et surtout dans l'exploration de certains utérus communicants où la mise en évidence de la communication isthmique ainsi que l'existence d'un vagin borgne, avec ou sans reliquat urétéral, n'est pas toujours accessible à d'autres techniques

Utérus DES

Enfin, dans les anomalies après exposition *in utero* au Distilbène®, l'hystérosalpingographie met en

évidence des images typiques de strictions, de rétrécissements corporeaux, de pseudo-synéchies des bords dont la reconnaissance purement hystéroscopique n'est pas toujours simple. On retrouve ici la situation précédemment décrite à propos des synéchies. L'aspect de l'image globale cavitaire obtenu par l'HSG complète souvent utilement la vision partielle de l'espace endométrial qu'autorise l'hystérocopie. La conjonction des données de ces deux explorations contribue à l'éventuelle indication d'une hystéroplastie d'agrandissement.

Conclusion

Ainsi donc, ce serait une lourde erreur que négliger de nos jours les renseignements importants et irremplaçables que fournit l'HSG dans l'exploration de la fonction tubaire, à la réserve toutefois d'une réalisation technique irréprochable.

L'intérêt de cette exploration, dont la morbidité est faible si l'on respecte ses contre-indications et les précautions d'asepsie élémentaires lors de sa réalisation, n'est pas contestable. On peut toutefois regretter l'absence d'études comparatives sérieuses avec d'autres techniques plus récemment proposées.

Son positionnement est relatif dans le cadre de l'exploration du couple infertile.

Elle est certainement totalement inutile lorsque l'AMP de type FIV ou ICSI s'impose.

Elle est parfois peu contributive lorsque la normalité de la fonction tubaire est certaine. Mais peut-on en être certain en dehors de l'HSG ?

Elle est essentielle lorsque l'anamnèse rend compte de facteurs faisant suspecter une anomalie tubaire possible ou probable.

À la réserve d'une lecture compétente de clichés de bonne qualité, l'HSG a une grande valeur diagnostique et pronostique à laquelle doivent être intégrées les données de la coelioscopie. Ce serait en effet une erreur de croire que l'endoscopie suffit à apprécier la fonction tubaire dans sa globalité. C'est sur la conjonction des données de ces deux explorations que la trompe peut être parfaitement appréhendée dans son ensemble.

Mais c'est aussi sur la normalité de l'HSG dans le contexte d'une infertilité persistante que pourra être évitée une coelioscopie de bilan dont la contrainte peut sembler importante s'il s'agit de confirmer la normalité du pelvis. Il faut donc suivre les Recommandations officielles et institutionnelles qui régissent en France la prise en charge de l'infertilité. L'évaluation de la fonction tubaire appartient à celles-ci. L'hystérosalpingographie en demeure la référence.

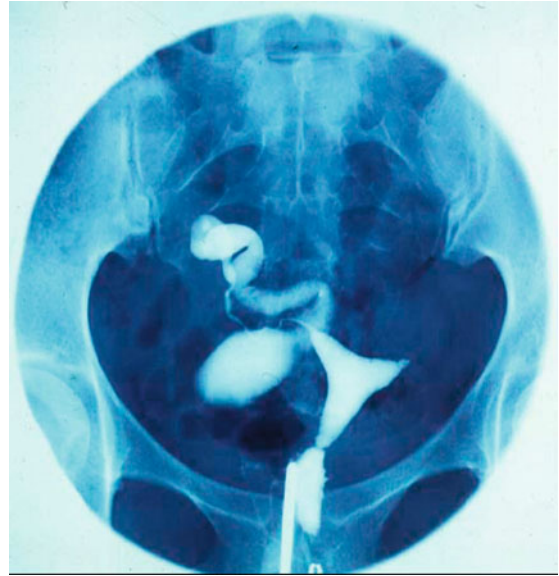
Références

1. Thomassin-Naggara I, Perrot N, Salem C *et al.* (2008) Pathologie tubaire. *Encycl Med Chir* (Paris, Elsevier SAS) 34-610 A-10
2. Belt M, Rodenko G, Keisha Taylo M *et al.* (2008) Use of gadolinium for hysterosalpingography in iodine allergic women: a case control study. *Fertil Steril* 90: 835-8
3. Silberzweig JE, Khorsandi AS, Caldon M, Alam S (2008) Gadolinium for hystero-salpingography. *J Reprod Med* 53: 15-9
4. Maubon A, Pouquet M, Mazet N *et al.* (2008) Imagerie de l'infertilité féminine. *J Radiol* 89: 172-84
5. Carrascosa P, Baronio M, Capuñay C (2008) Multidirector computed tomography virtual hysterosalpingography in the investigation of the uterus and fallopian tubes. *Eur J Radiol* 67: 531-5
6. Freeman-Walsh C, Fahrigr R, Ganguly A *et al.* (2008) A hybrid radiography/MRI system for combining hysterosalpingography and MRI in infertility Patients: Initial Experience. *AJR* 190: W157-W160
7. Hubacher D, Grimes D, Lara-Ricalde R *et al.* (2004) The limited clinical usefulness of taking a history in the evaluation of women with tubal factor infertility. *Fertil Steril* 81: 6-10
8. Ubaldi F, Wisanto A, Camus M *et al.* (1998) The role of transvaginal ultrasonography in the detection of pelvic pathologies in the infertility workup. *Hum Reprod* 13: 330-3
9. Tvarijonaviciene E, Nadisauskiene RJ (2008) The value of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology among infertile patients. *Medicina* (Kaunas) 44: 439-48
10. Sakar MN, Gul T, Atay AE, Celik Y (2008) Comparison of hysterosalpingography and laparoscopy in the valuation of infertile women. *Saudi Med J* 29: 1315-8
11. Swart P, Mol BW, van der Veen F *et al.* (1995) The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a metaanalysis. *Fertil Steril* 64: 486-91
12. Woolcott R, Fisher S, Thomas J, Kable W (1999) A randomized, prospective, controlled study of laparoscopic dye studies and selective salpingography as diagnostic tests of fallopian tube patency. *Fertil Steril* 72: 879-84
13. Bulletti C, Panzini I, Borini A *et al.* (2008) Pelvic factor infertility: diagnosis and prognosis of various procedures. *Ann NY Acad Sci* 1127: 73-82
14. Mol BW, Swart P, Bossuyt PM *et al.* (1996) Reproducibility of the interpretation of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology. *Human Reprod* 11: 1204-8
15. Simpson WL, Beitia LJ, Meister J (2006) Hysterosalpingography: a reemerging study. *RadioGraphics* 26: 419-31
16. Johnson N, Vandekerckhove P, Watson A *et al.* (2005) Tubal flushing for subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD003718
17. Mol BW, Swart P, Bossuyt PM *et al.* (1997) Is hysterosalpingography an important tool in predicting fertility outcome? *Fertil Steril* 67: 663-9
18. Canis M, Mage G, Pouly JL *et al.* (1991) Laparoscopic distal tuboplasty: report of 87 cases and a 4-year experience. *Fertil Steril* 56: 616-21
19. Papaioannou S (2004) A hypothesis for the pathogenesis and natural history of proximal tubal blockage. *Hum Reprod* 19: 481-5
20. Schemoul G, Silvera S, Augui J *et al.* (2007) Radiologically-guided hysterosalpingography and tubal catheterization. *Gynecol Obstet Fertil* 35: 55-9
21. Vardhana PA, Silberzweig JE, Guarnaccia M, Sauer MV (2009) Hysterosalpingography with selective salpingography. *J Reprod Med* 54: 126-32
22. Li QY, Zhou XL, Qin HP *et al.* (2004) Analysis of 1006 cases with selective salpingography and fallopian tube recanalization. *Chan Ke Za Zhi* 39: 80-2

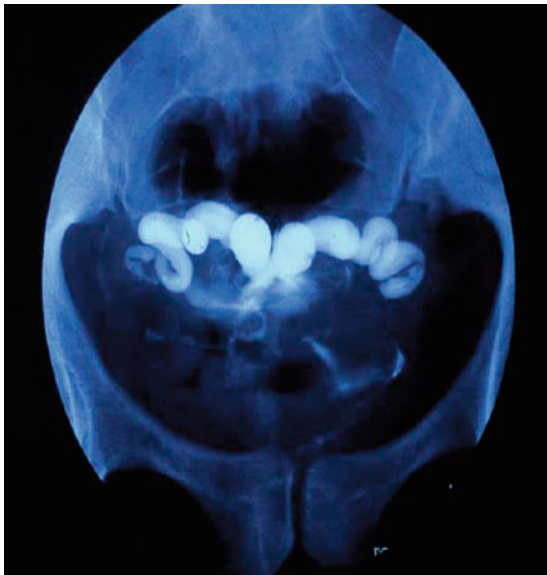
Atlas Hystérosalpingographie



Cliché en évacuation. Obstruction complète distale droite avec hydrosalpinx. Passage partiel infundibulaire gauche (phimosi). Conservation du plissé muqueux ampullaire.



Cliché en réplétion. Obstruction proximale gauche. Obstacle complet distal droit. Aspect hétérogène du contenu ampullaire (hématosalpinx ?).



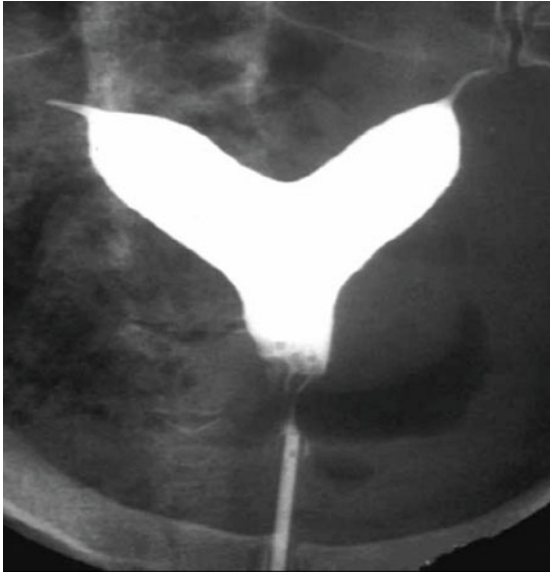
Cliché tardif. Séquestration ampullaire complète et bilatérale. Persistance du plissé muqueux ampullaire proximal.



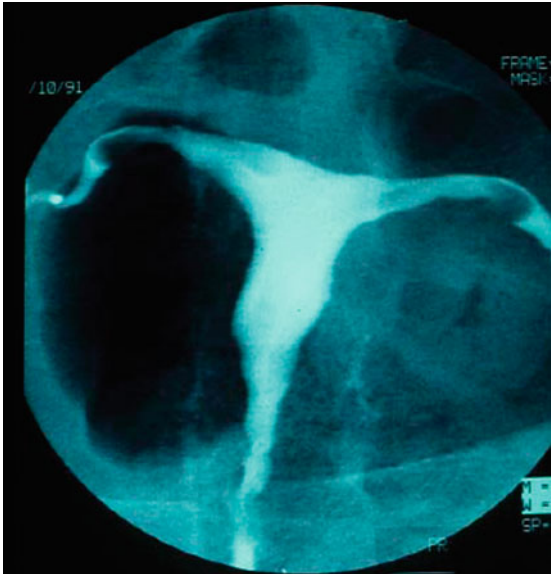
Cliché de profil. Situation hétérotopique d'une trompe fixée en position haute. Adhérences annexielles probables.



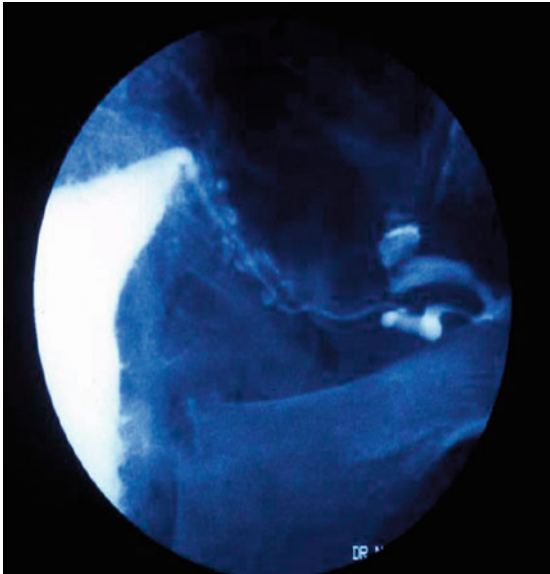
Obstruction proximale bilatérale dite à « corne ronde » sans aucune opacification tubaire interstitielle. Spasme cornual vraisemblable.



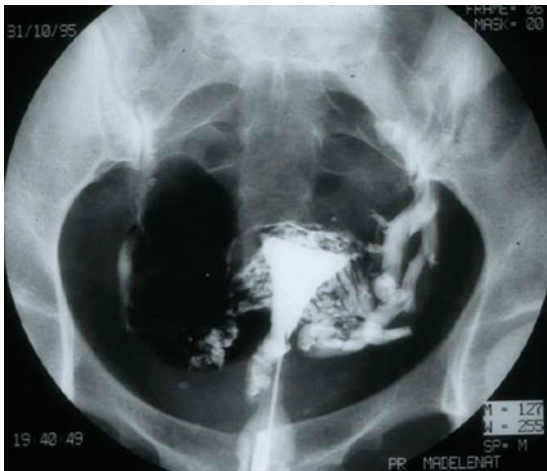
Obstruction proximale bilatérale avec opacification partielle des trompes interstitielles. Organicité certaine.



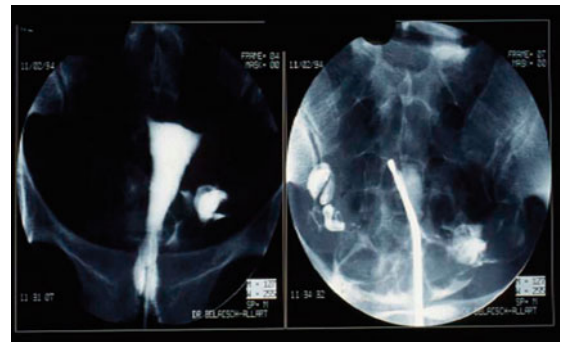
Polype cornual bilatéral de topographie interstitielle avec conservation de la perméabilité tubaire.



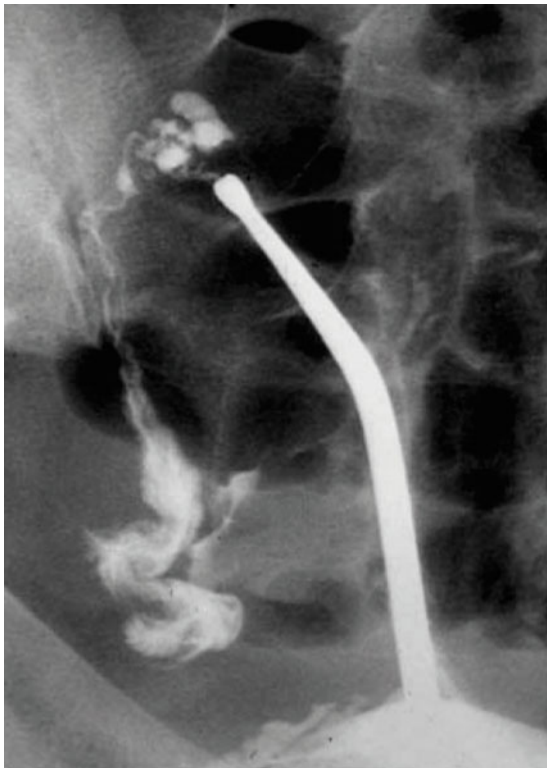
Trompe interstitielle et isthmique gauche. Diverticules multiples péri-luminaux d'origine post-infectieuse.



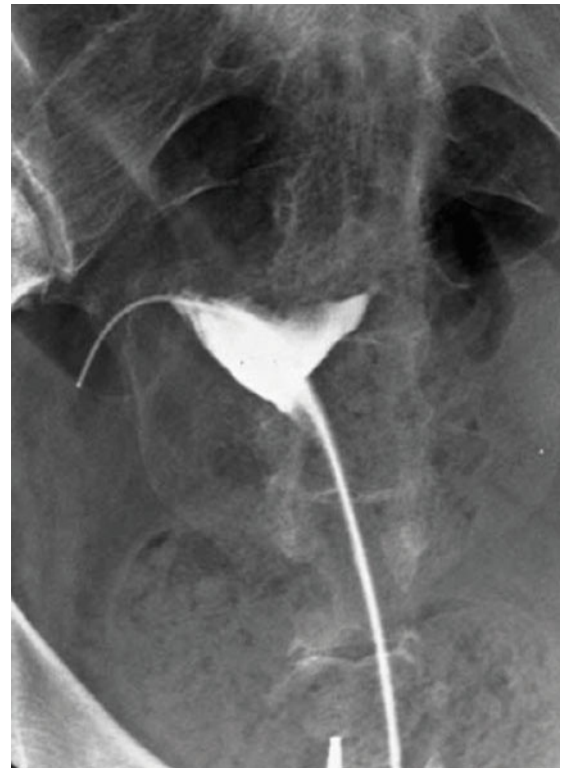
Obstruction tubaire proximale bilatérale organique. Passage vasculaire du produit de contraste avec opacification de la veine utérine gauche.



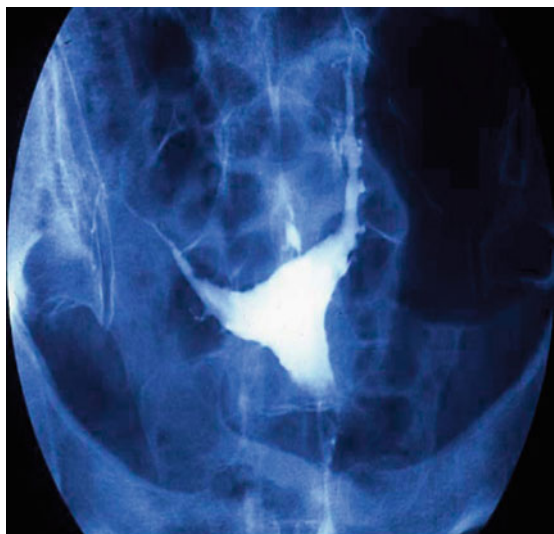
Obstruction tubaire proximale droite. Cathétérisme sélectif avec opacification de la trompe.



Cathétérisme tubaire droit. Opacification d'une trompe pathologique : diverticules proximaux. Hétérogénéité du contenu ampullaire.



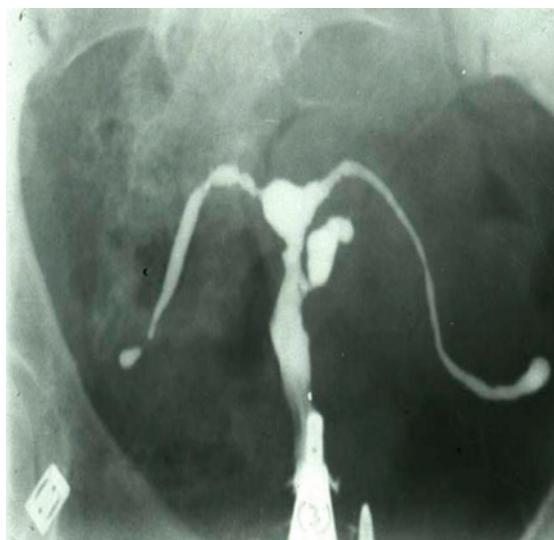
Reperméabilisation tubaire proximale par montée d'un cathéter de type Terumo.



Adénomyose utérine (diverticule fundique) et cornuale avec aspect érigé des trompes interstitielles et isthmiques.



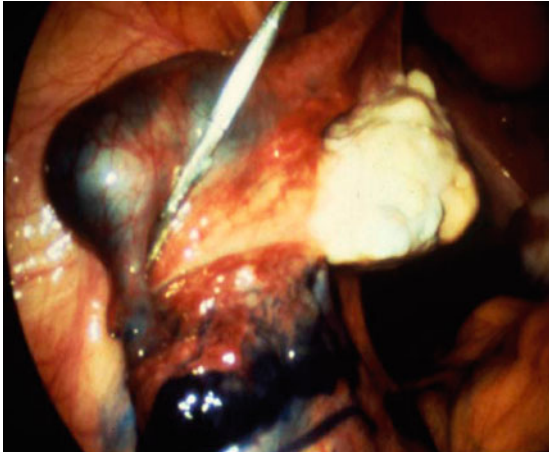
Aspect moniliforme de la trompe isthmique et interstitielle gauche. Tuberculose probable.



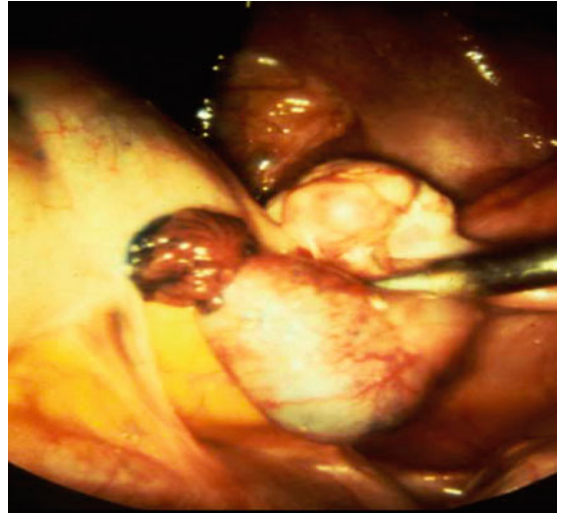
Tuberculose utérine et tubaire. Synéchie cavitaire. Caverne myométriale gauche. Dilatation scléreuse des trompes interstitielles et isthmiques. Obturation à la jonction isthmo-ampullaire.



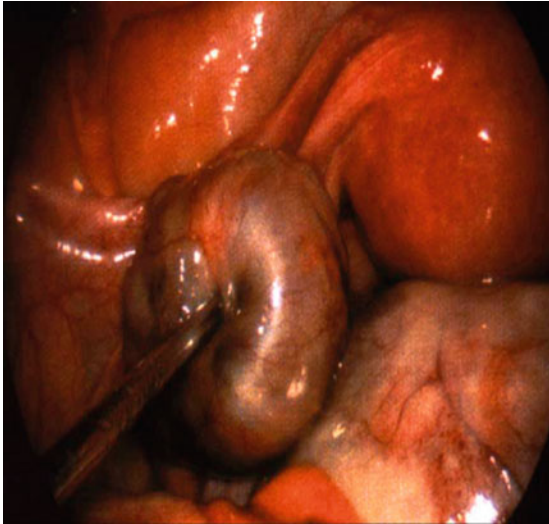
Cliché en réplétion. À droite sténose médio-ampullaire après exérèse d'une première GEU. Récidive ectopique gauche. Visualisation de l'œuf dans l'ampoule.



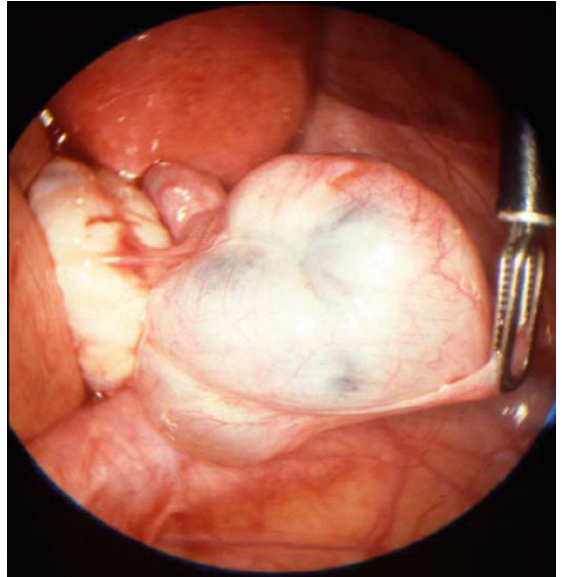
Annexe gauche. Phimosis infundibulaire serré avec visibilité transpariétale du liquide d'hydrotubation.



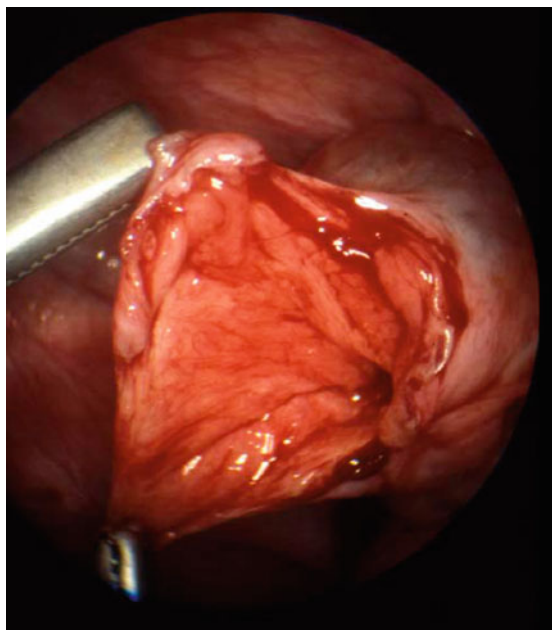
Annexe droite. Adhérences péri-ovariennes. Phimosis infundibulaire avec anneau péritonéal de striction. Le liquide d'hydrotubation n'est pas visible dans l'ampoule. Pachysalpingite probable.



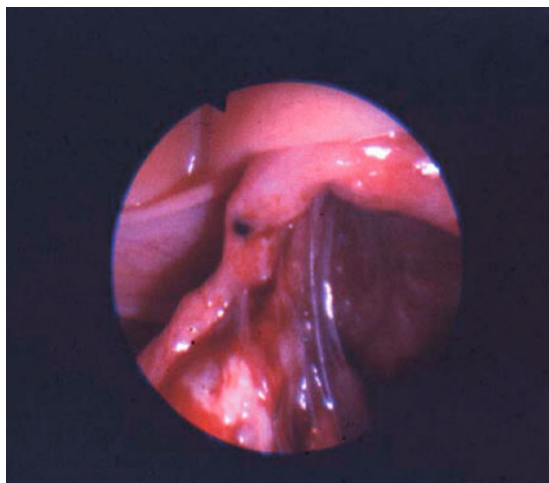
Obstruction distale complète sans aucun reliquat infundibulaire. Aspect normal de la paroi ampullaire.



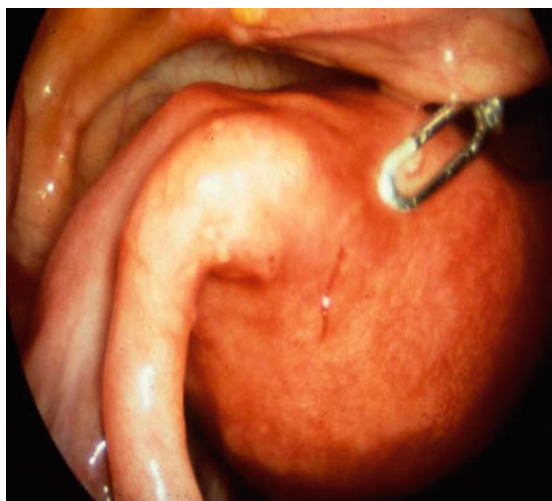
Obstruction distale complète sans reliquat infundibulaire. Épaississement et sclérose de la paroi ampullaire.



Ouverture du cæcum tubaire exposant la muqueuse ampullaire dont le plissé et la trophicité sont conservés.



Adhérences vélamenteuses ovaro-tubaires gauches. Nodule isthmique proximal avec diverticule hémattique visible sous la séreuse.



Lésions post-infectieuses concernant massivement la trompe interstitielle et isthmique.



Gros nodule isthmo-interstitiel respectant l'isthme distal et l'ampoule.

J.-M. Levailant, F. Lamazou,
B. Benoit et E. Faivre

Place de l'échographie 2D-3D dans le bilan de l'infertilité

Introduction

L'échographie occupe désormais une place incontournable dans le diagnostic et la prise en charge des infertilités féminines, ainsi que dans la mise en œuvre des techniques de procréation médicalement assistée.

Les modalités, chronologiques en particulier, de la réalisation d'un bilan d'infertilité et de la surveillance d'une procédure de stimulation ovarienne dans la perspective d'une procréation médicalement assistée seront abordées ainsi que les aspects échographiques des différents éléments anatomiques du tractus génital féminin dont les anomalies sont susceptibles d'interférer avec la fertilité.

Le compte des follicules antraux (CFA) occupe une place à part dans le bilan de l'infertilité. En effet, il détermine le choix de la prise en charge. Il est donc traité en tête de ce chapitre, avant l'investigation de l'appareil génital.

L'échographie pelvienne est devenue primordiale dans le bilan de l'infertilité féminine.

Au 3^e jour du cycle, le bilan échographique permet de visualiser le reflet direct de la réserve ovarienne : le compte des follicules antraux. En effet, la réponse à la stimulation ovarienne semble corrélée à ce stock de follicules en réserve (1). Cette réserve ovarienne se constitue à partir du quatrième mois de la vie fœtale (2). Elle est constituée de trois types de follicules : les follicules primordiaux, les follicules intermédiaires et les follicules petits primaires (1). Les deux modes de sortie de cette réserve ovarienne sont soit par atresie folliculaire, surtout avant 30 ans, soit par croissance folliculaire (1). Le processus d'initiation de la croissance folliculaire semble être régulé indépendamment des gonadotrophines (4). Les mécanismes d'initiation de la croissance sont encore mal connus mais feraient intervenir le système kit (5-7). Cette initiation qui correspond plus à une maturation aboutit à la formation de petits follicules antraux (1 à 5 mm) et follicules antraux de plus de 5 mm qui sont FSH-répondeurs. Les cellules de la granulosa deviennent sensibles à la stimulation par la FSH seulement à un stade avancé quand les follicules font entre 2 et 10 mm (3).

Ces follicules deviennent visibles au cours de la phase lutéale du cycle précédent. En début de cycle, les follicules qui vont devenir sensibles à la FSH puis à la LH mesurent entre 2 et 10 mm (3) et ce chiffre va rester stable d'un cycle à l'autre (8). Les techniques actuelles de stimulation ovarienne ne permettent actuellement pas de recruter les follicules dans le stock ovarien, mais vont essayer d'empêcher l'apoptose des follicules non dominants. La stimulation ovarienne à l'aide de gonadotrophines exogènes va donc permettre la croissance d'un pourcentage des follicules comptés lors de l'échographie de j3. Le nombre de follicules arrivant à maturation après stimulation ovarienne, même s'il est variable d'une patiente à l'autre, va permettre de prévoir la réponse à la stimulation ovarienne en termes d'ovocytes récupérés sans pour autant être prédictif de la survenue d'une grossesse (9).

Le compte des follicules antraux, même s'il possède une valeur prédictive dont nous parlerons ensuite, doit être corrélé à des éléments cliniques et biologiques et ne peut à lui seul décider d'une prise en charge ou non en assistance médicale à la procréation. Il faut faire une analyse globale du pronostic de la patiente en prenant en compte les éléments cliniques et les marqueurs biologiques à j3 du cycle.

• Éléments cliniques :

- l'âge ;
 - la durée et la régularité des cycles ;
 - l'existence d'un tabagisme ;
 - l'indice de masse corporelle ;
 - les antécédents en particulier gynécologiques de la patiente : endométriose, salpingite chirurgie ovarienne, etc. ;
 - les antécédents obstétricaux.
- Marqueurs biologiques à j3 du cycle :
- taux de FSH et de LH ;
 - taux d'œstradiol ;
 - taux d'inhibine b (sensible aux troubles de la croissance folliculaire) ;
 - taux de l'hormone antimüllérienne (AMH).

D'après la méta-analyse de Broekmans *et al.* (9), ces différents marqueurs, pris isolément, n'ont cependant qu'une faible valeur prédictive sur la réponse ovarienne. La FSH, considérée comme anormale

au-delà de 10 UI/mL, n'est réellement de mauvais pronostic que pour des valeurs très élevées, au-delà de 20 à 25 UI/mL (10). Seuils d'autant plus difficiles à analyser puisqu'ils seraient dépendants du polymorphisme des récepteurs à la FSH (11), qui influencerait également la réponse à la stimulation ovarienne (12). L'AMH produite par les cellules de la granulosa par les follicules en phase de croissance, son dosage dans le sang semble être un marqueur quantitatif de la réserve ovarienne (13). Cette hormone semble avoir une valeur prédictive de la réponse à la stimulation ovarienne équivalente à celle du CFA et supérieure à celle de la FSH et de l'inhibine b. Toutefois, aucun de ces marqueurs n'est prédictif de la grossesse.

Bilan de j3 : évaluation de la réserve ovarienne

Place de l'échographie de j3-j5

Elle consiste à compter de façon précise le nombre de follicules antraux de 2 à 10 mm qui sont FSH-répondeurs (3). Ce chiffre reste stable d'un cycle à l'autre (8) et la répétition des CFA n'améliore pas la valeur prédictive du test (14). Plusieurs études (15, 16) ont retrouvé une bonne corrélation entre le nombre de follicules antraux et le nombre d'ovocytes collectés ainsi qu'avec l'incidence des hyperstimulations ovariennes (17). Après 40 ans, le premier signe de vieillissement ovarien est la diminution du nombre de petits follicules antraux de 1 à 5 mm (18). Le CFA est sur-

tout prédictif de la mauvaise réponse ovarienne en nombre de follicules en croissance (19, 20) mais le seuil varie encore entre 3 et 10 selon les auteurs (tableau I). L'équipe de Hsieh (21), dans une série de 372 patientes a essayé de proposer les seuils suivants (tableau II) :

- CFA inférieur ou égal à 3 follicules ;
- CFA entre 4 à 10 follicules ;
- CFA supérieur à 10 follicules.

Toutefois, les écarts d'âge entre les groupes des différentes études ne permettent pas de conclure de façon aussi catégorique, aussi il n'existe pas actuellement de valeur limite validée.

En conclusion, le CFA permet de prédire la réponse la stimulation ovarienne avec le risque d'hyperstimulation ou de mauvaise réponse mais il ne permet pas de prédire la grossesse (20).

Le CFA est prédictif de la mauvaise réponse ovarienne en nombre de follicules en croissance (tableau I).

Techniques échographiques utilisées dans le compte folliculaire

Le compte des follicules antraux se fait le plus souvent manuellement en 2D, à l'aide d'une sonde de 6,5 à 7,5 MHz. L'ovaire est visualisé en coupe longitudinale et doit occuper au moins 50 % de l'écran. Le CFA de 2 à 10 mm se fera au cours d'un balayage lent et régulier de la sonde d'un côté de l'ovaire à l'autre. Il faut ensuite les mesurer un par un. En effet, si tous les follicules sont de la même taille, la cohorte est homogène et tous les follicules répondront à la stimulation ovarienne de façon a

Tableau I – CFA et prédiction de mauvaise réponse à la stimulation ovarienne.

	Nombre	Valeur CFA mauvaise répondeuse	Sensibilité	Spécificité
Chang, 1998 (15)	149	< 3	0,73	0,96
Ng, 2000 (17)	128	< 4	0,33	0,92
Frattarelli, 2000 (22)	278	< 10	0,87	0,41
Hsieh, 2001 (21)	372	< 3	0,61	0,94
Nahum, 2001 (23)	272	< 6	0,95	0,69
Bancsi, 2002 (24)	120	< 4	0,30	0,96
Frattarelli, 2003 (25)	267	< 4	0,30	0,96
Yong, 2003 (26)	47	< 4	0,09	0,97
McIlveen, 2007 (27)	84	< 5	0,34	0,89

En termes de sensibilité et de spécificité, les résultats des différentes études varient de 9 à 95 % pour la sensibilité et de 39 à 96 % pour la spécificité.

Tableau II – Réponse à la stimulation ovarienne en fonction du CFA : extrait de l'article de Hsieh *et al.* 2001 (21).

	Âge	FSH	Taux d'annulation	Nbre d'ovocytes recueillis à la ponction	Nbre d'embryons obtenus	Taux de grossesse	Taux d'implantation
0 à 5 follicules	35,3	14,3	34,4 %	2,9	2,2	11,1 %	3,0 %
4 à 10 follicules	31,9	5,9	2,7 %	8,2	6,5	34,6 %	8,2 %
11 follicules et plus	28,5	4,1	0,9	14,5	11,7	35 %	8,9 %

priori équivalente. Il faut noter une disposition en couronne des follicules avec une hypertrophie stromale orientant vers un syndrome des ovaires polykystiques à ne pas confondre avec l'ovaire d'une patiente qui a une forte réserve ovarienne et qui ne répondra pas du tout de la même façon à la stimulation ovarienne. À l'inverse, si on observe un ou plusieurs follicules plus volumineux que les autres au sein de cette cohorte, on peut craindre un recrutement précoce dans le cadre d'un vieillissement ovarien. Dans ce cas, lors de la stimulation ovarienne, la cohorte risque de se dissocier avec une croissance exclusive des plus gros follicules. Les clichés à mettre dans le compte rendu sont la coupe longitudinale de chaque ovaire. En cas de cohorte inhomogène, il faut ajouter le ou les clichés avec les mesures des plus gros follicules.

L'examen 3D de l'ovaire, que ce soit avec le mode multiplanar ou le mode inversion, est un examen fiable concordant avec l'examen en 2D. Il est réalisé à l'aide d'une sonde endo-vaginale 3D de 6 à 7,5 MHz, avec des angles d'acquisition pouvant aller à 90, 120 ou 180 degrés.

Après avoir réglé le cadre de l'acquisition et la résolution de l'acquisition désirée, l'ovaire doit être pris dans un axe longitudinal au niveau de sa zone médiane. L'acquisition se fait automatiquement en quelques secondes. La sonde doit être gardée immobile. On demande à la patiente de bloquer sa respiration.

Les biais peuvent venir de la mobilité de l'artère iliaque ou du tube digestif, mais la réduction de la qualité de l'acquisition permet de les éviter en diminuant la durée de l'acquisition.

Le CFA peut se faire de deux manières :

- soit manuellement sur le bloc ovarien obtenu avec le mode multiplanar sur l'échographe ;
- soit de façon automatique sur l'appareil d'échographie ou sur un ordinateur personnel à l'aide d'un programme automatique.

Il existe plusieurs programmes automatisés permettant le compte des follicules antraux :

- le mode « 3D-rendered inversion mode » sert à éliminer le parenchyme ovarien et à ne garder que les follicules, après avoir éliminé tous les tissus extraovariens à l'aide du mode « Magic Cut » ;
- les images 3D peuvent ensuite être retravaillées afin d'améliorer le rendu des acquisitions, avec des animations comme le mode « 3D cine-loop » ;
- enfin, le « Sono AVC » permet la mesure automatique et quasi instantanée des follicules en calculant les trois diamètres moyens et le volume de chaque follicule.

Jayapraskasan *et al.* (28) ont comparé au 3^e jour du cycle le compte folliculaire en 2D, 3D avec le mode multiplanar et avec le mode 3D inversion. Ses résultats montrent une différence significative entre le compte folliculaire « 3D mode inversion » et le

compte en 2D. La même différence statistiquement significative est observée entre les deux modes 3D inversion et multiplanar. Il conclura à l'existence d'une corrélation entre le CFA et le nombre d'ovocytes recueillis avec le mode inversion 3D comme mode de référence.

Cette notion de sous-évaluation du CFA effectuée manuellement se retrouve dans la plupart des études.

En 2008, Jayaprakasan *et al.* (29) ont confirmé à nouveau la reproductibilité interobservateur de la technique 3D et la corrélation entre l'étude multiplanar et le compte 2D : mais surtout, ils ont confirmé la réduction du temps de l'examen par un facteur de 2,3 au profit du mode 3D.

Le réel intérêt de la technique 3D semble donc être organisationnel, avec un gain de temps conséquent lors de l'examen. Ce gain augmente avec le développement du Sono AVC, qui permet un compte automatique des follicules antraux, associé à une volumétrie, et dont l'efficacité est encore en évaluation. En effet, le mode de SonoAVC ne fonctionne de façon fiable que si l'acquisition est de bonne qualité, avec des ovaires proches de la sonde sans artéfacts (en particulier les cônes d'ombres).

Étude du volume ovarien

Le volume ovarien calculé à l'aide du mode VOCAL semble être un bon reflet de l'âge ovarien puisque le volume diminue avec l'âge (30). Il s'agit d'un indicateur reproductible (31) qui semble prédictif d'une mauvaise réponse ovarienne et/ou d'annulation de stimulation mais avec une valeur prédictive plus faible que celle du compte des follicules antraux. Concernant la grossesse, le volume ovarien n'est pas prédictif de grossesse. Son utilisation en pratique courante est donc limitée.

Intérêt du Doppler

Peu d'études se sont intéressées à la vascularisation de l'ovaire avant la stimulation ovarienne. Zaidi *et al.* (32) ont trouvé que l'index de pulsabilité au niveau du stroma ovarien n'a pas de valeur prédictive, mais que la vitesse du flux systolique était corrélée à la réponse ovarienne et en particulier les mauvaises réponses en cas de vitesses abaissées. Engman *et al.* (33,34) et Kupesic *et al.* (35) confirment ces données de meilleures réponses ovariennes avec plus d'ovocytes matures et de meilleurs taux de grossesse lorsque la vitesse des flux systoliques au niveau des artères du stroma ovarienne est supérieure ou égale à 10 cm/s. Cette différence s'atténue après désensibilisation hypophysaire (33, 34).

L'utilisation du Doppler sur les blocs de reconstruction 3D a été étudiée par Ng *et al.* (36). Les critères étudiés étaient le « vascularisation index » (VI), qui représente le nombre de voxels colorés dans le bloc 3D représentant les vaisseaux, le « flow index » (FI) qui correspond à l'intensité de la couleur du voxel représentant la vitesse moyenne des flux et le « vascularisation flow index » (VFI) qui est une combinaison de la vascularisation et de la vitesse des flux. Aucun de ces facteurs ne semble corrélé à la réponse ovarienne.

En conclusion, la mesure de la vitesse du pic systolique au niveau des artères ovariennes semble être indicative de la réponse ovarienne, mais le faible nombre d'études à ce jour ne permet pas de conclure de façon formelle. La 3D ne semble pas apporter de bénéfice dans ce domaine.

Retenir l'essentiel

- Le compte des follicules antraux est prédictif de la mauvaise réponse ovarienne et non du taux de grossesse.
- Un CFA anormal (12 % des cas dans les études) annonce une mauvaise réponse à la stimulation dans 70 % des cas.
- Un compte folliculaire bas ne signifie pas que la qualité folliculaire sera altérée.
- Le compte des follicules antraux doit donc faire partie du bilan d'exploration de toute infertilité, mais il ne doit toutefois pas exclure des patientes de certaines prises en charge en AMP.
- Le compte des follicules en 3D permet un gain de précision et surtout un gain de temps important sur cet examen. Toutefois, il n'est pas encore applicable à l'ensemble des patientes, et il faut toujours contrôler la qualité de l'acquisition.

Bilan morphologique en infertilité

L'analyse du corps utérin a pour objectif de trouver des causes de l'infertilité et d'éliminer des patholo-

gies pouvant interférer avec l'implantation et l'évolution de la grossesse.

L'examen débute avec la position de l'utérus dans le pelvis et la mesure des différentes dimensions de l'utérus : longueur, hauteur et largeur. La longueur utérine ne doit pas être mesurée d'une traite de l'orifice externe au fond utérin car cette mesure sous-estime la taille de l'utérus. Cette mesure doit être faite en additionnant les différentes mesures suivantes : orifice externe-orifice interne + orifice interne-isthme + isthme-fond utérin. Lors de la mesure de la hauteur utérine, il faut noter une éventuelle asymétrie du mur antérieur/postérieur pouvant faire évoquer une adénomyose ou un fibrome. La largeur est mesurée d'une corne à l'autre. Une image de chacune de ces mesures doit être présente avec le compte rendu.

L'hystérométrie, de la même façon que la longueur utérine, ne peut être mesurée d'une traite, il faut soit suivre la ligne de vacuité manuellement de l'orifice externe au fond de la cavité, soit la mesurer par segment : orifice externe-orifice interne + orifice interne-isthme + isthme-fond de la cavité. Le cliché est systématiquement joint au compte rendu. Une mesure inférieure à 65 mm doit faire évoquer une cloison utérine ou un fond arqué qui devra être vérifié par une acquisition en trois dimensions avec reconstruction de la coupe frontale de l'utérus. Un utérus hypotrophe avec une hystérométrie inférieure à 65 mm est un facteur de risque élevé de prématurité en cas de grossesse gémellaire.

L'endomètre à j3 du cycle (tableau III) en l'absence de traitement doit être atrophique, une épaisseur supérieure à 5 mm doit faire penser soit à un polype, soit à une hypertrophie de l'endomètre (tableau IV) soit à une phase folliculaire avancée ou une phase lutéale.

Tableau III – L'endomètre en cours du cycle.

• Critères de normalité de l'endomètre : La cavité utérine est de forme rectiligne en coupe sagittale et axiale, triangulaire en coupe coronale. L'aspect et l'épaisseur de l'endomètre permettent de préciser la phase du cycle. La mesure de l'endomètre se fait sur une coupe sagittale stricte, incluant les deux feuillets de l'endomètre. En tenant compte de la présence d'une activité génitale et de la période du cycle, tout ce qui ne respecte pas ces critères (continuité, régularité, épaisseur adaptée) doit être considéré comme pathologique.
• Phase proliférative : – l'endomètre est hypoéchogène de part et d'autre de la ligne cavitaire, qui est échogène et doit être continue – épaisseur : ⇒ 4 à 6 mm à j8, ⇒ 8 à 12 mm à j12.
• Période périovulatoire : – aspect en cible, en grain de café ; – fin liseré périphérique échogène (basale) cernant l'endomètre hypoéchogène, centré par la ligne cavitaire.
• Phase lutéale : – l'endomètre s'épaissit et devient hyperéchogène, de la basale vers la ligne cavitaire. – épaisseur : 14 mm à j21.

Tableau IV – Biométrie endométriale et hypertrophie.

Hypertrophie endométriale
• Endomètre anormalement épais : – supérieur à 5 mm sans THS ; – supérieur à 8 mm avec THS – supérieur à 14 mm en période d'activité génitale.
• Endomètre hyperéchogène, homogène, où siègent de petites formations kystiques, n'effaçant pas la ligne cavitaire toujours visible.
• Confusion possible avec un polype occupant toute la cavité : – chercher l'écho médian continu ; – chercher le pédicule vasculaire du polype.
• Hystérosonographie : – confirmation diagnostique par visualisation de l'épaississement diffus de l'endomètre ; – l'existence de plis plus épais, polypoides, peut conduire à discuter l'existence de polypes.

Cavité - Malformations utérines et vaginales

Les malformations utérines ont une prévalence globale de l'ordre de 1 à 4 %, et rendent compte de 10 % des cas d'infertilité. Le diagnostic des anomalies de l'utérus et de sa cavité s'effectue à l'aide de deux techniques d'image : l'échographie en 2D-3D associée ou non à la sonographie et l'IRM, ainsi que d'une technique d'exploration : l'HSG. L'hystérocopie permet l'exploration et le traitement.

L'échographie 3D peut être considérée comme l'examen de référence dans le diagnostic des pathologies de ce type grâce à une acquisition instantanée dans les trois plans et à une restitution précise des coupes frontales.

Les malformations utérines peuvent être classées soit selon les classifications françaises comme celle de Musset, soit selon celle de l'American Fertility Society (AFS).

Agénésies mullériennes

Elles se présentent sous forme d'aplasies utérines bilatérales incomplètes ou segmentaires (AFS type I) et d'aplasie unilatérale ou utérus unicorne (AFS type II).

- Les aplasies utérines bilatérales incomplètes sont rares. Le diagnostic est le plus souvent apporté par l'échographie réalisée à la puberté devant une aménorrhée primaire sans trouble des caractères sexuels secondaires. Sur le plan échographique, l'utérus est réduit à deux cornes rudimentaires non canalisées rarement asymétriques (bandelette fibreuse). Les clichés montrent l'absence de vagin. Parfois, on observe un nodule échogène rétrovésical, avec un aspect d'utérus infantile sans ligne de vacuité, ou bien des anomalies de développement des trompes.

- L'aplasie unilatérale peut être complète ou incomplète. Dans le cas de l'aplasie unilatérale complète, l'utérus unicorne vrai se traduit en échographie 2D et 3D par une corne utérine de petite taille, avec un corps et un col fortement latéro-déviés (la latéro-déviatation n'est pas suffisante au diagnostic). La cavité présente en coupe frontale un aspect flammèche. On

observe souvent l'absence du rein du côté controlatéral, un vagin normal, ainsi qu'un ovaire normal du côté de l'hémi-utérus et une agénésie ovarienne plus ou moins complète de l'autre côté.

- L'aplasie unilatérale incomplète est plus fréquente que l'agénésie mullérienne unilatérale complète. L'utérus pseudo-unicorne échappe à l'hystérographie et la visualisation d'une ébauche utérine et tubaire controlatérale non reliée au col n'est pas toujours facile en échographie car celle-ci est souvent très petite. La reconstruction tridimensionnelle du plan frontal constitue un moyen intéressant pour préciser le diagnostic.

Anomalies de la fusion des canaux de Muller

Elles se présentent sous forme d'utérus bicorne bicervical (AFS type III) ou d'utérus bicorne unicervical.

- L'utérus bicorne bicervical se caractérise cliniquement par la présence de deux cols distincts.

- L'utérus bicorne unicervical comporte un col, un isthme (forme partielle) ou deux isthmes (forme complète) et deux cornes divergentes. Dans certains cas, les cornes utérines sont de taille inégale.

Anomalies de la résorption des canaux de Muller

Ce sont les anomalies les plus fréquentes. L'absence de résorption de la zone d'accolement des canaux de Muller conduit à la persistance d'une cloison médiane de hauteur variable dans la cavité utérine, pouvant descendre jusqu'à l'orifice interne du col. L'existence d'un utérus cloisonné s'accompagne d'un risque élevé de fausses couches. L'utérus cloisonné peut être de type subtotal (AFS type Va), total (AFS type Vb), fundique ou à fond arqué (AFS type VI).

- L'utérus cloisonné subtotal se caractérise par une cloison pouvant s'étendre jusqu'à l'isthme. En coupe frontale 3D, le myomètre présente un aspect le plus souvent convexe ou une très discrète échancre, inférieur à 1 cm.

- L'utérus cloisonné total se caractérise par une cloison complète qui clive l'utérus en deux hémi-

cavités prolongées par deux orifices voisins sur un col unique.

- Les utérus cloisonnés totaux (type Va selon la classification de l'AFS) sont parfois difficiles à différencier en imagerie des utérus bicornes (type III si bicervical et type IV si monocervical), et surtout sont souvent méconnus des radiologues. Les utérus cloisonnés, contrairement aux utérus bicornes, peuvent être pris en charge chirurgicalement avec section de la cloison, permettant ainsi d'améliorer le pronostic obstétrical des patientes. Cela permet une diminution du nombre de fausses couches spontanées et d'accouchements prématurés.
- L'utérus cloisonné fundique ou à fond arqué n'a pas de conséquence clinique. Le fond myométrial et la séreuse sont convexes et le fond de la cavité est légèrement concave.

Hypoplasies (AFS type VII)

Elles se différencient en hypoplasies utérines globales et anomalies utérines liées au diéthylstilbestrol (DES).

- L'hypoplasie utérine globale est affirmée sur des critères biométriques. Un utérus est hypoplasique si sa longueur est inférieure à 50 mm et sa largeur intercornuale inférieure à 20 mm.
- Les anomalies utérines liées au DES sont consécutives à l'utilisation, jusqu'en 1977, du DES chez la femme enceinte.

Retenir l'essentiel

L'utérus cloisonné est la malformation la plus fréquente des malformations d'origine mullérienne (55 %). L'utérus bicorne monocervical est bien moins fréquent (10 %). L'utérus bicorne bicervical est une des plus rares (5 %).
L'association des malformations utérines et des malformations rénales est bien connue. Elle est fréquente en cas d'utérus bicorne (30 % des cas si l'utérus est bicervical). En cas d'utérus cloisonné, la fréquence rejoint celle de la population générale. En échographie comme en IRM, un complément d'examen sur les reins est indiqué. L'exploration des reins est indispensable, elle n'est cependant qu'un élément très indirect pour différencier un utérus bicorne et un utérus cloisonné.

Considérations techniques pour rendre plus efficace l'examen échographique

Le principe de base dans l'analyse de la cavité utérine est que toute perte de l'image normale en plu-

sieurs feuillets réguliers peut évoquer une pathologie cavitaire ou myométriale (cf. Annexe I).

L'imageur a deux rôles : un rôle diagnostique et un rôle préthérapeutique.

En effet, plusieurs mesures aideront le chirurgien :

- la longueur d'un ostium à l'autre ;
- la longueur de l'éperon ;
- la marge de sécurité avec le fond ;
- la mesure du volume de la cavité.

En échographie 2D, le signe d'appel est l'existence d'une rupture de la continuité de la ligne cavitaire mise en évidence par le balayage sagittal et parasagittal.

Les mesures biométriques sont pratiquées facilement en échographie 3D vaginale sur des coupes coronales, où la cavité utérine est bien visible lorsque l'endomètre est en deuxième partie de cycle.

En échographie 3D, les signes diagnostiques apparaissent sur les coupes coronales : la cavité utérine a un aspect triangulaire normal.

L'hystérosonographie 3D permet d'améliorer l'exploration de la cavité utérine. Cette technique apporte les données nécessaires au bilan préthérapeutique, en fournissant un moulage et des mesures biométriques de l'éperon, et en précisant la largeur ostiale et le volume cavitaire.

En échographie 3D vaginale, trois critères majeurs permettent d'établir le diagnostic des malformations utérines :

- la morphologie de la séreuse et la forme du myomètre ;
- la forme de la cavité ;
- l'aspect du col.

Quatre critères mineurs complètent le diagnostic (tableau V) :

- la distance ostiale ;
- l'angle entre les cavités ;
- l'aspect Doppler couleur du myomètre ;
- l'agénésie rénale associée.

Synéchies

La recherche de synéchie est souvent orientée du fait des antécédents de la patiente : curetages, césariennes, myomectomies.

Dans leur forme typique, il s'agit d'une amputation d'une portion de l'endomètre ; dans les formes globales où les faces antérieures et postérieures sont collées, il est impossible de visualiser l'endomètre. L'échographie de la synéchie est possible en respectant la méthode suivante :

Tableau V – Critères morphologiques des principales malformations utérines.

	Séreuse	Cavité	Col
Utérus bicorne	Incisure fundique > 10 mm	2 cavités bien distinctes	Bicervical (deux vrais massifs)
Utérus bicorne unicervical	Incisure fundique > 1 cm	2 cavités divergentes	Col unique
Utérus bicorne bicervical	Incisure fundique > 1 cm	2 cavités divergentes de 180°	Col double (utérus didelphe)
Utérus cloisonné	Incisure fundique < 10 mm ou absente	Éperon fibreux plus ou moins central	Un seul massif (parfois, cloison cervicale

- visualisation en coupe sagittale de l'écho médian hyperéchogène de la cavité ;
 - recherche d'une interruption de cette ligne avec perte sur une distance mesurable de l'image endométriale : cette « perte de substance endométriale » peut être complète en cas de synéchie corporeale, ou fractionnée sur toute la hauteur de la cavité en cas de synéchie partielle ou multiple.
- L'hystérosonographie permet une cartographie des lésions et l'établissement d'un diagnostic précis, en visualisant le trajet de l'eau dans la cavité et sa progression possible ou impossible vers le fond utérin, ce qui permet d'identifier les ponts fibreux.

Polypes

C'est une formation échogène arrondie ou ovalaire, presque toujours à contours réguliers.

Il est homogène ou hétérogène, avec la présence de petites images kystiques.

Il peut refouler l'écho médian hyperéchogène, l'interrompre sur une plus ou moins grande longueur, voire être responsable de sa disparition dans les formes volumineuses.

En Doppler couleur ou énergie, on constate la présence d'un pédicule vasculaire dans 75 % des polypes supérieurs à 1 cm.

La recherche du polype est plus facile en début de cycle et dans la moitié du cycle.

En deuxième partie de cycle, l'échogénicité du polype est la même que le reste de l'endomètre. Le diagnostic est donc plus difficile. Il s'établit à partir de la rupture de l'écho médian, associée ou non à la visualisation d'un pédicule vasculaire.

En milieu de cycle, le polype hyperéchogène se détache particulièrement bien de la muqueuse hypoéchogène.

En cas de doute, on a recours à l'hystérosonographie. Le diagnostic est exact dans 96 % des cas. Le polype, dont les contours sont silhouettés par le sérum physiologique, apparaît comme une masse localisée, s'implantant sur une des faces de l'utérus.

L'hystérosonographie permet de différencier le polype d'un caillot, d'une rétention trophoblastique ou placentaire, d'une hypertrophie diffuse ou d'un myome sous-muqueux pédiculé.

Pathologies du myomètre

Les deux principales pathologies du myomètre contribuant à l'infertilité sont les fibromes et l'adénomyose.

Fibromes

Un fibrome est une tumeur bénigne constituée de cellules musculaires lisses, associée à une composante variable de tissus conjonctifs. C'est la tumeur bénigne la plus fréquente chez les femmes en âge de procréer (10 à 40 % après 30 ans). C'est la première indication d'hystérectomie après 40 ans.

En dehors des fibromes symptomatiques, le traitement médical n'existe pas. Le traitement est chirurgical.

• L'échographie par voie transabdominale offre un large angle de vue et des plans de coupes variés. Ses basses fréquences permettent une pénétration plus importante, mais une résolution plus faible que par voie transvaginale, dont les fréquences plus élevées entraînent à l'inverse une meilleure résolution mais une pénétration plus faible. La voie transvaginale permet une meilleure description de l'architecture tissulaire et l'apport d'information est supérieur.

Dans l'ensemble des séries, 5 à 10 % des examens restent plus contributifs par voie transabdominale, notamment pour l'examen des myomes volumineux, la localisation des myomes multiples et les explorations des annexes en cas d'utérus polymyomateux.

La supériorité de la voie transvaginale s'observe pour le diagnostic des lésions endométriales associées et l'examen des rapports avec l'endomètre.

Pour établir un diagnostic complet, l'échographie des fibromes symptomatiques doit donc se faire à la fois par voie transabdominale et par voie vaginale.

Échostructure des fibromes

Les fibromes sont des nodules arrondis ou ovalaires bien limités. Ils entraînent une augmentation de volume de l'utérus ainsi que des déformations des contours habituels de l'utérus, ou de la cavité.

Échogénicité des fibromes

Leur échogénicité est fonction des contingents tissulaires et des remaniements dans le temps. Elle est donc variable :

- le plus souvent, les fibromes sont hypoéchogènes, homogènes et facilement délimités du myomètre adjacent ;
- ils peuvent parfois être hétérogènes, associant des plages hyperéchogènes, qui ont une composante léiomyomateuse, et des plages hypoéchogènes, qui ont une composante fibreuse ;
- ils peuvent être hyperéchogènes, et homogènes, sous traitement par agonistes de la LH-RH ou en périménopause ;
- ils peuvent être isoéchogènes, visibles par le refoulement de la ligne muqueuse ou séreuse ;
- ils peuvent présenter des calcifications périphériques, « en coquilles » ou centrales, en « amas » ;
- ils peuvent être totalement anéchogènes, dans le cas des nécrobioses.

Vélocimétrie. Doppler des fibromes

La vascularisation des fibromes est périphérique, avec un aspect d'« encorbellement », de « couronne vasculaire » relativement spécifique. On peut parfois visualiser un pédicule vasculaire dans les formes pédiculées, associé à des flux à destinée

centrale. La vascularisation est d'intensité variable, sans corrélation à un potentiel de croissance. Le diagnostic différentiel avec une zone focale d'adénomyose est parfois intéressant : sa vascularisation présente un caractère anarchique, non encorbellant, ne modifiant pas le trajet des vaisseaux radiés du myomètre.

Topographie des fibromes

- *Fibromes sous-séreux* : ils entraînent des déformations des contours, avec image d'addition. En cas de fibromes pédiculés, ils peuvent poser un problème diagnostique. Il convient alors de rechercher le pédicule vasculaire en Doppler couleur.

- *Myomes interstitiels* : il est important de préciser l'existence d'une composante sous-muqueuse. Il existe en effet un risque d'ouverture préopératoire de la cavité utérine en cas de myomectomie.

La décision du chirurgien dépend directement des informations de l'échographie (laparotomie, cœlioscopie, hystérocopie, embolisation ?).

Myomes sous-muqueux : le traitement efficace des myomes sous-muqueux est la résection transcervicale par hystérocopie, qui donne 90 % de résultats satisfaisants à 3 ans, et 70 à 80 % de résultats satisfaisants à 5 ans.

La cartographie des myomes sous-muqueux est importante pour la voie d'abord chirurgicale.

Les informations apportées par l'échographe sont capitales pour le chirurgien. En effet, il existe des risques opératoires non négligeables : risques de perforation, risques de troubles métaboliques ou de résection incomplète. Ces risques sont liés à différents facteurs :

- la taille du fibrome : le risque augmente si elle est supérieure à 50 mm ;
- sa composante intracavitaire : le risque augmente si elle est inférieure à 50 % ;
- la distance myome-séreuse : « mur postérieur de sécurité ».

Retenir l'essentiel

Pour le chirurgien, le compte rendu échographique doit indiquer : le nombre, la taille, l'importance de la composante interstitielle et la localisation.

En effet, les indications de la myomectomie par cœlioscopie comportent deux conditions :

- un maximum de deux fibromes ;
- des fibromes de tailles inférieures à 9 cm.

Les difficultés opératoires sont augmentées en cas de la présence d'une forte composante intramyéométriale et de localisation antérieure.

Pour l'embolisateur, le compte rendu échographique doit indiquer le fibrome sous-séreux pédiculé qui augmente le risque de nécrobiose septique et représente une contre indication à l'embolisation.

Étude topographique des fibromes sous-muqueux en échographie

Le diagnostic par hystérocopie permet de visualiser uniquement la composante intracavitaire. L'échographie 2D-3D associée à la sonographie

permet un diagnostic précis de la localisation cavitaire et myométriale des fibromes.

• Myomes type 0 : myome sous-muqueux intracavitaire ; parfois pédiculé, avec pédicule visible en Doppler couleur. Il ne présente pas de difficulté opératoire.

• Myomes type 1 : la composante intracavitaire est majoritaire, supérieure à 50 %. Il présente peu de difficultés opératoires.

• Myomes type 2 : la composante interstitielle est majoritaire. La composante intracavitaire est inférieure à 50 %. Il présente des risques de perforation et des risques de traitement incomplet augmentés. La mesure échographique préopératoire entre la distance entre la séreuse utérine et le bord externe du fibrome, ou « mur postérieur de sécurité », doit être réalisée. Cette épaisseur doit être de 5 mm pour éviter les risques de perforation utérine.

L'importance de la composante intracavitaire n'est pas toujours appréciable en échographie, même vaginale. L'hystérosographie et l'hystérocopie diagnostiques sont alors indispensables. L'hystérocopie diagnostique permet en effet la visualisation de la composante intracavitaire ; l'hystérosographie permet la visualisation de la composante interstitielle.

Pour les myomes de type I et les myomes de type II, la description du ou des fibromes doit aussi comporter la localisation antérieure, postérieure, gauche et droite, mais surtout décrire avec précision (en cas de localisation fundique) la distance des ostia et un éventuel effet de masse sur les cornes utérines.

Retenir l'essentiel

La topographie échographique exacte des fibromes doit préciser :

- Le nombre et la taille
- La localisation exacte des fibromes :
 - type 0 intracavitaire strict ;
 - type 1 : < 50 % myométrial ;
 - type 2 : > 50 % myométrial.
- Le mur postérieur de sécurité : en effet, la résection par hystérocopie chirurgicale est possible si le mur myométrial est > à 5 mm.

Bien le rechercher dans les trois plans.

Adénomyose

L'adénomyose est une pathologie fréquente des femmes de 35 ans, souvent sans signe clinique. Sa prévalence est de 25 à 70 % chez les femmes hystérectomisées et 65 % sont symptomatiques avec des hémorragies. Son dépistage est important chez les patientes en PMA.

Il s'agit de la migration de glandes endométriales et de stroma dans le myomètre, accompagnée d'une hypertrophie fréquente du myomètre périphérique. Dépendante des critères histologiques retenus pour effectuer le diagnostic, la prévalence du myomètre est extrêmement difficile à préciser. Les critères diagnostiques retenus en échographie 2D sont donnés dans le tableau VI.

Tableau VI – Critères échographiques d'adénomyose en deux dimensions.

2 critères majeurs :	– le plus spécifique : une ou des image(s) arrondie(s) kystique(s) de 1 à 2 mm. Leur présence est directement corrélée au critère principal histologique (37) – aspect hétérogène, strié du myomètre en « rayon de miel ». Ce critère est utilisé par la plupart des auteurs comme meilleur critère diagnostique (38, 39)
5 critères mineurs :	– une échostructure hétérogène, des plages sans délimitation nette au sein du myomètre – un utérus augmenté de volume et antéropostérieur, « globuleux » – une asymétrie de l'épaisseur des faces utérines – une mauvaise visibilité de la zone de jonction – une absence de modification de la vascularisation myométriale

Retenir l'essentiel

Importance de la coupe coronale 3D dans le diagnostic de l'adénomyose.

3 critères majeurs :

- disparition du triangle cavitaire, de la régularité de l'interface endomètre-myomètre, avec aspect de striations plus ou moins diffus, plus ou moins profond, en rayons, souvent confondu avec un myome interstitiel ;
- aspect irrégulier des bords de la cavité, bien mis en évidence par la coupe coronale, avec parfois effet de masse sur la cavité, responsable de son rétrécissement latéral, mais aussi fundique ;
- aspect de flocons myométriaux dont l'échogénicité est voisine de celle de l'endomètre et qui traduisent la présence de foyers hétérogènes hétérotopiques d'endomètre.

Diagnostic différentiel

- Les myomes : diagnostic différentiel aisé, en effet ils sont bien circonscrits.
- Les contractions utérines : elles donnent un aspect hétérogène, avec effet de masse sur la cavité, mais il s'agit d'une image inconstante.
- Les cancers de l'endomètre : la zone de jonction n'est pas toujours nette : à la moindre hésitation diagnostique, la sonographie permettra de bien dégager les bords de la cavité utérine.

Adénomyome

C'est une forme d'adénomyose focale, qui se situe souvent au niveau de la corne utérine.

Il présente une formation arrondie à contour mal limité intramyométriale. Le contenu de la cavité centrale est hématique, finement échogène.

Le diagnostic différentiel avec un myome en dégénérescence est parfois difficile. Le diagnostic différentiel avec un myome à centre kystique est très difficile.

Ovaire pathologique**Ovaire dystrophique de type fonctionnel**

Le diagnostic différentiel entre ovaire dystrophique et ovaire en début de cycle porteur de follicules primordiaux (ou antraux) est parfois difficile à établir. Une classification schématique permet de distinguer les ovaires normaux des ovaires porteurs d'un trouble dysovulatoire.

• La pathologie microfolliculaire regroupe les ovaires polykystiques (OPK) et les ovaires multifolliculaires (OMF). Il peut s'agir de défaut de maturation folliculaire, d'anovulation, d'accumulation de follicules non matures en nombre excessif (supérieur à 10).

- L'ovaire polykystique a une grande taille. On retrouve des follicules périphériques d'un nombre supérieur à 12 par ovaire, et d'une taille inférieure ou égale à 5 mm. Le stroma est hypertrophique.

- L'ovaire multifolliculaire est de taille normale. On retrouve des follicules en nombre supérieur à 8 par ovaire, de taille normale allant de 4 à 10 mm, sans topographie périphérique.

• La pathologie macrofolliculaire regroupe les ovaires macropolykystiques et les kystes fonctionnels ovariens. Elle correspond à la croissance excessive d'un ou de plusieurs follicules, avec ou sans corps jaune, s'accompagnant de douleurs pelviennes et de dysovulation.

- L'ovaire macropolykystique comporte plusieurs macrofollicules d'une taille supérieure à 15 mm.

- Les kystes fonctionnels regroupent deux grandes catégories : les kystes folliculaires, les corps jaunes kystiques et les corps jaunes hémorragiques.

Pathologies kystiques les plus courantes en infertilité**Kystes fonctionnels**

• Les kystes folliculaires sont des follicules lutéaux, appelés kystes lorsqu'ils atteignent un diamètre de 30 mm.

Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- anéchogène ;
- paroi fine, régulière et concentrique ;
- développement kystique du cumulus ou des cli-vages de granulosa ;
- il n'y a en principe pas de cloison en Y ;
- on retrouve souvent un aspect vésiculaire interne ou des dédoublements pariétaux allant jusqu'au cloisonnement interne ;
- l'exploration de la paroi ne met en évidence aucune formation interne.

• Les corps jaunes kystiques présentent des aspects très variés :

- structure anéchogène interne ;
- paroi épaisse ;

- couronne vasculaire mise en évidence par le Doppler.
 - Les corps jaunes hémorragiques ont un aspect évolutif, en fonction de l'ancienneté du kyste.
- Ils présentent les caractéristiques suivantes :
- fine réticulation diffuse à l'ensemble du kyste, qui se désorganise avec le vieillissement du kyste ;
 - aspect de cloisonnement par un fin réseau hyperéchogène irrégulier avasculaire lié à l'organisation de la fibrine ;
 - apparition de plages hypoéchogènes amorphes avec le vieillissement du kyste ;
 - structure mixte du fait de la formation d'un caillot organisé ;
 - plages échogènes avasculaires de formes variées ;
 - zones liquidiennes anéchogènes.

Kystes organiques

• Kystes séreux

Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- structures anéchogènes parfois finement cloisonnées ;
- paroi plus épaisse que celle des kystes fonctionnels ;
- absence de vésicule intrakystique ;
- taille parfois d'emblée importante.

• Kystes mucoïdes

Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- structure interne finement échogène, aspect pointillé du contenu du kyste ;
- aspect finement granité, bien visible en mode « rendu ».

• Kystes endométriosiques : endométriomes.

La prévalence de l'endométriose est de l'ordre de 10 à 25 % chez les femmes âgées de 25 à 35 ans, et l'ovaire est atteint dans 80 % des cas.

- Ils présentent les caractéristiques suivantes :
- une structure à paroi nette, fine ou épaisse, à fin piqueté hyperéchogène, presque anéchogène lorsqu'il est actif, hypoéchogène et dense lorsqu'il est vieilli et non actif ;
- on note parfois un niveau de sédimentation.

• Kystes dermoïdes

Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- composé de sébum, hypoéchogène et homogène le plus souvent ;
- on retrouve un nodule de Rokitansky, arrondi, de contour régulier, hyperéchogène, excentré, au contact de la paroi.

Il est possible de rencontrer d'autres variantes de ce kyste. Un aspect de brouillage échogène est classique, simulant une interposition stercorale. Il peut alors échapper au diagnostic. Le kyste ne comporte pas de paroi individualisable et les échos diffusent sans rencontrer d'interface. Il est alors nécessaire de restituer le bord du kyste à l'aide de l'acquisition 3D et de la restitution du plan C.

Conclusion

L'échographie 2D-3D a une place prépondérante dans le bilan d'une femme infertile.

Son efficacité dépend de règles simples :

- une bonne connaissance anatomique ;
 - un examen effectué par rapport à un jour du cycle.
 - des points cardinaux sémiologiques dont l'impasse n'est plus possible : comme la régularité de l'écho médian, l'aspect triangulaire de la cavité en coupe coronale, l'établissement de la cartographie préopératoire des fibromes, l'étude minutieuse du tissu ovarien et des structures souvent associées aux follicules.
- Sa précision dépend des outils utilisés en 2D-3D :
- sonde vaginale haute fréquence ;
 - outils 3D ;
 - hystérosonographie associée.

Références

Livres

Levaillant JM, Benoit B, Bault JP (2009) Pratique de l'échographie volumique, Échographie gynécologique. Montpellier, Sauramps
 Levaillant JM, Benoit B (2008) Atlas échographique de la fertilité féminine. Rueil-Malmaison, Rand

Articles

1. Gougeon A (1998) Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 30: 137-42
2. Baker TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Ser B* 158: 417-33
3. Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17: 121-55
4. Oktay K, Briggs D, Gosden RG (1997) Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3748-51
5. Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P (1993) The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157: 100-9
6. Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184: 122-37
7. Fernandez SM, Keating AF, Christian PJ *et al.* (2008) Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biol Reprod* 79: 318-27
8. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB, Schoemaker J (2004) Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 19: 590-5
9. Broekmans FJ, Kwee J, Hendricks DJ, Mol BW, Lambalk CB (2006) A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human Reprod Update* 12: 685-718
10. Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER (2003) Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and fail-

- ure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 79: 1091-100
11. Wunsch A, Sonntag B, Simoni M (2007) Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. *Ann Endocrinol (Paris)* 68: 160-6
 12. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J (2002) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene : implication for human reproduction. *Hum Reprod Update* 8: 413-21
 13. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N *et al.* (2007) Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1796-802
 14. Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER (2004) Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 81: 35-41
 15. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH (1998) Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 69: 505-10
 16. Frattarelli JL, Lauria-Costab DE, Miller BT, Bergh PA, Scott RT (2000) Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 74: 512-7
 17. Ng EH, Tang OS, Ho PC (2000) The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. *Hum Reprod* 15: 1937-42
 18. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER (1999) Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 72: 845-51
 19. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ (2005) Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 83: 291-301
 20. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ (2007) Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 87: 764-75
 21. Hsieh YY, Chang CC, Tsai HD (2001) Antral follicle counting in predicting the retrieved oocyte number after ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 18: 320-4
 22. Frattarelli JL, Lauria-Costab DE, Miller BT, Bergh PA, Scott RT (2000) Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 74: 512-7
 23. Nahum R, Shifren JL, Chang Y, Leykin L, Isaacson K, Toth TL (2001) Antral follicle assessment as a tool for predicting outcome in IVF--is it a better predictor than age and FSH? *J Assist Reprod Genet* 18: 151-5
 24. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER (2002) Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 77: 328-36
 25. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH (2003) A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 80: 350-5
 26. Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA (2003) Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 18: 35-44
 27. McIlveen M, Skull JD, Ledger WL (2007) Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 22: 778-85
 28. Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR *et al.* (2007) Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Hum Reprod* 22: 1932-41
 29. Jayaprakasan K, Campbell BK, Clewes JS, Johnson IR, Raine-Fenning NJ (2008) Three-dimensional ultrasound improves the interobserver reliability of antral follicle counts and facilitates increased clinical work flow. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 439-44
 30. de Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CW, Klip H, van Leeuwen FE; OMEGA-project group (2002) A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil Steril* 77: 978-85
 31. Mercé LT, Gómez B, Engels V, Bau S, Bajo JM (2005) Intraobserver and interobserver reproducibility of ovarian volume, antral follicle count, and vascularity indices obtained with transvaginal 3-dimensional ultrasonography, power Doppler angiography, and the virtual organ computer-aided analysis imaging program. *J Ultrasound Med* 24: 1279-87
 32. Zaidi J, Barber J, Kyei-Mensah A, Bekir J, Campbell S, Tan SL (1996) Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in vitro fertilization program. *Obstet Gynecol* 88: 779-84
 33. Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, Campbell S, Tan SL (1999) Value of ovarian stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 71: 22-9
 34. Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir J, Campbell S, Tan SL (1999) The pattern of changes in ovarian stromal and uterine artery blood flow velocities during in vitro fertilization treatment and its relationship with outcome of the cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol* 13: 26-33
 35. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S (2003) Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 79: 190-7
 36. Ng EH, Tang OS, Chan CC, Ho PC (2006) Ovarian stromal vascularity is not predictive of ovarian response and pregnancy. *Reprod Biomed Online* 12: 43-9
 37. Fedele L, Bianchi S, Dorta M, Arcaini L, Zanotti F, Carinelli S (1992) Transvaginal ultrasonography in the diagnosis of diffuse adenomyosis. *Fertil Steril* 58: 94-7
 38. Bazot M, Cortez A, Darai E *et al.* (2001) Ultrasonography compared with magnetic resonance imaging for the diagnosis of adenomyosis: correlation with histopathology. *Hum Reprod* 16: 2427-33
 39. Brosens JJ, de Souza NM, Barker FG, Paraschos T, Winston RM (1995) Endovaginal ultrasonography in the diagnosis of adenomyosis uteri: identifying the predictive characteristics. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 471-4.

Annexe I – L'hystérosonographie

Technique

Cette technique permet d'améliorer l'exploration de la cavité utérine. En résumé, la procédure est la suivante : les patientes sont installées en décubitus dorsal ou en position gynécologique. Le col est exposé avec un spéculum (Colin). De l'eau stérile ou du sérum physiologique est aspiré dans une seringue de 20 cc solidarisée à un cathéter généralement sans ballonnet (cathéter de Rudigoz CCD ou simplement sonde urinaire pédiatrique), le cathéter à ballonnet (type Ackrad 5F) étant réservé aux utérus fibromateux difficiles à dilater.

Après avoir purgé l'air, exposé et désinfecté le col, le cathéter est introduit dans le canal cervical sur 1 à 2 cm, sans dilatation et le plus souvent sans utilisation d'une pince tire-col. Une fois le cathéter en place, on injecte lentement 2 à 4 mL de liquide. Les rares incidents consistent en de petites effractions myométriales ou en l'impossibilité de franchir un col sténosé ou porteur d'une synéchie de l'orifice interne.

Le spéculum étant retiré, on introduit la sonde d'échographie vaginale 2D. Les images sont acquises en rafale dès l'injection du liquide et l'expansion de la cavité.

En échographie 3D, la prise d'un volume est effectuée également juste après l'instillation du liquide ; le cathéter peut être enfoncé presque jusqu'au fond utérin pour un premier volume 3D afin de bien décoller le fond de la cavité, puis retiré jusqu'à l'endocol pour une deuxième acquisition volumique.

L'examen est pratiqué de préférence durant les 10 premiers jours du cycle chez les patientes encore

en activité génitale. La procédure est quasi indolore, mais l'usage d'un antispasmodique est recommandé. Une antibiothérapie n'est pas nécessaire.

Faisabilité

Cette technique requiert un temps inférieur à 10 minutes.

Le taux d'échecs, variable en fonction de la population étudiée, est inférieur à 3 %. Les risques sont :

- une sténose de l'orifice externe du col ;
- une sténose de l'orifice interne du col ;
- des douleurs ;
- l'impossibilité de distendre la cavité (gros utérus polyfibromateux) ;
- l'utérus est en position indifférente dans l'axe de la sonde, avec des difficultés de bien visualiser l'intégrité de la cavité.

Avantages

L'hystérosonographie est une technique à laquelle l'imageur peut se former rapidement. En outre, elle présente de nombreux avantages. Elle se pratique sans anesthésie et en l'absence de produit de contraste. Elle permet une excellente faisabilité en cabinet privé et facilite une prise en charge hospitalière sous anesthésie générale en cas de pathologie. Dans l'étude des myomes, la sonographie permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic différentiel avec le polype et pour la participation sous-muqueuse.

Atlas d'échographie en infertilité : les images indispensables

J.-M. Levailant, B. Benoit, E. Faivre et F. Lamazou

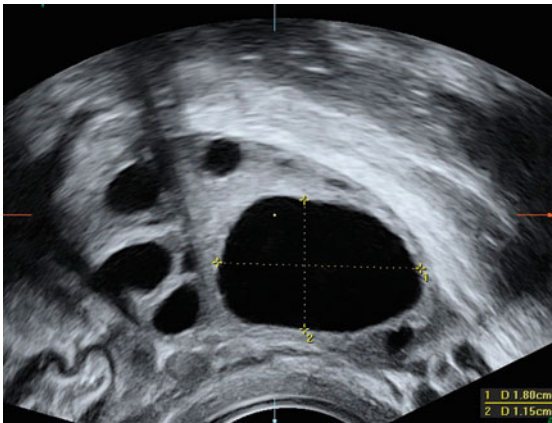


Fig. 1 – Compte des follicules antraux, j3 à j5, technique 2D manuelle : moyenne des deux diamètres de chaque follicule, ici, aspect dystrophique de la cohorte.

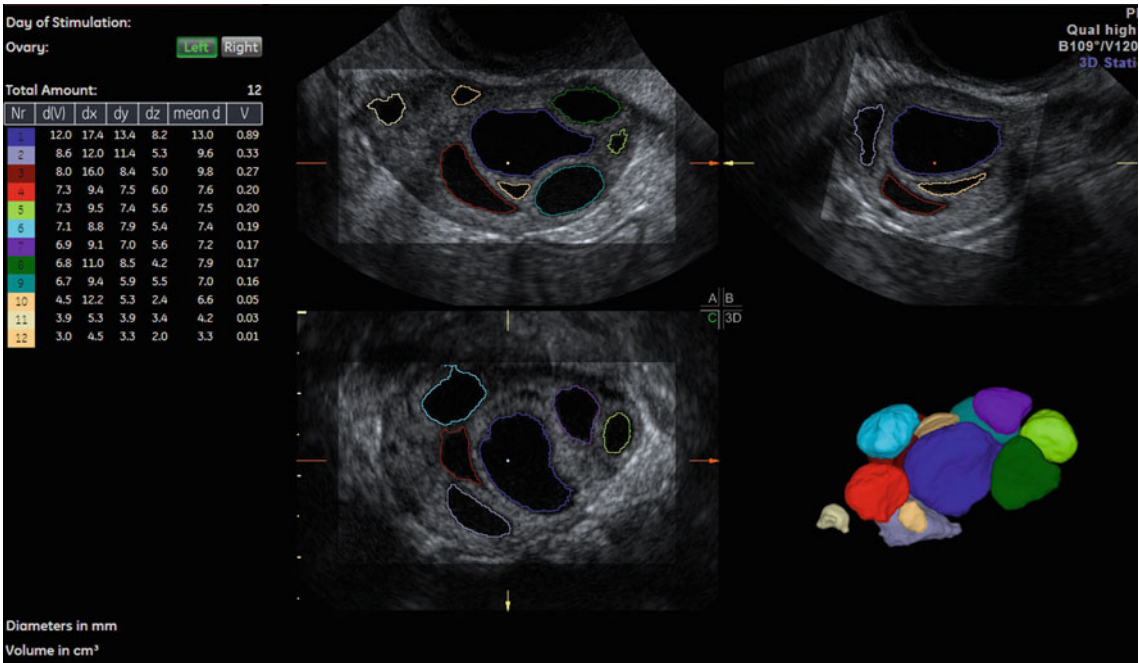


Fig. 2 – Compte des follicules antraux, j3 à j5, technique 3D automatique : calcul des trois diamètres, du diamètre moyen, du volume de chaque follicule par analyse automatique dans le volume d'acquisition 3D.

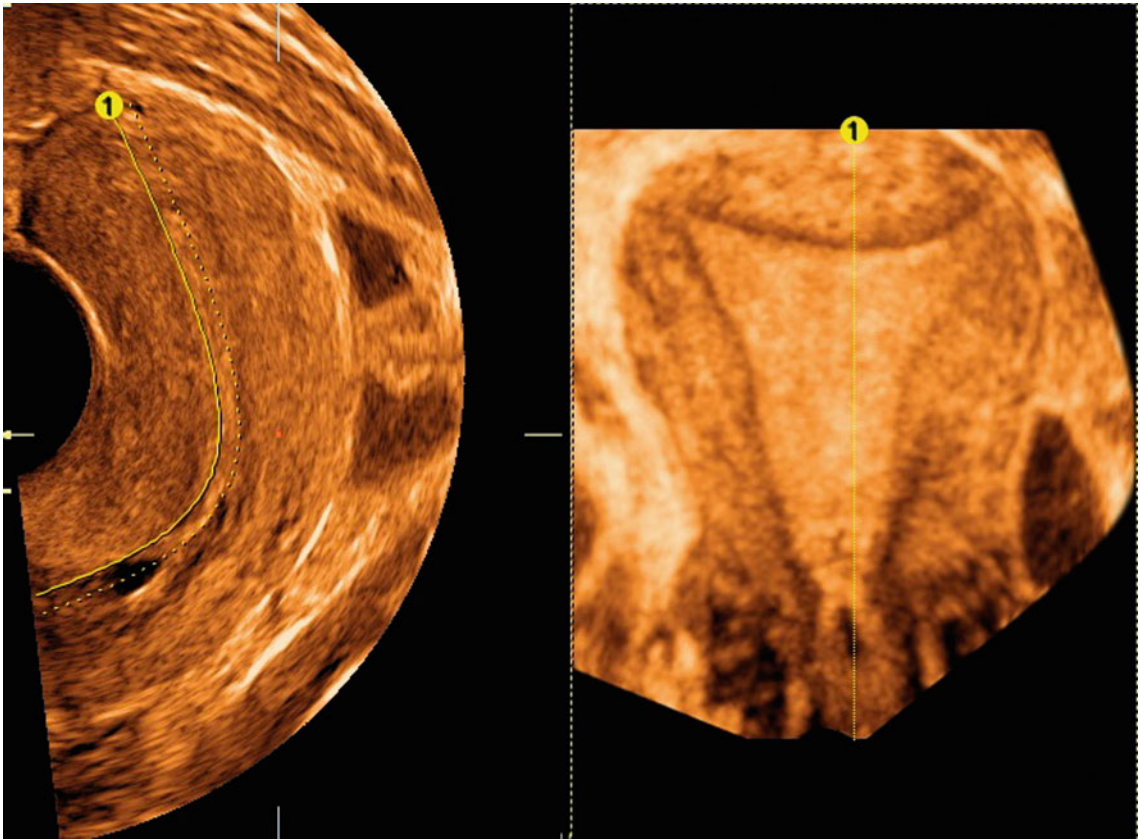


Fig. 3 – Utérus : à gauche, coupe sagittale et, à droite, coupe coronale d'un utérus normal, la ligne jaune n° 1 détermine le niveau de coupe dans le volume 3D.

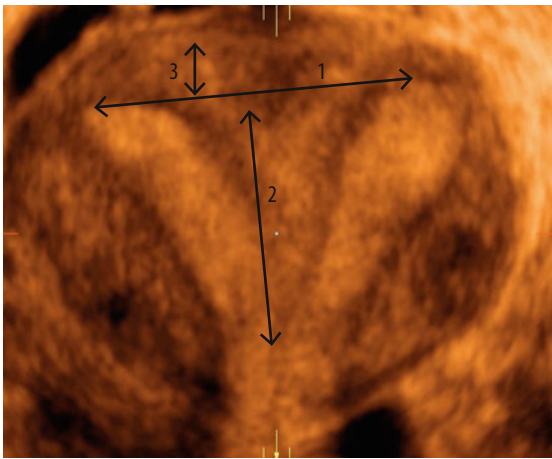


Fig. 4 – Coupe coronale d'un utérus cloisonné corporel : sur cette coupe, plusieurs mesures préopératoires peuvent être effectuées :
1 – la largeur ostiale, correspondant à la largeur à retrouver après résection de l'éperon
2 – la longueur de l'éperon
3 – le mur postérieur de sécurité.

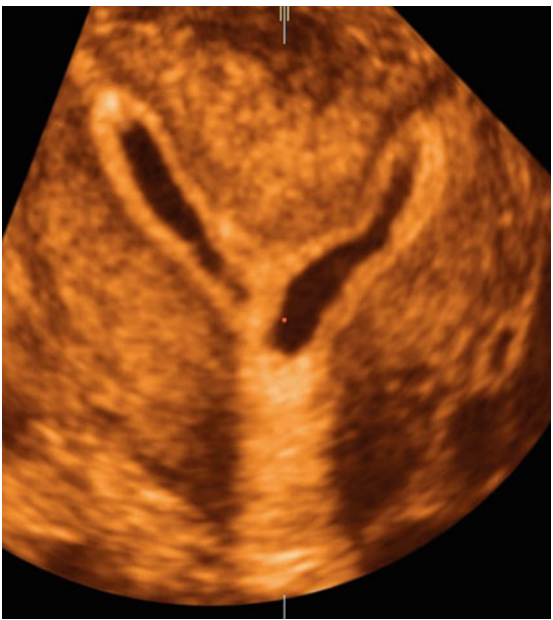


Fig. 5 – Coupe coronale en hystérosonographie d'un utérus cloisonné corporel subtotal : l'injection de liquide permet de bien dégager les deux pseudo-cavités et l'extrémité inférieure de l'éperon.

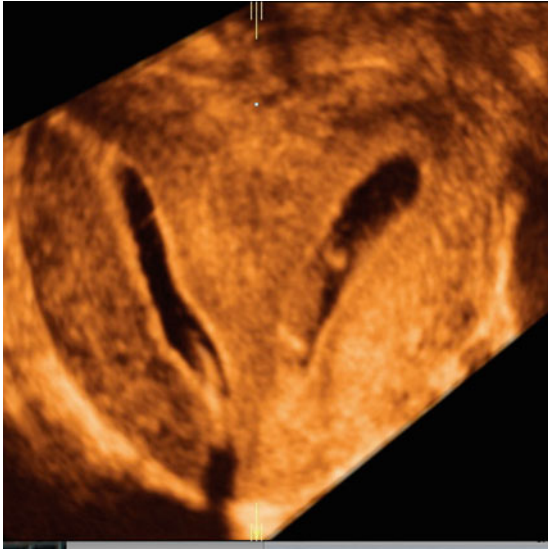
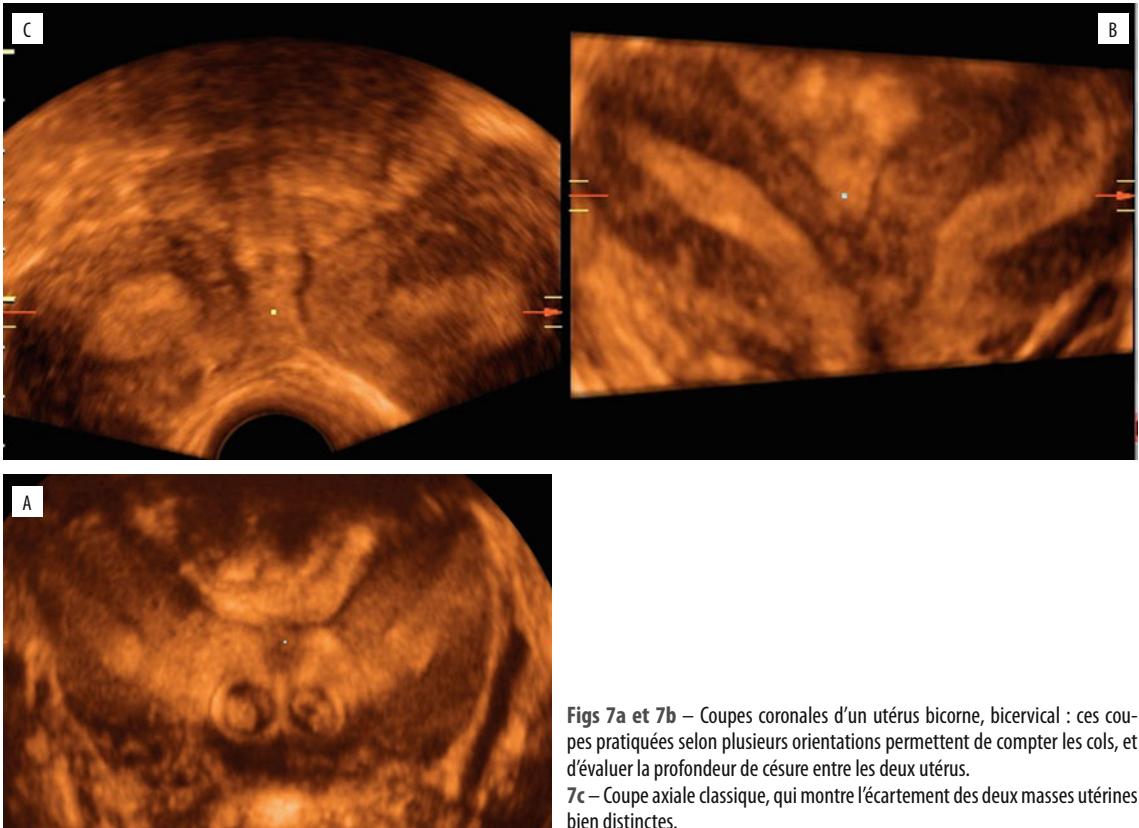


Fig. 6 – Même technique sur un utérus cloisonné corporel subtotal avec très gros éperon dont l'extrémité inférieure épaisse butte sur l'isthme.



Figs 7a et 7b – Coupes coronales d'un utérus bicorne, bicervical : ces coupes pratiquées selon plusieurs orientations permettent de compter les cols, et d'évaluer la profondeur de césure entre les deux utérus.
7c – Coupe axiale classique, qui montre l'écartement des deux masses utérines bien distinctes.

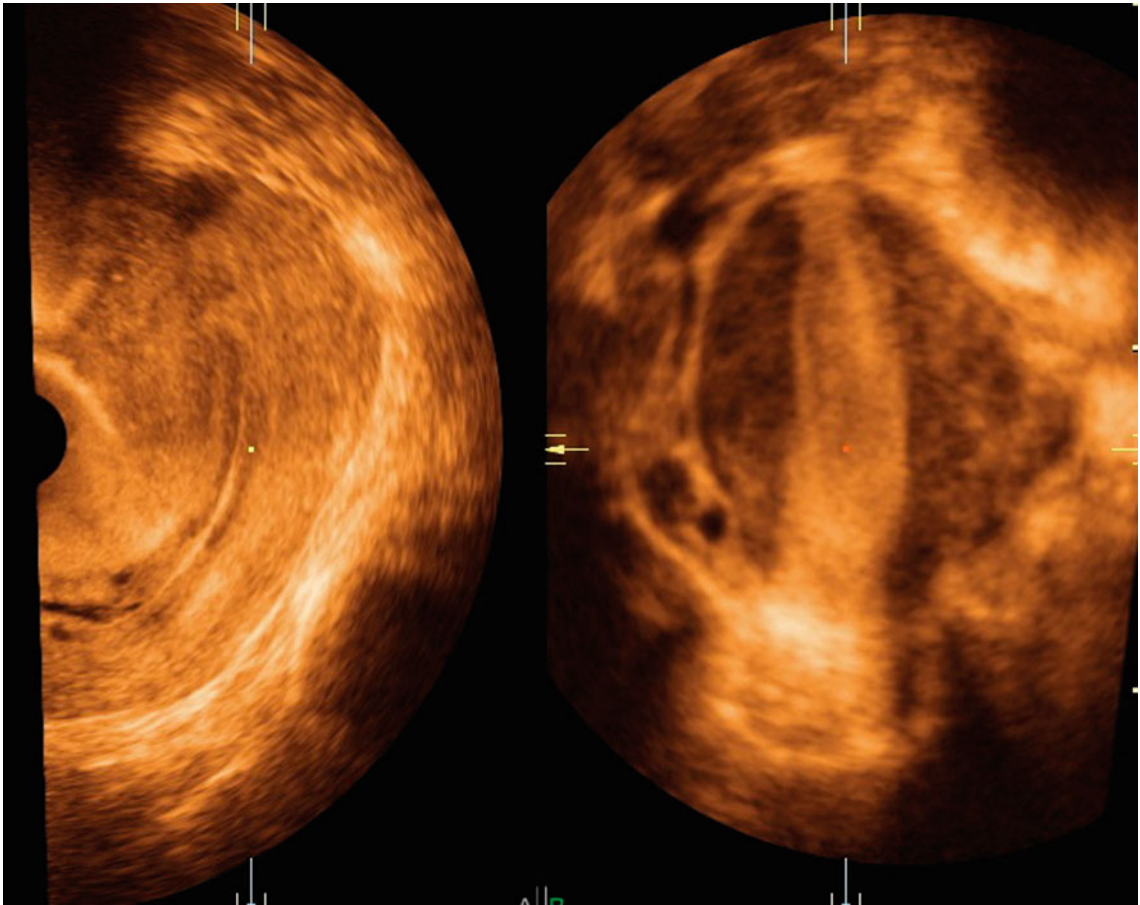


Fig. 8 – Coupe sagittale couplée à une coupe coronale d'un utérus unicorne : l'aspect en flammèche caractéristique est affirmé sur la coupe coronale du volume 3D.

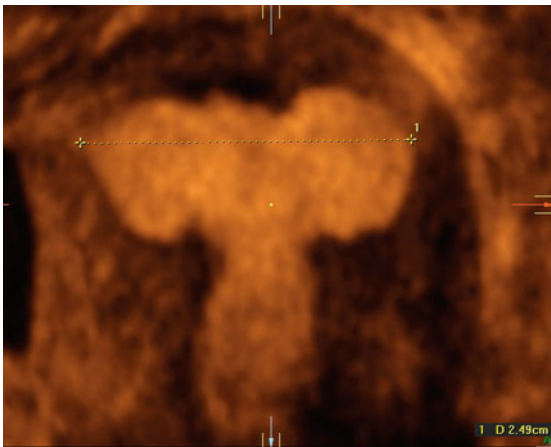


Fig. 9 – Coupe coronale d'un utérus Dystilbène® en phase lutéale : la forme en T est mise en évidence par l'épaisseur de l'endomètre.

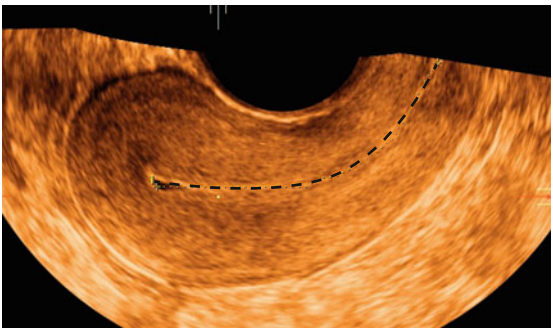


Fig. 10 – Coupe sagittale d'un endomètre atrophique à j3 : la ligne cavitaire normale apparaît hyperéchogène, curviligne, sans déformation : l'hystérométrie échographique est réalisée en trace courbe jusqu'au fond cavitaire.

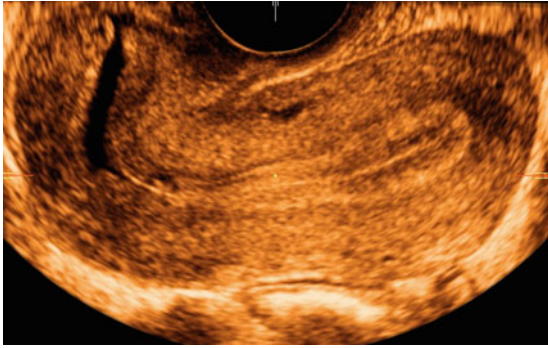


Fig. 11 – Endomètre à j12 : l'écho median hyperéchogène de j3 est entouré des deux feuillets d'un endomètre en double bande.

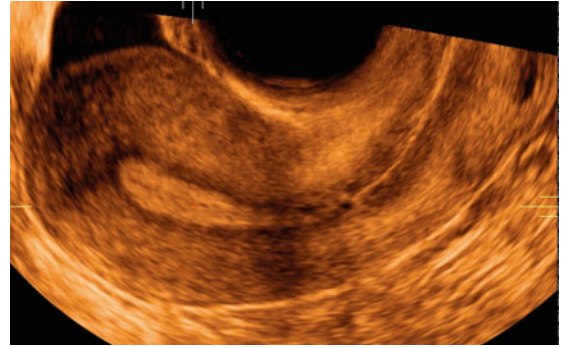


Fig. 12 – Endomètre à j21 : l'écho médian hyperéchogène est entouré des deux feuillets endométriaux homogènes, lisses.

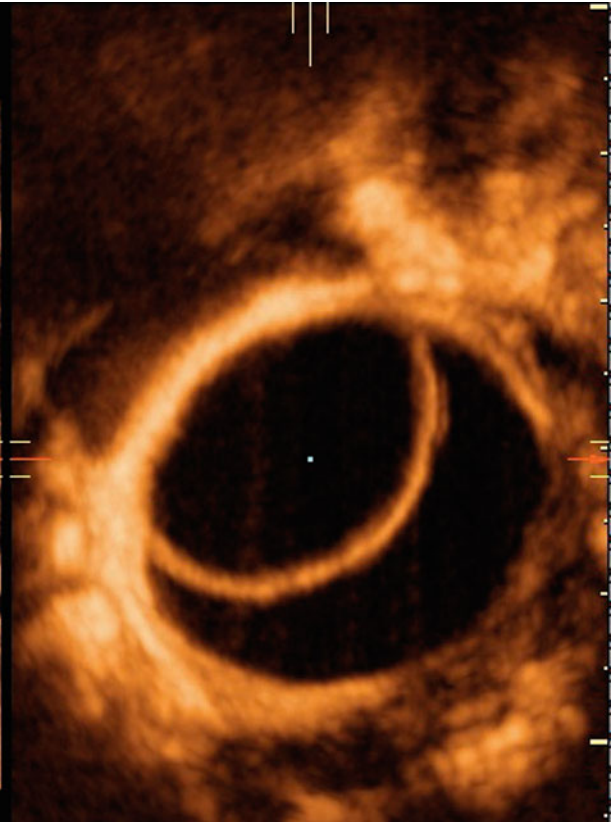
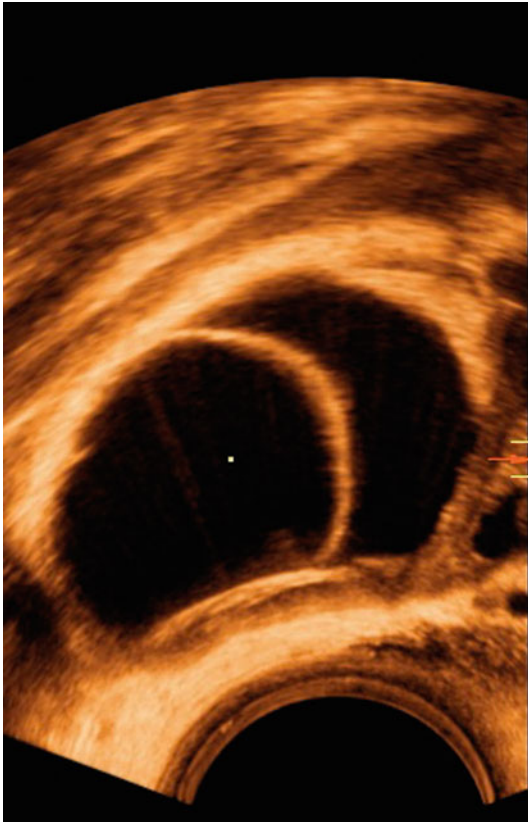


Fig. 13 – Ovaire à j3 : en dehors du CFA déjà décrit, le parenchyme ovarien est examiné à la recherche de petits kystes-endométriose ou dermoïde mais aussi le plus souvent de kystes d'allure liquidienne comme ici.

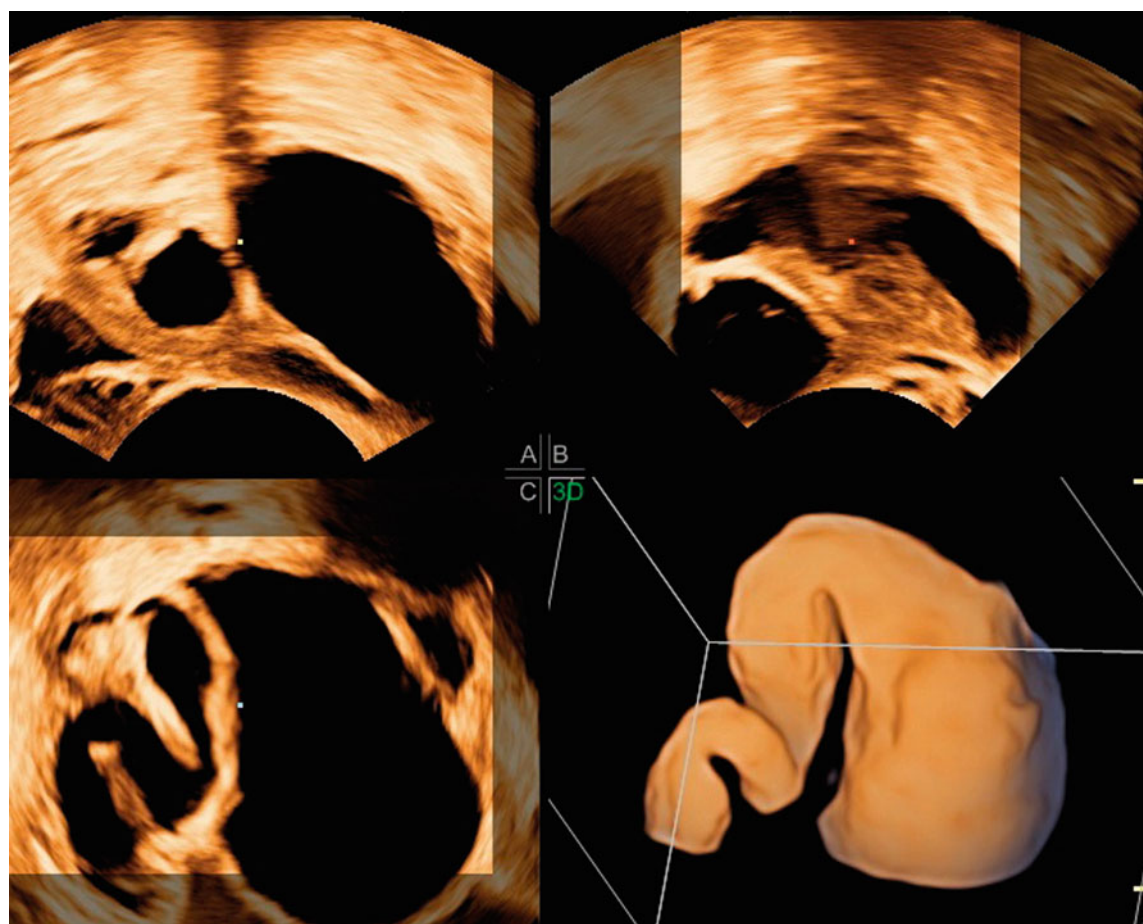


Fig. 14 – Hydrosalpinx en coupe triplan : la reconstruction volumique en surfaçage permet d'affirmer le diagnostic et d'infirmer un éventuel ovaire multifolliculaire ou kystique.

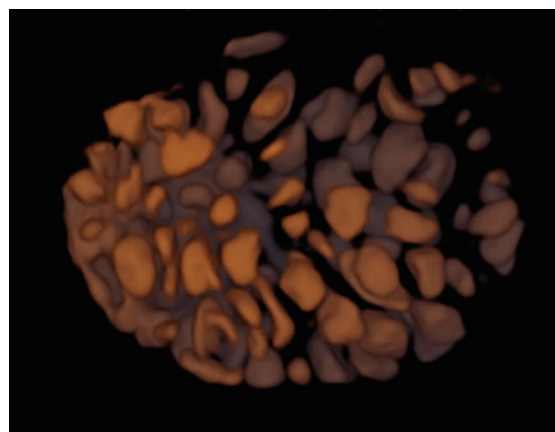


Fig. 15 – Ovaire polykystique en mode inversion : le comptage des follicules est plus rapide et plus juste qu'en méthode 2D.

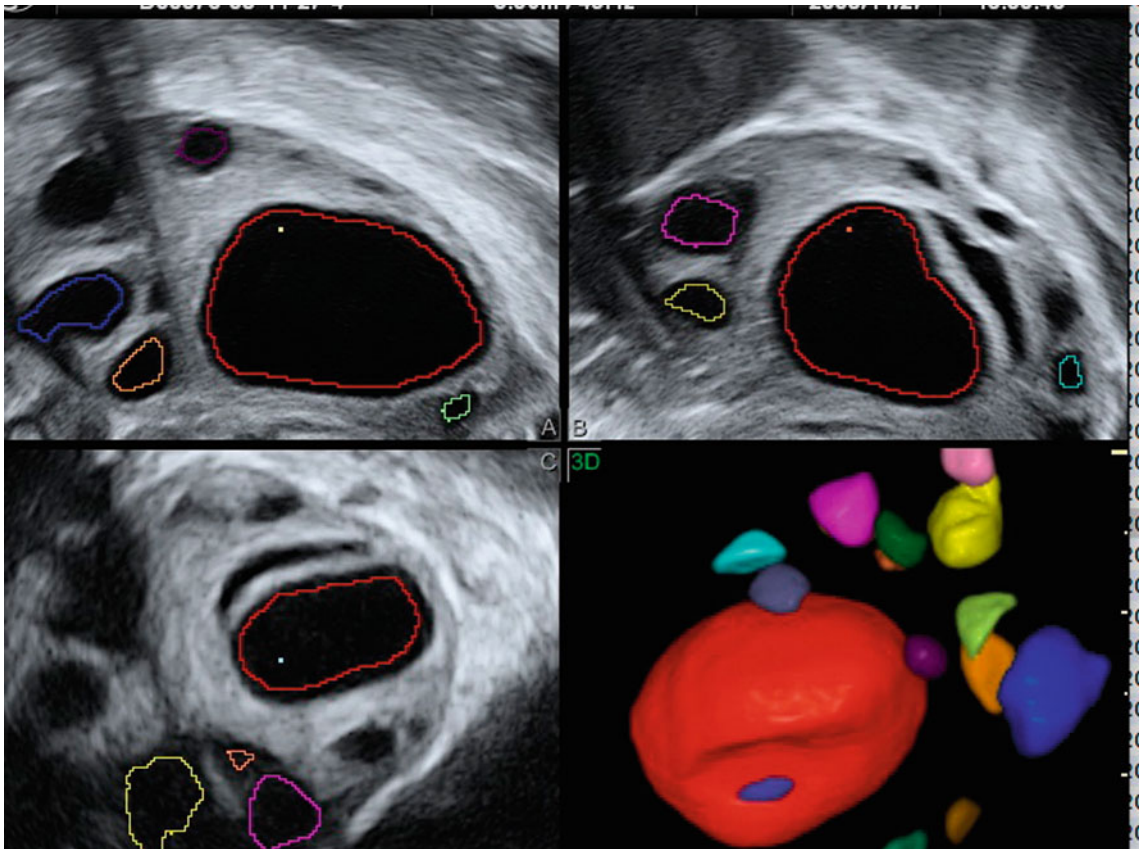


Fig. 16 – Ovaire à j12 : l'ensemble des follicules, dont le follicule dominant, est mesuré en mode automatique.

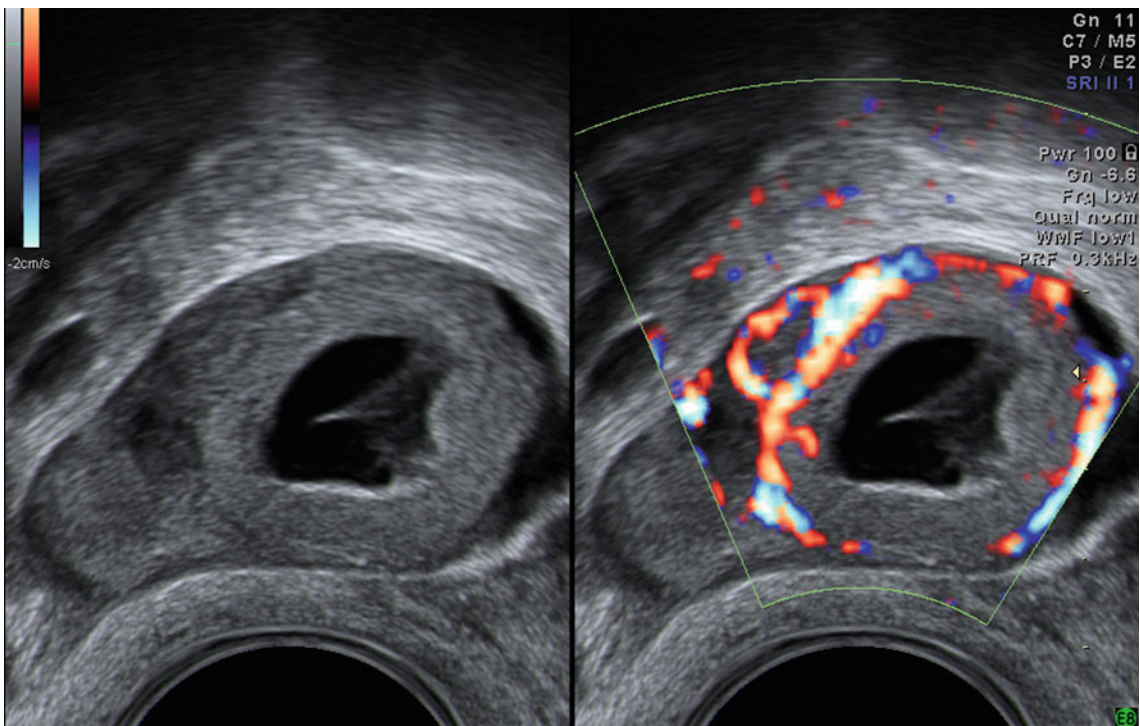


Fig. 17 – Ovaire à j21 : le corps jaune est visible, aspect caractéristique de contours irréguliers (thèque épaisse), la vascularisation est aussi caractéristique, entourant sans la pénétrer la surface du corps jaune.

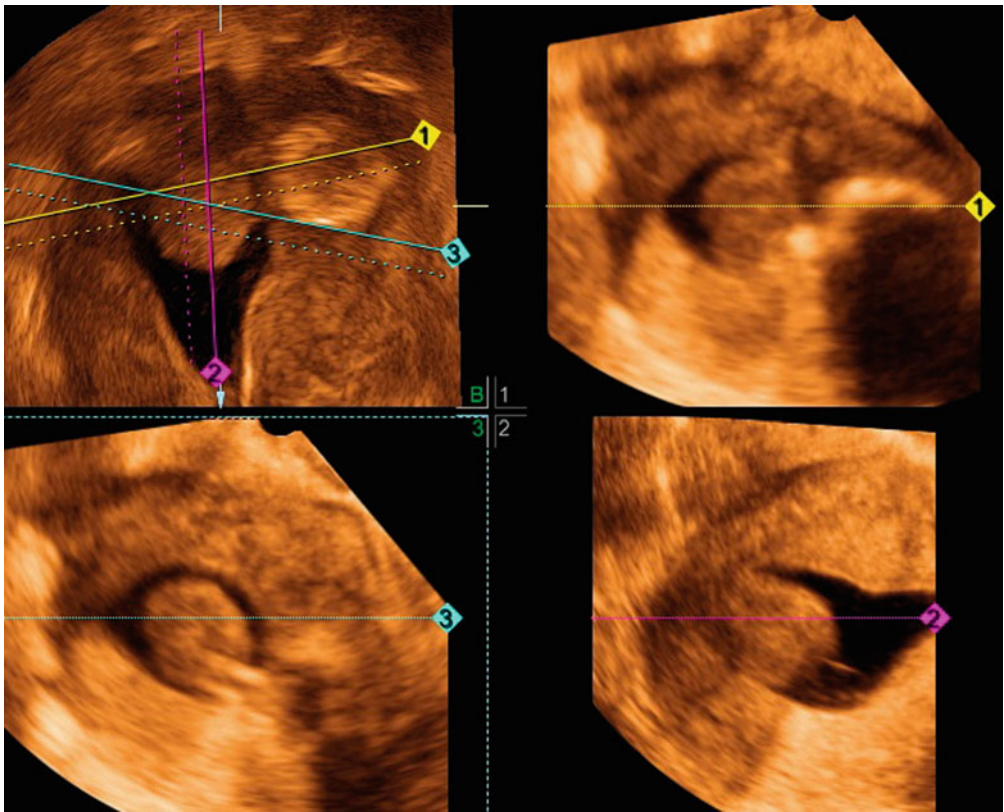


Fig.18 – Myome de type 0 : cartographie échographique des fibromes : chaque fibrome est évalué au niveau de sa biométrie, de sa localisation par rapport à la cavité utérine et à la séreuse, sous sonographie 3D.

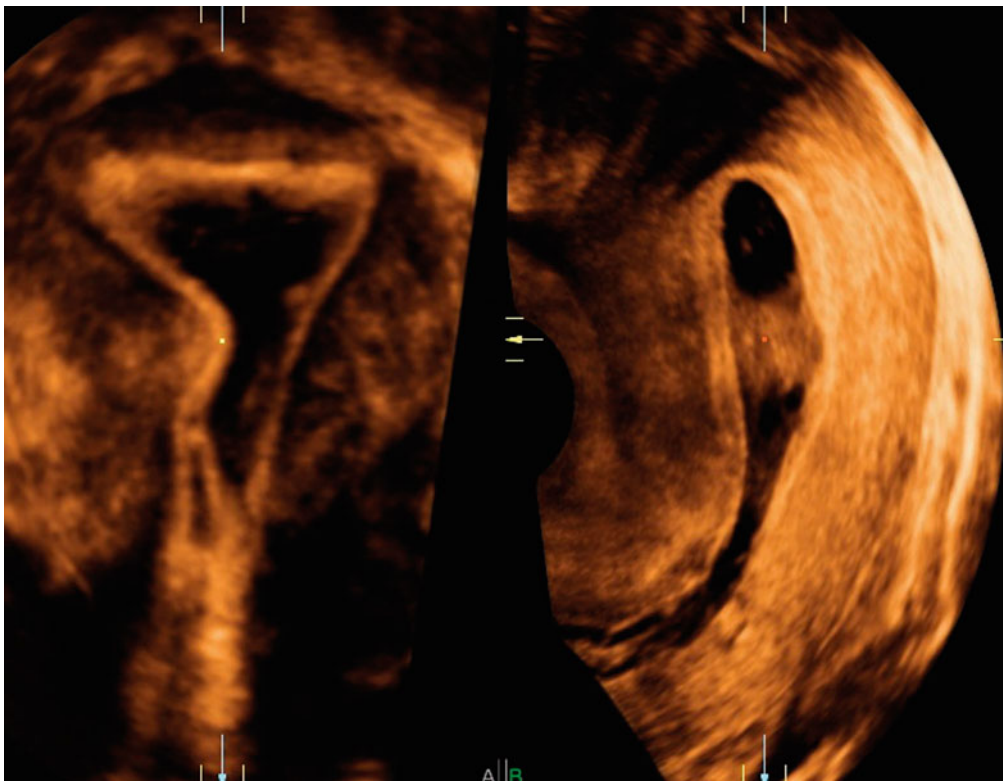


Fig. 19 – Myome de type 1 ; à gauche, coupe coronale ; à droite, coupe sagittale.

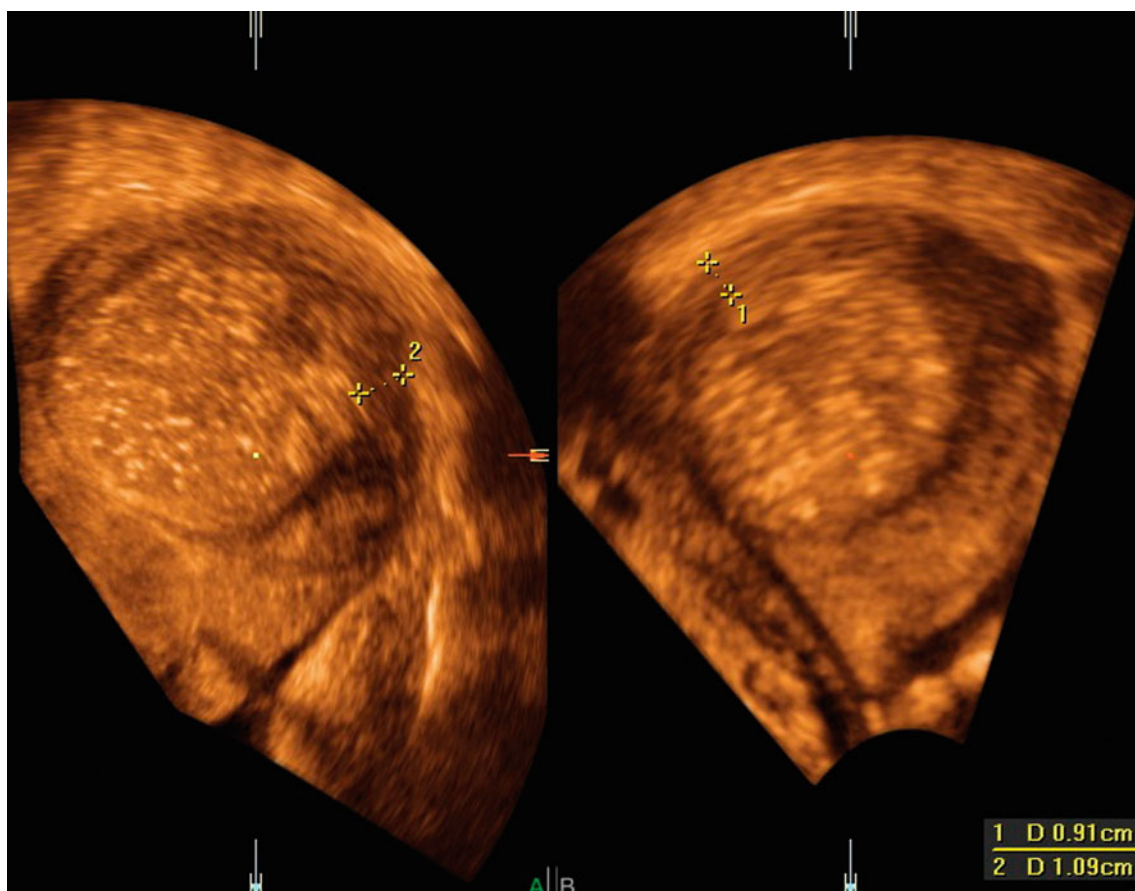


Fig. 20 – Myome de type 2. La mesure importante est celle du mur postérieur de sécurité.

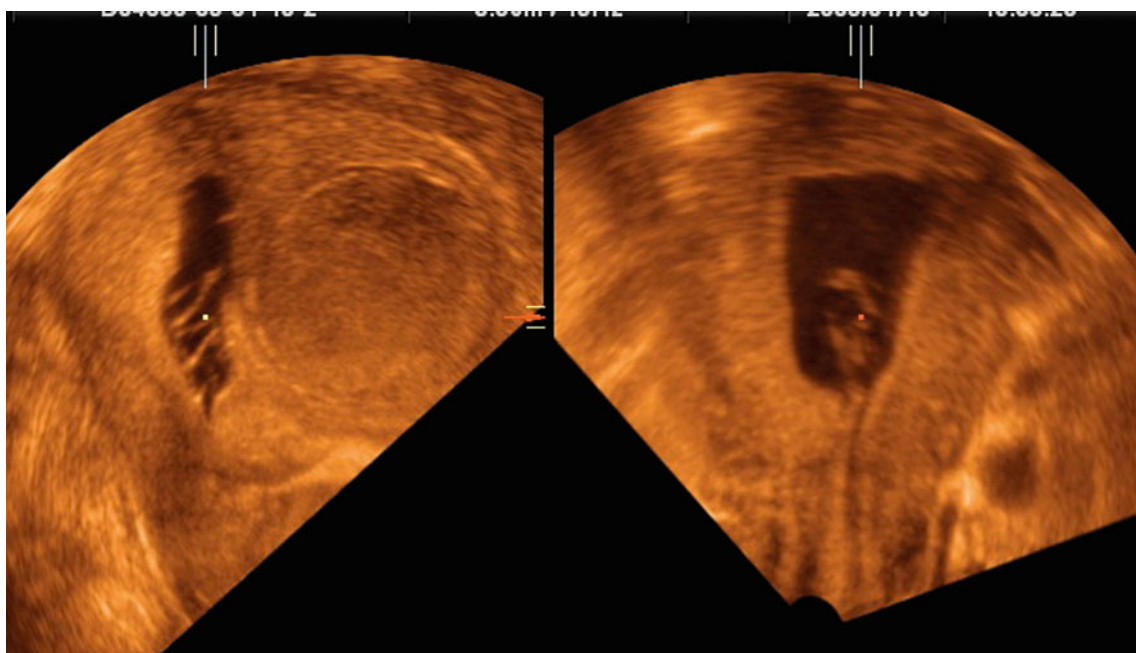


Fig. 21 – Myome intramural strict. Pas d'effet de masse sur la cavité en sono. Coupe frontale à droite.



Fig. 22 – Polype intracavitaire en sonographie. Coupe coronale à gauche et sagittale à droite.

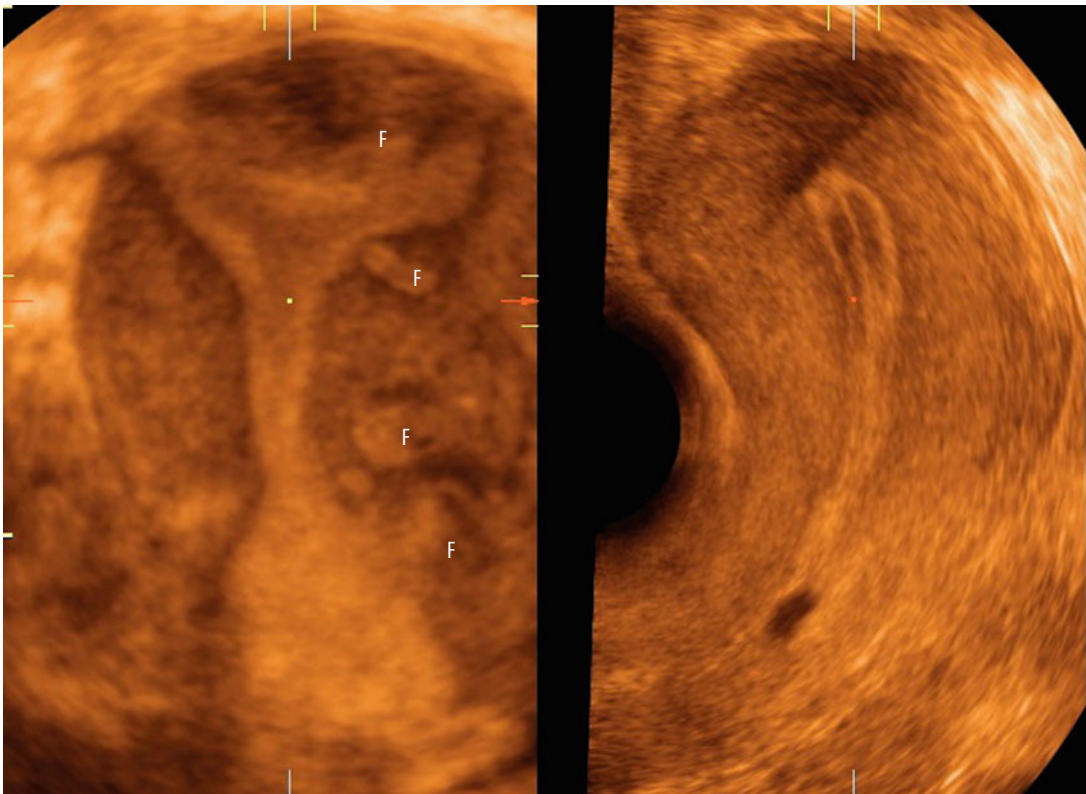


Fig. 23 – Adénomyose en flocons : coupes sagittale à droite et coronale 3D à gauche. (F = flocon)

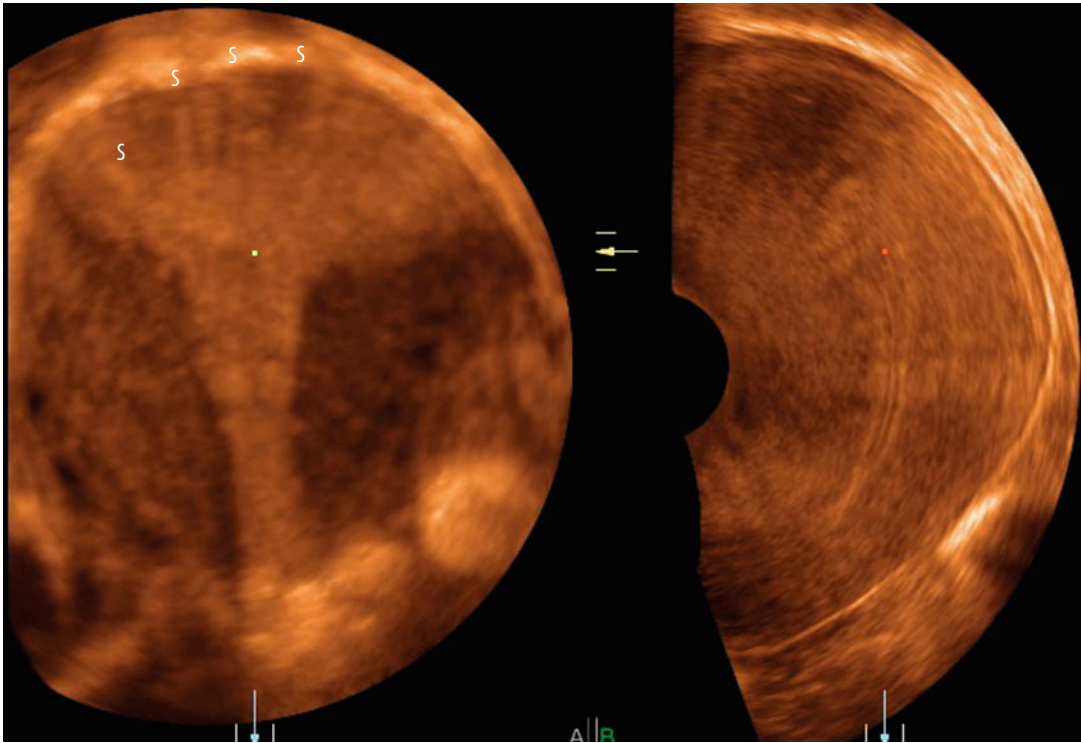


Fig. 24 – Adénomyose en striations : coupes sagittale à droite et coronale 3D à gauche. (S = Striation)

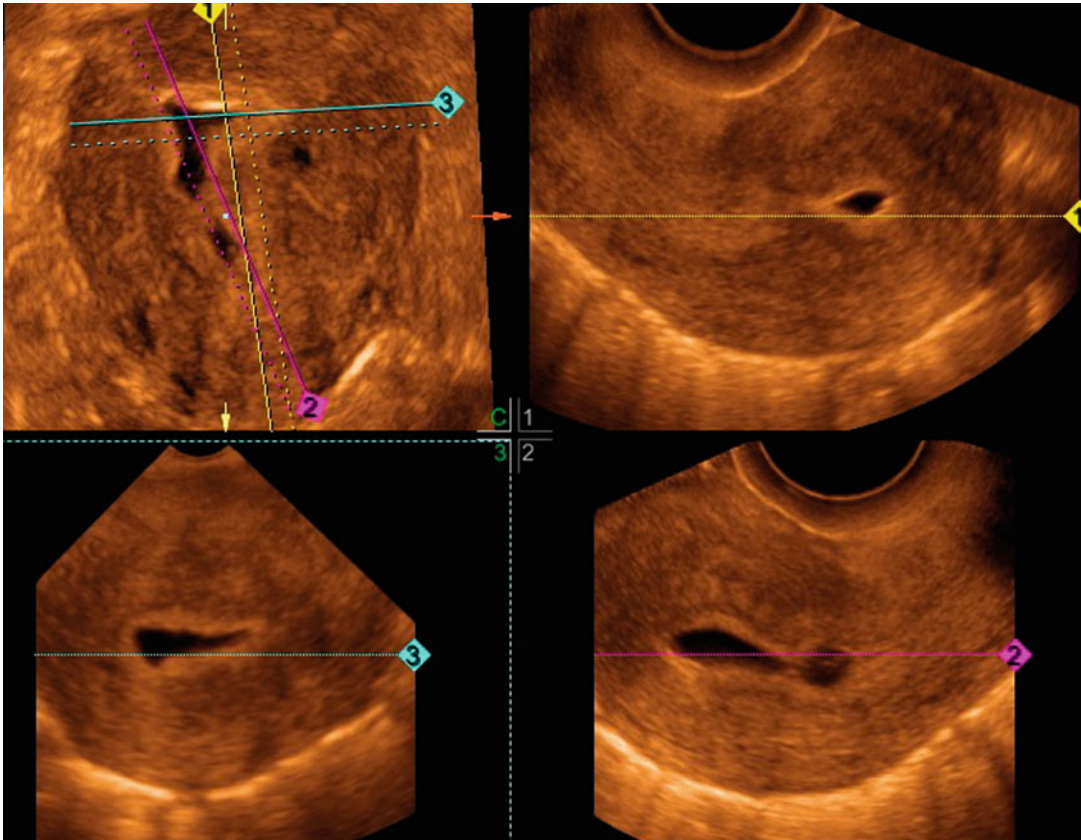


Fig. 25 – Synéchies déformantes : coupe triplan associée à une sonographie pour visualiser le passage de l'eau ; l'injection d'eau apparaît très importante pour évaluer la visualisation du fond cavitaire, ici accessible.

H. Fernandez

Hystéroscopie

Introduction

Deux siècles de recherches ont permis de résoudre le problème de l'endoscopie utérine à savoir :

- 1) la lumière avec la création parallèle d'optique performante ;
- 2) les méthodes de distension utérine ;
- 3) le lavage de la cavité utérine.

Le premier essai sur l'endoscopie utérine est rapporté par John Clark en 1639 dont le traité s'appelait « Seing is believing ». En 1867, Desormeaux a présenté à l'Académie le premier endoscope à visée urologique. La source lumineuse provenait d'une lampe consommant un mélange d'alcool et d'essence de térébenthine. Cette lumière était réfléchiée par un miroir concave dans un tube. En 1869, Pantealoni a rapporté la première hystéroscopie à l'aide d'un tube métallique de 30 Charrière (11 mm de diamètre), long de 20 cm.

Après avoir mis en évidence des polypes endométriaux, il les cautérisa avec du nitrate d'argent, ce qui permit la guérison de cette patiente. En 1879, Nitze précise les deux principes fondamentaux de l'endoscopie moderne. L'introduction de la source lumineuse à l'intérieur même de la cavité à explorer et l'élargissement du champ de vision grâce à un système optique incorporé dans le tube endoscopique. Nitze utilisait comme source lumineuse un fil de platine chauffé à blanc par un courant galvanique. L'échauffement de l'appareil était évité par une circulation d'eau froide. En 1898, Duplay et Clado inventent un hystéroscope. Ils créent un mandrin permettant l'insertion de l'endoscope associé à une lumière électrique appelé photophore. Le premier hystéroscope à éclairage interne a été mis au point par David et Gentile au début du siècle. À partir de 1970, apparaissent les optiques endoscopiques modernes, les méthodes de distension utérine utilisant les CO₂, les solutés liquides et la lumière froide.

Neuwirth adapte le résectoscope urologique d'Iglesiass aux résections endo-utérines en 1976 et l'ère moderne de l'hystéroscopie débute.

L'hystéroscopie diagnostique permet de visualiser la cavité utérine dans son ensemble et l'endomètre,

et l'hystéroscopie opératoire de réaliser des traitements chirurgicaux dont le but est de reconstituer une cavité utérine normale. Cette dernière permet d'éviter des chirurgies lourdes qui nécessitaient autrefois l'ouverture de la cavité utérine, source de complications à moyen et à long terme pour des patientes désirant une grossesse, et d'éviter des hystérectomies non indiquées.

L'hystéroscopie diagnostique est aujourd'hui une pratique ambulatoire, de consultation, ne nécessitant pas d'anesthésie préalable. Elle permet d'embrasser la visualisation des ostia tubaires, du canal cervical et de leurs pathologies, un accès au diagnostic de petites lésions, une appréciation de la qualité de l'endomètre. Elle trouve sa place aussi bien dans les infertilités primaires à la recherche de malformation utérine ou d'une pathologie intracavitaire pouvant intervenir avec la nidation, que dans les infertilités secondaires où son indication sera axée sur la recherche de séquelles de curetages. Dans les échecs d'AMP ou en cas de fausses couches à répétition, il ne faut pas hésiter à faire ou à refaire une hystéroscopie diagnostique.

Dans les ménométorragies, l'hystéroscopie est devenue l'examen de référence, au même titre que l'hystérosonographie (Recommandations pour la pratique clinique – Collège national des gynécologues obstétriciens français, 2008) (1). L'hystéroscopie opératoire ouvre le champ aux pathologies responsables des ménométorragies, mais également aux traitements des malformations utérines, aux synéchies.

Hystéroscopes

Optiques rigides

Les optiques rigides sont actuellement les plus utilisés et leur diamètre varie de 2 mm à 4 mm. L'optique de 2 mm à un angle de vue compris entre 0 et 60°. La profondeur d'observation varie entre 2 et 50 mm dans l'air et le grossissement est de l'ordre de 5 fois à 5 mm de distance. Ce type d'optique

peut être utilisé avec une gaine à double courant compacte permettant l'irrigation lavage. Un canal opérateur peut permettre l'introduction d'un cathéter ou d'un salpingoscope dans le but d'explorer les trompes, ou d'un ciseau ou d'une pince à biopsie dirigée.

Des optiques rigides avec canal opérateur de 2 mm sont également équipées de fibres optiques et pas de lentille. Leur diamètre est un avantage évident, en diminuant la douleur, mais en revanche elles ne sont pas stérilisables conventionnellement limitant leur emploi.

Les optiques de 4 mm ont une orientation habituelle de 30° de la lentille frontale. Dans certaines indications spécifiques comme le cathétérisme tubaire, il est préférable d'utiliser des optiques à 70°. En revanche, les lentilles orientées à 12° sont préférées pour la majorité des indications opératoires.

Le diamètre des optiques est habituellement en mm ou en Charrière (1 Charrière = 1/3 de mm) ou en French (globalement similaire à la charrière).

La qualité de la vision est dépendante de la qualité de la caméra jointe.

Optiques flexibles

Elles sont caractérisées par l'existence d'une extrémité de l'optique orientable dans toutes les directions permettant ainsi de mieux inspecter les faces latérales et les orifices tubaires. La mobilisation est obtenue par manipulation à partir de la poignée de l'hystéroscope, du levier de commande par le pouce de l'opérateur. Ces endoscopes ont habituellement une gaine externe de 4 à 5 mm de diamètre pourvu d'un canal opératoire co-axial de 2 mm en moyenne qui autorise le passage de pinces à biopsies, de ciseaux, d'électrodes de section et surtout de fibres laser.

Néanmoins, il est à noter que l'introduction d'instruments optiques limite le béquillage de l'extrémité distale. Leur stérilisation représente l'obstacle majeur actuellement.

Gaines d'hystéroscopies

Il faut d'emblée distinguer deux types d'hystéroscopes, à savoir les hystéroscopes classiques à chemise opératoire et les hystéroscopes à double chemise dérivés du matériel urologique (ou résectoscope) et permettant un double flux.

Les hystéroscopes classiques comportent une chemise opératoire de diamètre compris entre 5 et 6 mm qui acceptent une optique de 4 mm. L'instrumentation est insérée dans le canal opératoire d'un diamètre compris entre 1 et 3 mm. Les

instruments susceptibles d'être utilisés sont : des pinces à biopsies, des ciseaux souples, des électrodes de coagulation, des fibres de laser Nd-Yag, des électrodes bipolaires, des fibres pour cathétériser les ostia tubaires dans le but de placer des dispositifs intratubaires ou de faire pénétrer un tuboscope (même si cette indication est devenue rare).

Les résectoscopes comportent deux gaines et une poignée opératoire, la gaine interne assure l'irrigation de la cavité utérine, la gaine externe assure la récupération des fluides. Le diamètre des résecteurs est compris entre 6 et 9 mm. L'hystérorésecteur de 6 mm est habituellement utilisé pour la résection de petits myomes de moins de 1 cm mais il nécessite néanmoins une dilatation modérée du col. Les hystéroscopes de 9 mm les plus utilisés utilisent une électrode de 4 mm et des anses de 7 mm. Dans la poignée opératoire viennent s'articuler l'optique, les électrodes, la lumière froide.

Il existe deux types de résecteurs :

- les résecteurs passifs où la traction sur la poignée projette l'électrode en avant tandis que la résection s'effectue quand la poignée revient à sa position de repos. Ce type de résecteur est théoriquement moins dangereux puisqu'en lâchant la poignée, l'anse revient vers la chemise ;
- les résecteurs actifs où la mise en action de la poignée déplace l'anse d'arrière en avant. Dans ce cas, le déplacement de l'électrode se fait dans le même sens que celui de la poignée. La manipulation apparaît donc plus naturelle.

Les électrodes utilisées sont de divers types :

- électrode de résection à 90° ;
- électrode de coagulation avec Roller-Ball à portion mobile autour d'un axe ;
- électrode de section en pointe, ou aspect dit en couteau.

Milieux de distension

Rubin a le premier utilisé le CO₂ comme agent de distension. Sous contrôle de CO₂, l'hystéroscope est doucement avancé sous vision directe permettant l'introduction dans l'utérus. Le gaz carbonique est un excellent milieu de distension permettant une bonne vision de la cavité utérine. Cependant, la vision est rapidement troublée en cas de présence de sang. La distension utérine par le CO₂ expose à un risque faible mais réel d'embolie gazeuse majorée en cas de métrorragie ou de blessure vasculaire. Le CO₂ est exclusivement utilisé à visée diagnostique et doit être considéré comme contre-indiqué, au bloc opératoire, lorsqu'on pratique au cours d'un bilan de stérilité une coelioscopie et une hystéroscopie diagnostique.

Glycocolle

C'est le fluide de remplissage le plus utilisé pour la chirurgie monopolaire. Il s'agit d'une solution de glycine non ionique à 1,5 % conditionnée en poche plastique de 3 L. Sa faible miscibilité avec le sang, sa faible conductibilité électrique et sa faible viscosité en font le milieu de choix bien qu'il expose à un risque de complications métaboliques. Ce milieu est également utilisé pour un nouveau dispositif de stérilisation intratubaire appelé Adiana®.

Sérum physiologique

Le développement de l'énergie bipolaire autorise l'utilisation de sérum physiologique. Son avantage essentiel est la disparition des complications métaboliques mais il expose en cas de surcharge et/ou d'insuffisance cardiaque au risque d'œdème pulmonaire (OAP).

Il est de plus en plus utilisé pour l'hystéroscopie diagnostique et devient le milieu de référence (RPC CNGOF, 2008).

Dispositifs de contrôle des milieux de distension

Pour le CO₂, il faut disposer de pompes permettant un contrôle permanent du débit et de la pression, pour écarter les risques d'accidents d'hyperpression et d'embolie gazeuse. La pression de CO₂ est préétablie à 40 mmHg.

Pour les autres milieux de distension

Le but est de maintenir une distension utérine constante afin d'opérer sans difficulté. Le plus simple est de placer les poches de solutés de remplissage à 1,2 mètre au-dessus de la patiente (équivalent à une pression de 80 mmHg). Ce procédé permet d'utiliser la pression atmosphérique et le poids de la colonne de liquide.

La pression peut également être contrôlée de façon permanente par des pompes d'irrigation et d'aspiration : le glycocolle ou le sérum physiologique sont distillés à une pression et un débit variable préétablis par le chirurgien (habituellement 100 mmHg et 250 mL/min) et contrôlés électroniquement pour assurer un gradient de pression constant entre l'arrivée du produit de remplissage à pression positive et l'évacuation sous pression négative. Cet appareil régule en permanence la pression intra-utérine.

Certaines pompes affichent constamment le volume de soluté consommé et donc éventuellement perdu et permettent ainsi d'interrompre

l'intervention avant l'apparition de troubles hémodynamiques ou électrolytiques.

Sources lumineuses

Les lumières froides utilisées sont communes à l'hystéroscopie diagnostique et à l'hystéroscopie opératoire. La puissance oscille entre 150 et 400 Watts et elle doit être d'au minimum 250 Watts quand une caméra est adaptée à l'optique en raison de la perte d'énergie due au branchement de la caméra. Les lumières utilisées sont soit de type halogène, soit de type xénon. La durée de vie habituelle des lampes est de plusieurs mois.

Matériel vidéo

La caméra et le moniteur (l'écran) sont indispensables car ils donnent à l'opérateur un confort de travail, ils concourent à l'enseignement de l'hystéroscopie et rendent possible l'archivage des photographies ou des images vidéo.

Il faut noter l'impérative nécessité de constamment veiller à ce que la position de la caméra situe la lésion dans son exact positionnement anatomique.

Courants à haute fréquence

L'électrorésection monopolaire utilise des courants à haute fréquence supérieurs à 300 000 Hz. La section est obtenue par effet thermique. Ainsi, lorsque la température cellulaire devient supérieure à 100 °C, les tissus biologiques sont transformés en vapeur, d'où un effet de coupe au contact de l'électrode. Ces générateurs de courant haute fréquence permettent d'avoir une profondeur constante de coagulation quelle que soit la vitesse et la profondeur de coupe. Ceci autorise une hémostase des petits vaisseaux sans effet de carbonisation. On n'observe plus d'adhésion des copeaux à l'anse, ce qu'on déplorait antérieurement avec les générateurs de courant classique (2).

Courant bipolaire

Les systèmes d'électrochirurgie par vaporisation et dessiccation bipolaire sont plus récents et sont considérés comme apportant une innocuité et une efficacité équivalente à celle des dispositifs monopolaires habituellement disponibles. L'intérêt des

systèmes bipolaires est leur sécurité, car ils peuvent être utilisés avec comme milieu de distension, du sérum physiologique diminuant les complications métaboliques. Ils sont utilisables dans des hystéroscopes opératoires à double courant, de faible diamètre avec un canal opératoire de 5 French. Ainsi, une dilatation cervicale préalable n'est pas toujours requise. Ils peuvent être également utilisés avec des résecteurs de 24 French ou de 9 mm.

La vaporisation bipolaire utilise une énergie de haute fréquence vaporisant instantanément le tissu. Le sérum physiologique utilisé contient par définition des niveaux physiologiques de sodium qui n'interrompent pas l'hémostase. En mode vaporisation, la puissance et la fréquence utilisées créent une poche de vapeur enveloppant l'électrode active dirigeant l'énergie électrochirurgicale dans les tissus tout en isolant l'électrode active de l'électrode de retour. Après avoir traversé les tissus et causé une rupture cellulaire instantanée caractéristique de la vaporisation, le courant recherche le chemin de moindre résistance à travers le sérum physiologique pour retourner à l'électrode de retour. En mode dessiccation, aucune poche de vapeur n'est créée, laissant le sérum agir comme valve de dérivation du courant. Avant que les tissus ne soient dessiqués au point d'être carbonisés, le courant électrochirurgical est alors canalisé hors des tissus sélectionnés directement vers l'électrode de retour. Habituellement, les modes vaporisation et dessiccation sont contrôlés au pied par l'opérateur. L'extrémité de l'électrode utilisée offre une construction co-axiale comprenant une pointe active, une isolation céramique et une électrode de retour. Selon le modèle, l'extrémité est représentée par une tresse (*twizzle*), un ressort (*spring*) ou une boule (*ball*). La puissance maximale utilisée par les générateurs est de 200 Watts. Contrairement au système monopolaire qui s'enfonce dans les tissus et peut être en partie invisible à un moment de son utilisation, les systèmes bipolaires en mode vaporisation ou dessiccation sont constamment visibles. Cette technique de résection apparaît utile pour les lésions de petit volume mais peut apparaître d'un usage trop long pour les lésions supérieures à 20 mm. En revanche, pour les résections de 24 French ou 9 mm, la technique apparaît identique à la résection monopolaire, tout en diminuant la destruction adjacente de l'endomètre, en particulier en cas de résection de myome chez des femmes souhaitant une fertilité ultérieure.

Bilan préopératoire

L'échographie doit compléter le bilan opératoire surtout en cas de fibromes et particulièrement en cas de localisation sous-muqueuse interstitielle domi-

nante. En effet, elle mesure la distance entre le bord externe du myome et la séreuse utérine. Cette distance doit être au moins égale à 5 mm pour envisager un traitement hystéroscopique en toute sécurité.

En cas de malformation utérine, elle permet le diagnostic différentiel entre utérus bicorne et cloison car l'orientation des deux cavités est différente. L'échographie donne la mesure de l'épaisseur du myomètre normal au-dessus d'une cloison utérine. L'échographie 3D optimise le diagnostic rendant l'IRM inutile dans cette indication.

L'adénomyose peut être suspectée par la découverte de cryptes glandulaires apparaissant comme des lacunes de 1 à 2 mm. Cet examen peut conduire à demander une IRM pour préciser les lésions d'adénomyose utérine.

Une hystérosalpingographie aura pu également être pratiquée préalablement, pouvant faire évoquer une adénomyose. L'hystérosalpingographie ne doit plus être utilisée qu'en cas d'infertilité.

L'hystérosonographie est une technique complémentaire à l'échographie pelvienne et peut améliorer la pertinence diagnostique par la création d'une interface liquidienne en regard de l'endomètre facilitant ainsi le diagnostic des pathologies endocavitaires.

Technique

Hystéroscopie diagnostique

L'hystéroscopie diagnostique est pratiquée habituellement entre le 8^e et le 15^e jour du cycle car le canal endocervical est suffisamment entrouvert et l'endomètre peu épais en phase proliférative débutante améliorant de ce fait la qualité de l'observation de la cavité utérine. De plus, réalisée à cette période du cycle, toute grossesse est éliminée. Chez la femme ménopausée, une préparation par les estrogènes peut être réalisée avant l'hystéroscopie diagnostique voire opératoire. L'hystéroscopie précisera en cas de polypes ou de myomes la taille, le nombre, la localisation, l'accessibilité, l'existence de pathologie associée. La classification des myomes est réalisée en hystéroscopie (fig. 1). En cas de pathologie de l'endomètre, elle permettra d'emblée d'évoquer une pathologie maligne et permettra de pratiquer des biopsies dirigées.

Dans les autres indications, elle confirme l'importance de la synéchie, le type de synéchie, le type de malformation utérine.

L'hystéroscopie est pratiquée en consultation et une prescription d'ibuprofène 400 mg peut être proposée 2 heures avant l'acte. Même si la prescription de misoprostol intravaginal 2 heures avant l'acte peut être également possible (3), aucun essai thérapeuti-

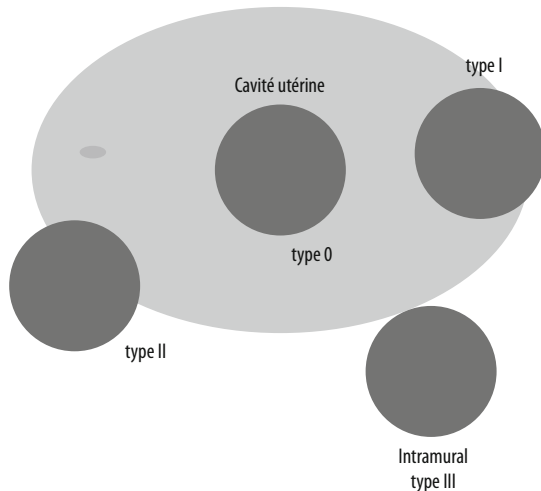


Fig. 1 – Myome : classification de l'ESHRE.

que a confirmé son indication, d'autant plus que 30 % des patientes présenteront des douleurs suite à la pose. Afin d'éliminer des douleurs associées, la pose du spéculum et la mise en place d'une pince de Pozzi peuvent être supprimées, pour être substituées par la réalisation d'une vaginoscopie. L'optique branchée au sérum physiologique permet d'explorer le vagin, repère le col et l'optique suit le chemin du canal endocervical pour pénétrer dans la cavité utérine. Cette exploration est ainsi possible même en cas de virginité. La question de l'antisepsie vaginale préalable est discutée et probablement pas nécessaire.

Traitement médical préopératoire

Le traitement médical préopératoire n'est pas systématique mais peut permettre aux opérateurs peu expérimentés une plus grande facilité du geste (4). Quand il est indiqué, il s'adresse aux fibromes symptomatiques et aux résections d'endomètre. Le but des traitements est de corriger la fréquente hyperestrogénie relative et d'entraîner une atrophie de l'endomètre. Le traitement médical permet également de diminuer les phénomènes hémorragiques avant le traitement chirurgical ou de corriger une anémie. Les dérivés de la nor-progestérone ou de la nortestostérone sont cependant assez décevants. De plus, ils n'influencent pas la taille des myomes voire l'augmentent par un effet mitotique. Les agonistes de la LHRH entraînent une réduction de volume du fibrome, une réduction de l'anémie, une diminution des phénomènes hémorragiques, et un moindre passage du liquide de lavage. Les deux premiers critères correspondent à l'AMM du produit. La réduction du volume utérin et des myomes se situe entre 30 et 60 %. Le maximum de la régression des fibromes se fait en 2 à 3 mois, au-delà le volume ne diminue plus. La réponse aux

agonistes de la LHRH est variable selon les individus. Il existe 5 à 10 % d'échec à ce traitement. Le même traitement peut être utilisé pour préparer l'endomètre en vue de faciliter les résections endométriales. Au-delà de 3 mois, le risque de l'hypoeestrogénie prolongée est la sténose cervicale rendant la dilatation difficile et augmentant de ce fait le risque de plaies cervicales. Pour les fibromes, l'indication principale est un volume supérieur à 4 cm.

Le danazol présente les mêmes indications que les agonistes mais son effet androgénique limite son utilisation en routine.

Les antagonistes de la LH-RH et la mifépristone peuvent être intéressants. Leur utilisation n'est cependant pas en routine et d'autres études sont nécessaires pour confirmer leur efficacité (5, 6).

Technique opératoire

Technique de résection

Un toucher vaginal sera effectué pour juger de l'anté- ou de la rétroversion utérine, guidant ultérieurement la dilatation et diminuant le risque de perforation.

Un spéculum à valve démontable est mis en place et le col est saisi par deux pinces de Pozzi ou de Museux-Palmer placées à 3 heures et 9 heures.

Cette technique à deux pinces permet d'avoir une traction homogène sur le col dans le but de faciliter la dilatation et de diminuer fausses-routes, perforations ou plaies cervicales.

Une hystérocopie diagnostique au sérum physiologique peut être pratiquée préalablement pour reconfirmer les lésions et leur topographie exacte. Le col est ensuite dilaté à l'aide de bougies de diamètre progressivement croissant par 0,5 mm ou 1 mm selon la trophicité du col. Il est fréquent d'utiliser les bougies de Hegar, la dilatation se fait jusqu'à la bougie numéro 10 inclus.

Le résectoscope muni de ses deux chemises concentriques permettant l'irrigation à flux continu par le milieu de distension choisi, de la poignée opératoire sur laquelle s'articule l'optique, l'électrode, et la caméra branchée sur l'optique est introduit dans la cavité utérine sous contrôle vidéo. Il est habituellement déconseillé de pénétrer l'hystérocopie opératoire à l'aide du mandrin dans le but d'éviter tout geste à l'aveugle. En cas de difficulté de pénétration en raison d'une sténose, il peut être exceptionnellement licite de faire pénétrer l'hystérocopie sous contrôle échographique. En cas d'utilisation de pompe à instillation, la pression intra-utérine est réglée de façon à ne pas dépasser 100 mm de mercure (Hg) et le débit est bloqué à

250 mL maximum. L'optique habituellement utilisée présente une forobliquité distale de 12°.

Avec un résectoscope passif, l'introduction du résecteur dans la cavité se fait poignet libre et l'articulation de la poignée libère l'anse du résecteur. Avec un résectoscope actif, l'introduction du résecteur doit être fait poignet fermé de manière à protéger l'anse de résection. Dans la cavité utérine, la poignée sera ouverte sous contrôle visuel pour pratiquer l'intervention hystéroscopique.

Sur le plan opératoire, le mouvement utilisé n'est pas qu'un simple mouvement de flexion-extension des doigts mais il doit être complété par un mouvement de flexion de l'avant-bras sur le bras permettant dans les indications de résection d'obtenir des copeaux plus importants. Un bilan précis des entrées et des sorties du liquide de distension doit être pratiqué et l'intervention doit être stoppée immédiatement si l'irrigation se fait sans récupération. Il faut habituellement limiter le temps des interventions à 45 minutes et le volume total de glycolle utilisé ne doit pas excéder 6 litres. Au-delà du temps opératoire ou du volume, il sera nécessaire de pratiquer systématiquement un ionogramme sanguin de façon à dépister des complications métaboliques. En cas d'utilisation de l'énergie bipolaire, la limitation de temps disparaît car le risque de TUR syndrome, propre au glycolle, disparaît. En revanche, le contrôle entrée-sortie des liquides persiste, car le risque de surcharge est toujours présent (OAP décrit). En cas de sténose cervicale connue, il peut être discuté d'utiliser du misoprostol, deux comprimés en intravaginal donnés 2 à 4 heures avant l'intervention. Cependant, l'utilisation du misoprostol n'a pas encore été validée, ni dans son rythme de prise avant l'intervention (dès la veille, le matin même, combien d'heures avant le geste opératoire ?), ni dans la réalité de son efficacité, car en fait son efficacité apparaît souvent subjective (3). À l'inverse, en cas de béances, il est utile de rapprocher de l'orifice cervical les deux pinces de Pozzi de façon à diminuer l'intensité des fuites et faciliter la vision.

En cours d'intervention, lorsque l'opérateur est gêné par des copeaux, du sang ou une muqueuse épaisse, il est utile en retirant l'endoscope d'évacuer le contenu utérin soit à l'aide de l'anse de résection soit à la curette douce (7).

Technique opératoire et indications

Polype et myome

Il faut distinguer les polypes qui sont toujours strictement endocavitaires et les fibromes dont on distinguera trois types :

- le fibrome intracavitaire ou sous-muqueux de type 0 : celui-ci est entièrement dans la cavité utérine et l'angle de raccordement du fibrome avec la paroi utérine est un angle aigu ;
- le fibrome sous-muqueux de type 1 : la portion interstitielle est inférieure à 50 % de son diamètre ;
- le fibrome sous-muqueux de type 2 : la portion interstitielle est supérieure à 50 % de son diamètre.

L'hystéroscopie diagnostique pratiquée préalablement consiste à explorer la cavité utérine, à localiser les ostia tubaires et les lésions associées (fibromes, polypes, hyperplasie de l'endomètre et plus rarement adénomyose).

Si la lésion myomateuse est pédiculée ou à base sessile étroite, on peut réséquer la base et repérer immédiatement le plan de la paroi utérine normale. Ceci n'est habituellement réalisable que pour les lésions inférieures à 15 mm. Dans les cas plus difficiles, on commence à réséquer par section le bord libre du myome pour arriver jusqu'à l'endomètre sain qu'il est essentiel de respecter chez les femmes jeunes ou ayant un désir de fertilité.

Dans les fibromes sous-muqueux de type 1 et de type 2, l'intervention débute par la résection de la portion intracavitaire du myome. Une fois les copeaux retirés, il faut repérer les limites entre le myomètre sain de structure plus rose, moins ferme, et saignant plus facilement, du myome. Il peut être utile de masser la portion interstitielle du myome avec l'extrémité de l'électrode, ce qui a pour but d'entraîner une contraction du myomètre et une éventuelle protrusion du myome dans la cavité utérine et de repousser plus aisément ses limites.

Une injection d'ocytocine dans le même temps facilite la contraction utérine et la protrusion du myome. La résection sera alors complétée en gardant toujours les limites de résections sous contrôle de la vue. Dans ces situations, il faut savoir laisser le fond du myome et reprogrammer une hystéroscopie à distance (habituellement 2 mois) précédée d'une nouvelle échographie afin de pratiquer le deuxième temps opératoire. Pour l'abord de fibromes situés près des cornes, il est essentiel de savoir que la paroi utérine est plus fine, 3 à 5 mm, fragile, et que l'acceptation d'une résection d'un myome à ce niveau doit être prudente. Il est possible d'utiliser dans cette indication, le mode dessiccation en chirurgie bipolaire permettant, sans copeaux, de retirer le myome.

L'intervention est réalisée en section uniquement. Pour les patientes ayant un désir de fertilité, il faudra se garder de faire trop de coagulation en raison du côté délétère de celle-ci sur l'endomètre adjacent. Chez les patientes en péri-ménopause présentant un endomètre polypoïde, il est nécessaire de pratiquer dans le même temps une résection d'endomètre, pour diminuer le risque de récurrence.

Cas particuliers des polypes

Il faut toujours préférer un traitement hystérocopique au curetage car celui-ci peut ignorer certains polypes ou laisser un fragment ou la base du polype. En cas de traitement d'un polype supérieur à 15 mm avec une chemise de 4,5 mm et d'une électrode bipolaire, il est nécessaire de sectionner le polype en tranches avant de le détacher pour faciliter l'extraction des copeaux à la pince.

Association de lésions

En cas de myomes multiples ou d'association polypes et myomes, la technique sera identique et adaptée à chaque cas. Il est cependant important de noter qu'en cas de fibromes multiples intracavitaires, les chances de succès se trouvent diminuées (50 % d'échecs à partir de trois fibromes) (fig. 2, 3, 4 et 5) (8, 9).

En cas de fibrome, après 40 ans, sans désir ultérieur de grossesse, la résection d'endomètre associée à la résection de fibrome optimise les résultats.

Bilan post-résection

L'hystérocopie diagnostique postopératoire à deux mois n'est pas systématique pour tous les

fibromes réséqués. Ce temps est cependant indispensable lorsque l'indication de la résection de myome est une infertilité ou que potentiellement il peut exister un désir ultérieur de grossesse et ceci quel que soit l'âge. En effet, dans ces situations, le taux de synéchies est estimé entre 10 % et 30 % (10). Ces synéchies sont habituellement aisément levées lors du temps d'hystérocopie diagnostique par l'extrémité biseautée de l'optique. L'utilisation de l'énergie bipolaire diminue le risque de synéchie.

Résection de l'endomètre

L'indication princeps est l'hémorragie idiopathique, résistance aux traitements médicaux sans désir de grossesse.

Technique

La résection doit commencer par l'installation d'une électrode spécifique de coagulation (Roller-Ball) qui est une électrode munie d'une sphère tournant sur un axe et assurant une coagulation homogène en électrochirurgie monopolaire. En électrochirurgie bipolaire, l'électrode ne roule pas. En raison de la minceur de la paroi utérine, au niveau des

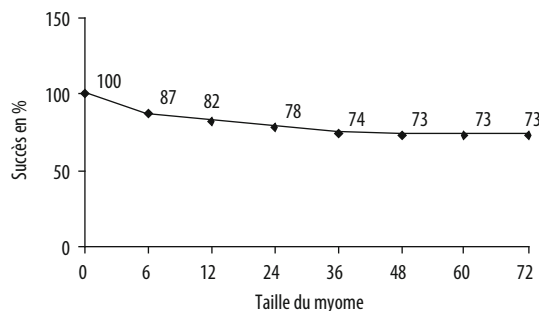


Fig. 2 – Résultat fonctionnel exprimé suivant le modèle d'une courbe de survie.

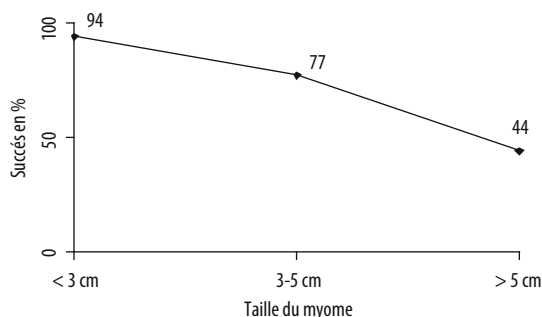


Fig. 3 – Traitement hystérocopique des myomes utérins. Succès fonctionnel en fonction de la taille du myome.

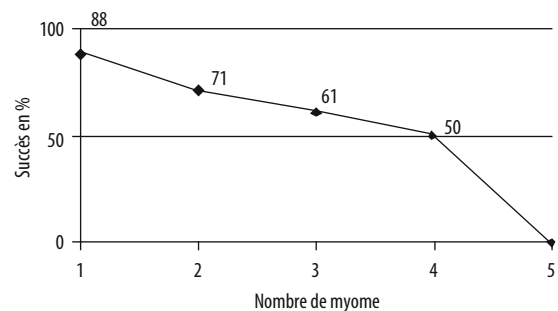


Fig. 4 – Traitement hystérocopique des myomes utérins. Succès fonctionnel en fonction du nombre de myome endocavitaire.

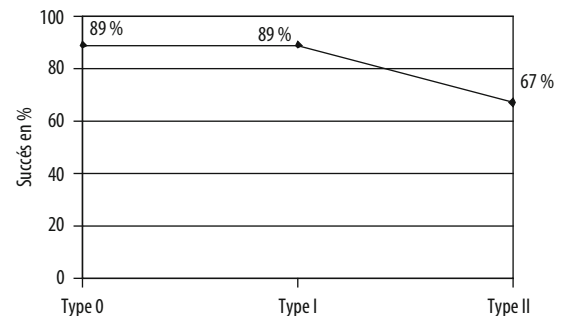


Fig. 5 – Traitement hystérocopique des myomes utérins. Succès fonctionnel en fonction de la composante intersituelle du myome.

ostia et des difficultés de résection sur le fond, il apparaît plus facile de débiter l'intervention par la coagulation des deux ostia et du fond utérin. Par ailleurs, il est plus aisé de débiter la résection par ce temps là car, en fin d'intervention, on peut être gêné soit par les copeaux, soit par la résection déjà réalisée pour localiser aisément les ostia et le fond utérin. Ceci réalisé, on retire l'hystéroscope et on substitue l'électrode de coagulation à une électrode de résection.

La résection est alors commencée habituellement sur la face postérieure, en pratiquant un sillon du fond utérin jusqu'à l'isthme par un mouvement continu régulier joint à la flexion de l'avant-bras sur le bras. Le sillon initial permet de déterminer la profondeur nécessaire, s'arrêtant sur la paroi musculaire délimitée par les fibres circulaires externes du myomètre avant la couche du plexus veineux. La résection d'endomètre sera ainsi complétée classiquement dans le sens des aiguilles d'une montre et incluant la face postérieure, le bord gauche, la face antérieure et le bord droit. Les bords utérins dans leur portion isthmique doivent être respectés en raison de la proximité des vaisseaux utérins et la portion endocervicale ne doit pas être réséquée pour éviter des synéchies endocervicales responsables d'hématométrie et de douleurs ultérieures. Par ailleurs, une synéchie endocervicale contre-indique toute possibilité de surveillance ultérieure en cas de réapparition de métrorragies anormales. Lors de la résection d'endomètre, l'hémostase est faite à la demande avec coagulation élective des vaisseaux. En fin d'intervention, la résection sera complétée par régularisation de la cavité sur les reliefs laissés en place de manière à conserver tout au long de la résection d'endomètre des repères anatomiques. Dans les résections endométriales partielles, il est laissé 1 cm de collerette endométriale sus-isthmique. La récupération des copeaux se fait à l'aide de l'anse ou de la curette mousse. Il est préférable de ne pas retirer au décours de l'intervention les copeaux en refoulant ceux-ci vers le fond de la cavité.

En cas d'endométréctomie en post-ménopause ou sur un utérus de petit volume (hystérométrie ≤ 6 cm), il est alors nécessaire de retirer les copeaux au fur et à mesure.

Cas particulier : saignement sur cicatrice de césarienne

Cette pathologie est décrite depuis les années 2000, et se caractérise par l'existence d'une isthocèle. La cavité est normale et le saignement en nappe provient de la cicatrice visible. Le traitement impose d'électrocoaguler cette zone de cicatrice qui va se rétracter et cicatriser.

Malformations utérines

Technique opératoire

L'hystéroscope opératoire classique avec ciseaux rigides fixés sur la gaine ne semble plus de mise et la section électrique doit être préférée. On utilise des électrodes en barres frontales ou à pointes car le but n'est pas de réséquer la cloison mais de la sectionner afin de ne pas détruire une partie de l'endomètre. L'intervention constamment réalisée sous contrôle de la vue consiste à sectionner transversalement à mi-distance entre les deux faces. Le résectoscope est orienté transversalement et la section est réalisée de proche en proche par attouchements réguliers de l'électrode (fig. 6). La cloison va alors se rétracter et s'incorporer aux deux faces utérines. Cette section de cloison peut être totalement pratiquée sous contrôle visuel. Pour certains chirurgiens, un contrôle échographique peropératoire par voie abdominale est nécessaire. En cas de coelioscopie associée, la technique de contrôle par transillumination ne permet pas de contrôler le niveau de section de la cloison. En fin d'intervention, il est préférable de laisser un discret éperon toujours inférieur à 1 cm qui empêche de voir dans le même plan les deux ostia. Cette précaution évite de faire un résultat trop parfait qui aurait pour but de fragiliser le myomètre fundique.

Dans les cas où l'hystérocopie et l'échographie de contrôle pratiquées deux mois plus tard retrouveraient un éperon supérieur à 10 mm, il peut être licite de pratiquer dans un deuxième temps une recoupe.

En cas de deux cavités utérines irrégulières, la résection de la cloison est habituellement débutée du côté hypoplasique. La résection des cloisons est habituellement exsangue en raison du caractère peu vascularisé de ce tissu.

En cas de cloison atteignant le col ou créant deux cols, il peut être licite de faire une section complète de la cloison cervicale par ciseau froid ou électrode coupante. Cette section est débutée au niveau du col par section de l'orifice externe vers

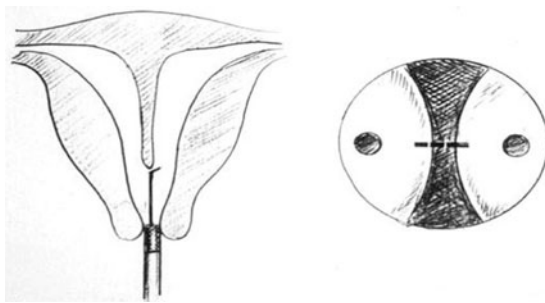


Fig. 6 – Section de cloison par électrode.

l'utérus. Le risque de béance est habituellement très faible, l'intervention est ensuite continuée par section totale de la cloison jusqu'au fond utérin en évitant de sectionner jusqu'au plan des deux orifices tubaires.

L'utilisation des courants bipolaires avec une électrode 5F permet de pratiquer cette intervention sans dilatation, ce qui évite toute difficulté ou plaie cervicale.

En cas de béance cervicale, on utilisera de préférence les chemises opératoires de 24F ou 9 mm. Dans les autres indications, et en particulier en cas de cloison découverte au décours d'un bilan d'infertilité, on utilisera de préférence les chemises opératoires à double courant de 5 mm. Même si le débat n'est pas clos, l'indication opératoire en cas d'infertilité est proposée pour éviter le risque de fausse couche ou d'accouchement prématuré. Dans les autres cas, ce sont ces deux antécédents qui indiquent la résection de cloison.

Plastie d'agrandissement des utérus hypoplasiques

Spontanément ou après exposition *in utero* au Distilbène®, il peut exister des utérus hypoplasiques inférieurs à 6 cm avec rétrécissement médio-cavitaire dû à une hypertrophie myométriale.

Il est actuellement proposé de faire des plasties d'agrandissement en utilisant la pointe de l'électrode de préférence bipolaire, pour au niveau des deux bords latéraux, élargir la cavité utérine, ce qui va permettre de voir apparaître dans le plan de l'hystéroscopie les deux ostia tubaires. L'intervention sera arrêtée à ce moment. Ce type d'intervention est à ce jour en cours d'évaluation mais il n'est pas prouvé qu'un agrandissement anatomique améliore la fertilité même si le risque d'accouchement prématuré semble diminué.

Cure de synéchie

En cas d'aménorrhée, l'hystéroscopie opératoire sera pratiquée à n'importe quel moment. En cas de persistance de cycle même si les règles sont peu abondantes, il est préférable de pratiquer l'ablation des synéchies en immédiat post-menstruation de façon à ne pas être gêné par l'endomètre. Les traitements atrophiant sont plutôt déconseillés dans cette indication.

Plusieurs classifications existent pour les synéchies. Pour faciliter le raisonnement, on distingue :

- les synéchies de type I : elles sont habituellement centrales, fines ;

- les synéchies de type II : marginales se projetant au niveau d'un ostium type 2A ou oblitérant un ostium type 2B ;
- les synéchies de type III ou syndrome d'Ascherman faisant quasiment disparaître la cavité utérine et masquant les ostiums ;
- les synéchies de type IV où il n'existe plus d'endomètre visible.

Le bilan préopératoire doit comprendre une hystéroscopie diagnostique ambulatoire et une hystérographie.

Technique opératoire

Malgré la classification des synéchies, la multiplicité des types de synéchies rend une technique standardisée plus difficilement descriptive. La base de la technique est d'effondrer ou de sectionner les synéchies en respectant l'endomètre environnant qui viendra ultérieurement coloniser les lésions lésées. Parfois, les synéchies muqueuses sont essentiellement détruites par l'extrémité biseautée de l'endoscope diagnostique qui, par sa forobliquité de 30° et sa possibilité de mouvements de va-et-vient débutant dans les zones de moindre résistance, fait céder ce type de synéchies peu étendues. Cette technique peut être réalisée en consultation. On utilise comme dans les malformations utérines une électrode en barre frontale ou en pointe. L'extrémité de la pointe apprécie l'épaisseur de la synéchie avant de la sectionner et les différents types de synéchies seront sectionnés au fur et à mesure en respectant le myomètre. Dans les syndromes d'Ascherman ou dans les synéchies complexes, les repères anatomiques type ostia tubaires ont disparu et les cavités apparaissent souvent cylindriques. Il faut forer de proche en proche la cavité utérine et ouvrir latéralement et au fond éventuellement sous contrôle échographique afin d'éviter toute perforation. Ces synéchies complexes sont habituellement traitées en plusieurs temps opératoires de façon à éviter tout risque de complications.

La prescription d'un produit antiadhérentiel, dans le but de prévenir la survenue ou la récurrence de synéchies n'a pas encore de légitimité scientifique. Même si certains produits semblent montrer une efficacité, leur innocuité pour maintenir l'implantation et la nidation n'a pas été démontrée (11).

Autres indications opératoires

Ablation de stérilets

L'hystéroscopie est essentiellement indiquée quand le stérilet est enchâssé dans une partie du myomètre.

Il est alors recommandé de le retirer sous contrôle visuel afin d'éviter que le stérilet ne se casse.

Deux techniques sont possibles, introduction en parallèle d'un hystéroscope diagnostique et d'une pince rigide qui permet ainsi de vérifier l'ablation complète du stérilet.

L'autre technique est l'introduction à l'intérieur d'une gaine opératoire d'une pince qui permet de retirer le stérilet.

Ablation de rétentions trophoblastiques

En cas de suspicion de rétentions trophoblastiques persistantes, il est licite de faire une hystérocopie diagnostique qui confirmera le diagnostic. Afin de ne pas augmenter le risque de synéchies par un curetage ou une nouvelle aspiration (12), dans l'immédiat post-partum ou post-abortum, il est préférable d'introduire un résecteur de 24 charnières et de retirer le tissu trophoblastique à l'anse de résection, sans utiliser de manière systématique le courant électrique, en l'utilisant comme une simple curette sous contrôle de la vue. Le geste est simple, exsangue et sans conséquence pour la muqueuse avoisinante.

Ablations des métaplasies ostéoïdes

Elles sont découvertes le plus souvent à l'occasion d'un bilan d'infertilité, de dysménorrhées et/ou de métrorragies. L'échographie retrouve une plage hyperechogène intra-utérine et l'hystérocopie confirme le diagnostic.

L'ablation est habituellement aisée suivant la même technique décrite pour les résections de tissus trophoblastiques.

On utilise le résecteur et l'ablation de la plaque avec l'anse sans utilisation de la section de façon à ne pas risquer de sectionner la plaque et de laisser *in situ* des fragments qui pourraient auto-entretenir le mécanisme ayant créé cette métaplasie. Il est important de mobiliser et de désolidariser l'implantation endométriale de ces plaques ostéoïdes avant de les retirer.

Adénomyose

La première difficulté est le diagnostic hystérocopique de l'adénomyose. La deuxième difficulté est d'accepter l'hystérocopie comme traitement, car la meilleure indication du traitement de l'adénomyose est l'hystérectomie. Cependant, l'adénomyose, si elle est diagnostiquée en peropératoire en particulier au décours d'une ablation de fibromes, d'une résection endométriale,

peut être traitée. Dans ce cas, on pratiquera des interventions de destruction à l'aide de la Roller-Ball. Si le choix est de traiter de principe l'adénomyose par une technique d'hystérocopie, il sera alors pratiqué une résection d'endomètre la plus profonde possible en évitant les plexus veineux en profondeur. Il est cependant certain que le taux d'échecs est supérieur à celui observé dans les hémorragies idiopathiques. Cette technique ne s'applique qu'en l'absence de désir de grossesse. Dans le cas contraire, l'hystérocopie permettra l'ablation des adénomyomes comme un myome, ou des lésions disséminées d'adénomyose.

Stérilisation tubaire par voie hystérocopique

Cette technique est devenue la technique de première intention pour la stérilisation tubaire. Elle a pour but d'introduire un implant de nickel-titane (Essure®) par chaque ostium en laissant dans la cavité utérine 3 à 8 spires.

La sténose périostiale se produit en trois mois, période durant laquelle une contraception est maintenue. Cette technique peut également être utilisée pour le traitement des hydrosalpinx avant FIV en cas de contre-indication à pratiquer une coelioscopie.

Références

1. Recommandations pratiques cliniques du CNGOF (2008) Paris, Elsevier-Masson
2. Hamou J (1993) Electroresection of fibroids. In: Sutton C, Diamond M. Endoscopic Surgery for Gynecologists. Saunders, London, 327-30
3. Fernandez H, Alby JD, Tournoux C, Chauveaud-Lambling A, DeTayrac R, Frydman R, Porcher R (2004) Vaginal misoprostol for cervical ripening before operative hysteroscopy in pre-menopausal women; a double-blind, placebo-controlled trial with three dose regimens. Hum Reprod 19: 1618-21
4. Donne J, Schurs B, Gillerot S (1991) Treatment of uterine fibroids with implants of gonatropin releasing hormone agonist: assessment by hystero-graphy. Fertil Steril 51: 947-51
5. Matsuo H, Maruo S, Samoto T (1997) Increased expression of Bcl-2 protein in human leiomyoma and its up-regulation by progesterone. J Clin Endocrinol Metab 82: 293-9
6. Murphy AA, Kettell M, Moraless AJ (1993) La régression des léiomyomes utérins en réponse à l'antiprogestérone RU486. J Clin Endocrinol Metab 76: 513-7
7. Corson SL, Brooks PG (1991) Rectoscopic myomectomy. Fertil Steril 55: 1041-4
8. Fernandez H, Kadoch O, Capella-Allouc S, Gervaise A, Taylor S, Frydman R (2001) Hysteroscopic resection of submucous myomas: Long term results. Ann Chir 126: 58-64
9. Fernandez H, Sefrioui O, Virelizier C, Gervaise A, Gomel V and Frydman R (2001) Hysteroscopic resection of submucosal myomas in patients with infertility. Human Reprod 16: 1489-92

10. Taskin O, Sadik S, Onoglu A, Gokdeniz R, Erturan E, Burak F, Wheeler JM (2000). Role of endometrial suppression on the frequency of intrauterine adhesions after resectoscopic surgery. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 7: 351-4
11. Acunzo G, Guida M, Pellicano M *et al.* (2003) Effectiveness of auto-cross-linked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hystroscopic adhesiolysis; A prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 18: 1918-21
12. Friedler S, Margalioth EJ, Kafka I, Yaffe H (1993) Incidence of post-abortion intra-uterine adhesions evaluated by hysteroscopy: a prospective study. *Human Reprod* 8: 442-4

O. Chanelles et C. Poncelet

Malformations utérines et reproduction

Introduction

La mise en évidence d'une malformation utérine, voire utéro-annexielles, de découverte fortuite lors d'un bilan d'infertilité du couple, demande une expertise spécifique (1). La fréquence des malformations utérines varie en fonction des populations étudiées, qu'elles soient fertiles ou infertiles. En effet, la fréquence des malformations utérines ayant un impact sur la reproduction reste difficile à apprécier. Elle varie en fonction des séries de 0,5 à 47 % (2-7). D'ailleurs, plusieurs classifications sont à notre disposition comme références, ceci rendant parfois malaisées les comparaisons entre les séries. Les Anglo-Saxonnes faisant plutôt référence à la classification de l'American Fertility Society (AFS) (8, 9) et les Francophones se référant à la classification de Musset et Belaich (10) ne permettent pas systématiquement de validation ubiquitaire, de critères pronostiques ni de gestes codifiés. De plus, les critères diagnostiques des malformations utérines ont été dépendants des méthodes diagnostiques utilisées.

Dans les différentes études publiées, l'échographie pelvienne et l'hystérosalpingographie ont pu faire évoquer une malformation utérine. Mais toutes les études ne comportaient pas systématiquement un temps cœlioscopique, qui était alors l'unique exploration permettant d'affirmer définitivement le diagnostic et de classer correctement la malformation.

Actuellement, afin de valider une prise en charge médicochirurgicale optimale, peu d'études correctement menées sont à notre disposition, de nombreux biais existent donc entre les séries et ne permettent pas de conclusions définitives.

L'analyse des résultats des études impliquant une distinction entre la fertilité spontanée et le devenir du *conceptus*, d'une part, et la fertilité induite ou médicalement assistée avec ou sans geste chirurgical, d'autre part, nous semblent apporter des éléments pragmatiques, immédiatement applicables, pour la prise en charge des malformations utérines en reproduction.

Fertilité spontanée

Saravelos (11), à travers une revue de la littérature, retrouve une fréquence des malformations utérines de 6,7 % dans la population générale alors qu'elle est de 7,3 % dans la population infertile et de 16,7 % dans la population présentant des fausses couches à répétition. Dans une étude rétrospective (4) incluant 3 181 femmes (fertiles et infertiles) ayant eu une hystérosalpingographie suivie d'une cœlioscopie, Raga *et al.* (4) retrouvent un taux de malformation utérine de 4 %. En comparant les femmes infertiles aux femmes fertiles, le taux de malformation utérine était significativement plus élevé dans le groupe de femmes infertiles (6,3 vs 3,8 %, $p < 0,05$). Mais la malformation génitale était rarement la seule responsable de cette hypofécondité. En effet, une endométriose pelvienne était associée dans 25 à 30 % des cas et une pathologie tubaire dans 15 à 20 % des cas.

Nahum (1) a réalisé une revue de la littérature concernant la fréquence des malformations utérines, chez des femmes fertiles et infertiles. La distribution de ces anomalies est résumée dans le tableau I.

Ainsi, certaines anomalies peuvent être responsables d'hypofécondité (comprenant les défauts d'implantation embryonnaire), de fausses couches précoces, de pertes fœtales prématurées ou de complications obstétricales. Dans une population de femmes incluses en assistance médicale à la procréation (AMP), la distribution est différente et résumée dans le tableau II. Nous ne discuterons pas la pertinence des examens complémentaires diagnostiques et possiblement pronostiques, mais rappellerons l'intérêt de l'examen morphologique utérin de visu.

La façon la plus pertinente de nos jours permettant de poser le diagnostic exact de la malformation utérine est l'association hystérocopie, cœlioscopie, hystérosonographie et échographie en trois dimensions. Ceux-ci ayant suppléé au duo classique échographie deux dimensions et hystérosalpingographie (11). En effet certaines séries rapportent une sensibilité de 92 % en faveur de l'échographie

Tableau I – Fréquence des malformations utérines dans la population et répartition des différentes anomalies, d’après Nahum (1).

Fréquence des malformations utérines	Fréquence (%)
Population générale	0,5
Population fertile	0,17
Population infertile	3,5
Pertes fœtales à répétition	5
Répartition des malformations utérines	
Utérus bicornes unicervicaux	39
Utérus cloisonnés	34
Utérus bicornes bicervicaux	11
Utérus arqués	7
Utérus unicornes	5
Aplasie utérine	4

Tableau II – Distribution des malformations utérines dans une population de femmes prises en charge en assistance médicale à la procréation (32).

Type d’anomalie	Fréquence relative (%)
Cloison utérine	42,1
Utérus unicornes	23,1
Utérus pseudo-unicornes	21
Utérus bicornes	13,2

en trois dimensions (12) et de 100 % pour l’hysté-
rosonographie (13).
Le pronostic global serait fonction de l’anomalie
utérine retrouvée. Le retentissement sur la fécon-
dité serait indéniable mais mal expliqué en cas
d’aplasie utérine unilatérale (fig. 1) (14).
Pour les utérus bicornes isolés (uni- ou bicervicaux)
(fig. 2), aucun argument ne peut être retenu pour
l’hypofécondité (15). Les utérus arqués n’auraient
pas de conséquence sur la fertilité. Quant à l’ex-
position *in utero* au Distilbène® (diéthylstilbes-
trol ou DES), le taux de grossesse chutait de 33 à
18 % quand la mère avait été exposée au DES dans
l’étude de Bibbo *et al.* (16).
Kaufmann et Adam (17) ont établi le risque relatif
(RR) d’infertilité en fonction de l’anomalie retrou-
vée à l’hystérosalpingographie :
• utérus en T : $RR \times 1,49$;
• constriction supra-isthmique : $RR \times 2,26$;
• combinaison des deux anomalies : $RR \times 2,63$.
Le RR d’infertilité primaire serait multiplié par 1,3.
Lorsque des anomalies utérines sont associées, le
risque est multiplié par 7,7 et s’il existe des ano-
malies tubaires il serait de 2,4. Palmer *et al.* (18)
ont évoqué plusieurs étiologies pouvant expliquer
cette infécondité. Elles pouvaient être en rapport
avec les anomalies utérines elles-mêmes, les ano-
malies tubaires associées, les anomalies cervicales
ou inhérentes aux traitements chirurgicaux entre-
pris.



Fig. 1 – Utérus unicorne gauche avec trompe injectée (hystérosalpingogra-
phie, cliché de face).



Fig. 2 – Utérus bicorne unicervical avec une hypertrophie endométriale, les trompes ont une obstruction distale formant des hydrosalpinx sans plis
(hystérosalpingographie, cliché de face).

Complications obstétricales

Premier trimestre

Le taux de naissances vivantes varie en fonction
du type de malformation utérine pour Raga *et al.*
En effet, ce taux est de 62,5 % quand l’utérus est
bicorne et de 37-40 % lorsqu’il s’agit d’utérus uni-
cornes ou didelphes (4).
Dans la population des patientes ayant des faus-
ses couches précoces (FCS) à répétition dans leurs
antécédents, les malformations utérines étaient
plus fréquentes. Ainsi, Valli *et al.* rapportent un
taux de FCS de 32 % quand il y a de telles ano-
malies, alors que ce taux est de 6 % dans la population
témoin ($p < 0,001$) (5).
Concernant les utérus unicornes, le taux de FCS
a pu être estimé à 24,3 % des grossesses (19). Ce
taux pouvant être expliqué par la petite taille de
l’utérus ainsi que les troubles de la vascularisation

matricielle avec, en particulier, l'absence d'une des artères utérines.

Le taux de FCS, très élevé à 47 %, des utérus bicornes bicervicaux pouvait être mis sur le compte de l'hypoplasie utérine et de la béance cervicale souvent associée (6).

Les utérus DES seraient responsables de 18 et 25 % de FCS en fonction des séries, les anomalies de la vascularisation utérine pourraient en être une des explications.

Le taux de grossesses extra-utérines (GEU) serait également plus fréquent en cas de malformation utérine. Dans les utérus cloisonnés, le taux de GEU est estimé à 17,6 % mais rejoint le taux observé dans la population générale après section de cloison (17). Katz *et al.* rapportent des constatations similaires (21). Pour Heinonen, ce taux pourrait être plus élevé (22 %) en cas d'utérus unicorne avec un fort risque de GEU sur la trompe de la corne rudimentaire si elle existe et nécessitant alors une salpingectomie controlatérale prophylactique dans certains cas (22). Dans les utérus DES, le risque de GEU est également augmenté, pouvant varier de 3,4 % en procréation spontanée à 15 % (CNGOF), voire 29 % en cas d'AMP (23).

Deuxième et troisième trimestres

En présence d'une malformation utérine, les taux de fausse couche tardive, de menace d'accouchement prématuré (MAP), jusqu'à 44 %, d'accouchement prématuré, de présentation du siège, de pathologie vasculaire gravidique et de retard de croissance fœtal seraient significativement augmentés (24). Les explications avancées seraient l'hypoplasie utérine, l'incompétence cervicale, les défauts de perfusion placentaire en rapport avec des anomalies d'invasion trophoblastique ou de perfusion utérine et les anomalies fonctionnelles de l'utérus.

Airoidi *et al.*, à travers une étude prospective incluant 64 grossesses sur utérus malformés, rapportent un taux de MAP de 11 %, taux plus élevé lorsqu'il existait un utérus unicorne. Cette étude a documenté l'intérêt de réaliser une échographie du col utérin systématique entre 15 et 25 semaines d'aménorrhée lors de malformation utérine, avec une spécificité de 71 % et une sensibilité de 91 %. Lorsque le col mesurait moins de 25 mm, le risque de MAP était multiplié par 13 (50 vs 4 % quand le col était normal) (25).

Le taux de MAP est estimé entre 13 à 17 % dans les utérus DES, avec un risque de rupture prématuré des membranes également augmenté à 7,3 % dans ce cas alors qu'il est de 2,3 % dans la population générale. Le taux de pré-éclampsie serait également plus fréquent.

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) a été estimé à 5 % par Heinonen pour les utérus unicornes et à 11 % pour les utérus DES, du fait d'échanges placentaires inadaptés (22). Reichman *et al.* (19) rapportent un taux de 10,5 % de RCIU dans les utérus unicornes. La présence ou non d'une malformation rénale associée à la malformation utérine joue également un rôle dans la morbidité materno-fœtale. En effet, le taux d'hypertension artérielle (HTA) gravidique est plus fréquent lorsqu'il n'existe qu'un seul rein (22). Dans une publication ultérieure, ces mêmes auteurs ont déterminé que le taux d'HTA gravidique, de pré-éclampsie ou de protéinurie isolée passait de 18 %, lorsque les deux reins existaient, à 42 % lorsqu'un seul rein était présent (26).

Par ailleurs, plusieurs études ont insisté sur le risque de rupture utérine en cas de corne rudimentaire. Samuels *et al.* ont, par exemple, mis en garde les obstétriciens sur l'utilisation de prostaglandines chez ces patientes (27). De plus, la délivrance peut être pathologique dans les utérus DES dans 10,8 % des cas du fait d'anomalies de vascularisation et des antécédents de métroplastie à l'origine de lésions endométriales (28-30).

AMP

Aucune publication n'a rapporté de dysfonctionnement ovarien, quelle que soit la malformation utérine rencontrée. Ce constat s'explique aisément par les étapes de l'embryogenèse du tractus génital féminin. Dès lors que l'ovaire est présent, il est légitime de penser que ce dernier aura des fonctions endocriniennes et de production ovocytaire normales. Pour Kerjean *et al.*, il n'y a pas d'influence sur la qualité ovocytaire et la fécondance concernant les utérus DES (31).

Il semblerait également exister une altération du taux d'implantation embryonnaire, que ce soit pour les utérus unicornes ou bicornes, aux alentours de 5 % ; ces résultats pouvant être expliqués par la pathologie endométriale et la mauvaise vascularisation utérine (32). Dans une étude rétrospective incluant 17 femmes présentant des malformations utérines prises en charge en AMP pour FIV ou ICSI, Heinonen a montré que le taux d'implantation par embryon était diminué : 9,6 % quand l'utérus était unicorne, 5,9 % quand l'utérus était didelphe, alors que dans une population sans anomalie utérine ce taux est attendu autour des 10-15 % (6). Pourtant, eu égard au devenir du *conceptus*, certains auteurs ont préconisé une stimulation de l'ovulation mono- ou paucifolliculaire pour les inséminations intra-utérines, même si quelques articles montrent une évolution favorable de grossesses multiples (33).

Ces résultats initiaux sont confirmés par la série de Karande *et al.* L'exposition au DES altère les résultats de la FIV. Dans leur expérience, le taux de grossesse clinique par transfert était de 15,9 % (vs 22 % dans la population témoin), le taux de grossesse évolutive était de 8,8 % (vs 15,9 %). Ces auteurs ont rapporté un mauvais taux d'implantation embryonnaire alors que le nombre d'ovocytes recueillis, la qualité embryonnaire, le taux d'œstradiol et l'épaisseur endométriale au moment du déclenchement étaient comparables à la population témoin. Il existerait donc une réelle pathologie implantatoire : l'index de pulsatilité utérine reste faible et identique dans les deux phases du cycle alors que dans la population générale cet index diminue en phase lutéale. Les artères utérines seraient moins sensibles à l'action vasodilatatrice de l'œstradiol expliquant le défaut d'implantation et les fausses couches précoces (34).

Malformations utérines et chirurgie

La place de la chirurgie sera déterminée par l'absolue nécessité d'une évaluation du contexte de prise en charge de la patiente, c'est-à-dire s'il s'agit de la prise en charge d'une infertilité ou d'un défaut d'évolution de grossesse initiée. Une excellente connaissance des différentes malformations utérines, des limites des examens complémentaires non opératoires et des implications en fertilité spontanée et en fertilité médicalement assistée est indispensable. Les examens complémentaires, permettant de déterminer les indications chirurgicales, doivent être analysés au maximum de leur pouvoir diagnostique. L'association coelioscopie-hystérocopie permettra finalement un diagnostic précis, une évaluation pronostique ainsi qu'un possible geste thérapeutique. Toutes les données permettant de proposer une prise en charge sont issues de séries rétrospectives ou historiques.

Concernant l'aplasie utérine bilatérale, aucune prise en charge chirurgicale ne peut être proposée hormis une réfection vaginale lorsqu'il existe une aplasie vaginale associée. La transplantation utérine n'existant pas à ce jour, l'unique recours pour ces femmes serait de faire appel à un prêt d'utérus, ce qui est prohibé en France.

Concernant les utérus unicorues avec présence d'une corne rudimentaire controlatérale, le principal risque est le développement d'une grossesse dans la corne rudimentaire. Cette grossesse pourrait alors être confondue avec une grossesse siégeant dans l'hémi-utérus comportant un col et ne connaîtrait alors pour seule évolution possible qu'une rupture de l'hémi-utérus borgne. De ce fait, une résection de la corne rudimentaire et

de la trompe est recommandée par de nombreux auteurs.

Concernant les utérus bicornes uni- ou bicervicaux, la chirurgie réunificatrice des deux hémimatriques, décrite par Strassman en 1952, n'a démontré aucun bénéfice (35). En revanche, nous rappellerons l'intérêt dans ce cas du cerclage prophylactique, surtout en cas d'antécédent de fausse couche tardive ou d'accouchement prématuré. Le cerclage permet de diminuer le taux de MAP de 50 à 21 % pour Golan *et al.* (6). Pour Acien, il permettrait d'augmenter le taux de naissance vivante de 21 à 62 % (15).

Concernant les utérus cloisonnés (fig. 3), la septoplastie hystéroscopique représente une réelle solution afin d'améliorer le pronostic en termes de fertilité et d'évolutivité de la grossesse. La cure de cloison utérine semble intéressante afin d'optimiser l'implantation embryonnaire en fertilité spontanée.

Du fait de sa simplicité de réalisation, de sa faible morbidité par voie hystéroscopique et de l'arrivée de l'énergie bipolaire, plusieurs auteurs préconisent même de sectionner toute cloison utérine diagnostiquée, même sans aucun antécédent (20, 37). Pour les complications obstétricales, Bascko a rapporté que la cure de cloison améliorait nettement le pronostic obstétrical et le taux de naissances vivantes. Dans son expérience, le taux de FCS passe de 90 à 10-20 % après la chirurgie et le taux de MAP chute à moins de 20 % (38). Par ailleurs, Grimbizis *et al.* ont montré que la section de cloison permettait d'obtenir un taux d'accouchement à terme de 75 % et un taux de naissances vivantes de 85 % (39). On trouve également une amélioration significative du pronostic obstétrical pour Zabbak *et al.* (40), avec un taux de fausse couche passant de 79,6 à 16 %, un taux d'accouchements prématurés de 9,1



Fig. 3 – Utérus cloisonné, avec une cloison descendant du fond jusqu'à l'isthme utérin (hystérosalpingographie, cliché de trois quarts).

à 5,7 % et un taux d'accouchement à terme de 3,5 à 78,3 % après septoplastie utérine hystéroscopique. En AMP, le traitement chirurgical permet d'améliorer le taux d'implantation embryonnaire de 4,6 à 10,5 % et le taux de grossesse par transfert passe de 12,5 à 20 % (32). Une étude rétrospective récente rapporte une diminution du taux d'accouchements prématuré de 33,9 à 7,2 %, de l'extrême prématurité passant de 12,5 à 3,1 % après septoplastie hystéroscopique, même dans le cas des éperons fundiques (définis entre 1,3 et 1,5 cm) (41). Agostini (42), dans une étude rétrospective cas-témoin, a comparé le devenir obstétrical des patientes ayant eu une septoplastie hystéroscopique à des patientes à utérus sain. Il trouve un taux de malposition fœtale plus élevé, un poids de naissance plus faible et un taux de césarienne plus élevé de façon significative dans le groupe des patientes ayant eu une septoplastie utérine.

Concernant les utérus DES, la chirurgie d'agrandissement permettrait d'apporter une amélioration lorsqu'il existe une striction médiocavitaire et des fausses couches à répétition, voire lorsque aucune autre étiologie n'explique l'infertilité. Dans ces conditions, une métroplastie d'agrandissement permet de faire passer le taux de FCS de 88 à 12,5 % et le taux d'accouchement à terme de 3 à 87,5 % (43).

Conclusion

Les malformations utérines ne sont pas un événement rare dans la prise en charge de l'infertilité. Elles sont responsables de répercussions en fertilité spontanée et en fertilité médicalement assistée. Elles ont également des implications sur le devenir du *conceptus*. Le diagnostic précis et l'évaluation d'un pronostic obstétrical reposent sur des examens morphologiques et une exploration endoscopique par le couple hystéroscopie et cœlioscopie. Le traitement par voie endoscopique des utérus cloisonnés et des utérus DES semble apporter un réel bénéfice. Cependant, nous ne disposons d'aucune donnée prospective fiable.

Références

- Nahum GG (1998) Uterine abnormalities. How common are they and what is their distribution among subtypes? *J Reprod Med* 43: 876-87
- Porcu G, Heckenroth H (2005) Malformations utérines et infertilité. *Encycl Med Chir (Paris, Elsevier SAS) Gynécologie* : 739-A-20
- Pellicer A (1997) Shall we operate on mullerian defects? An introduction to the debate. *Hum Reprod* 12: 1371-2
- Raga F, Bauset C, Remohi J *et al.* (1997) Reproductive impact of congenital mullerian anomalies. *Hum Reprod* 12: 2277-81
- Valli E, Zupi E, Marconi D *et al.* (2001) Hysteroscopic findings in 344 women with recurrent spontaneous abortion. *J Assoc Gynecol Laparosc* 8: 398-401
- Heinonen PK (2000) Clinical implications of the didelphic uterus: long-term follow-up of 49 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 91: 183-90
- Acien P, Acien M, Sanchez-Ferrer M (2004) Complex malformations of the female genital tract. New types and revision of classification. *Hum Reprod* 19: 2377-84
- Buttram VC, Gibbons WE (1979) Mullerian anomalies: a proposed classification: an analysis of 144 cases. *Fertil Steril* 32: 40-6
- American Fertility Society (1988) American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancy, mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril* 49: 944-55
- Musset R, Belaich J (1964) Nécessité d'une classification globale des malformations utérines. In: XXII^{es} Assises françaises de gynécologie. Paris, Masson
- Saravelos SH, Cocksedge KA, Li TC (2008) Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Human Reprod Update* 14: 415-29
- Wu MH, Hsu CC, Huang KE (1997) Detection of congenital mullerian duct anomalies using three-dimensional ultrasound. *J Clin Ultrasound* 25: 487-92
- Alborzi S, Dehbashi S, Parsanezhad ME (2002) Differential diagnosis of septate and bicornuate uterus by sonohysterography eliminates the need for laparoscopy. *Fertil Steril* 78: 176-8
- Lin PC (2004) Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health* 13: 33-9
- Acien P (1993) Reproductive performance of women with uterine malformations. *Hum Reprod* 8: 122-6
- Bibbo M, Gill WB, Azizi F *et al.* (1977) Follow-up study of male and female offspring of DES-exposed mothers. *Obstet Gynecol* 49:1-8
- Kaufman RH, Adam E (2002) Findings in female offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Obstet Gynecol* 99: 197-200
- Palmer JR, Hatch EE, Rao RS *et al.* (2001) Infertility among women exposed prenatally to diethylstilbestrol. *J Epidemiol* 154: 316-2
- Reichman D, Laufer MR, Robinson BK (2009) Pregnancy outcomes in unicornuate uteri: a review. *Fertil Steril* 91: 1886-94
- Fedele L, Arcaini L *et al.* (1993) Reproductive prognosis after hysteroscopic metroplasty in 102 women: life-table analysis. *Fertil Steril* 59: 768-72
- Katz Z, Ben-Arie A, Lurie S *et al.* (1996) Beneficial effect of hysteroscopic metroplasty on the reproductive outcome in a "T-shaped" uterus. *Gynecol Obstet Invest* 41: 41-3
- Heinonen PK (1997) Unicornuate uterus and rudimentary horn. *Fertil Steril* 68: 224-30
- Pal L, Shifren JL *et al.* (1997) Outcome of IVF in DES-exposed daughters: experience in the 90s. *J Assist Reprod Genet* 14: 513-7
- Donderwinkel PF, Dorr JP, Willemsen WN (1992) The unicornuate uterus: clinical implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47: 135-9
- Airolidi J, Berghella V, Sehdev H, Ludmir J (2005) Transvaginal ultrasonography of the cervix to predict preterm birth in women with uterine anomalies. *Obstet Gynecol* 106: 53-6
- Heinonen PK (2004) Gestational hypertension and preeclampsia associated with unilateral renal agenesis in women with uterine malformations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 114: 39-43
- Samuels TA, Awonuga A (2005) Second-trimester rudimentary uterine horn pregnancy: rupture after labor induction with misoprostol. *Obstet Gynecol* 106: 1160-2

28. Cousins L, Karp W, Lacey C, Lucas WE (1980) Reproductive outcome of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Obstet Gynecol* 56: 70-6
29. Archer GE, Furlong LA (1987) Acute abdomen caused by placenta percreta in second trimester. *J Obstet Gynecol* 157: 146-7
30. Bellucci M, DiOrio J, Moubayed S (1987) Uterine inversion secondary to placenta accreta in a diethylstilbestrol-exposed parturient. A case report. *J Reprod Med* 32: 236-7
31. Kerjean A, Poirot C, Epelboin S, Jouannet P (1999) Effect of in-utero diethylstilbestrol exposure on human oocyte quality and fertilization in a programme of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14: 1578-81
32. Lavergne N, Aristizabal J, Zatzka V (1996) Uterine anomalies and in vitro fertilization: what are the results? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 68: 29-34
33. Nagra-Lynch M, Toffle RC (1997) Multiple gestation in a unicornuate uterus. A case report. *J Reprod Med* 42: 451-4
34. Karande VC, Lester RG *et al.* (1990) Are implantation and pregnancy outcome impaired in diethylstilbestrol-exposed women after in vitro fertilization and embryo transfer? *Fertil Steril* 54: 287-91
35. Strassman EO (1952) Plastic unification of double uterus: a study of 123 collected and five personal cases. *J Obstet Gynecol* 64: 25-37
36. Golan A, Langer R *et al.* (1992) Obstetric outcome in women with congenital uterine malformations. *J Reprod Med* 37: 233-6
37. Daly DC, Maier D, Soto-Albors C (1989) Hysteroscopic metroplasty: six year's experience. *Obstet Gynecol* 73: 201-5
38. Bacsko G (1997) Uterine surgery by operative hysteroscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 71: 219-22
39. Grimbizis GF, Camus M *et al.* (2001) Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment. *Hum Reprod Update* 7: 161-74
40. Zabak K, Benifla JL, Uzan S (2001) Septate uterus and reproduction disorders: current results of hysteroscopic septoplasty. *Gynecol Obstet Fertil* 29: 829-40
41. Tomazevic T, Ban-Franchez H *et al.* (2007) Small uterine septum is an important variable for preterm birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 135: 154-7
42. Agostini A, de Guibert F, Salari MD *et al.* (2009) Adverse obstetric outcomes at term after hysteroscopic metroplasty. *J Minim Invasive Gynecol* 16: 454-7
43. Garbin O, Ohl J, Bettahar-Lebugle K, Dellenbach P (1998) Hysteroscopic metroplasty in diethylstilbestrol-exposed and hypoplastic uterus: a report of 24 cases. *Hum Reprod* 13: 2751-5

J.-L. Benifla

Infertilité tubo-péritonéale

Introduction

Dans environ 30 % des cas, l'infertilité d'un couple est due à une altération tubaire proximale et/ou distale. Très rapidement, la coelioscopie opératoire a supplanté le recours à la laparotomie, devenant ainsi l'exploration chirurgicale référentielle de la pathologie tubo-péritonéale. Cependant, les résultats de la chirurgie tubaire, parfois très mauvais lors d'altérations tubaires importantes, ont mis légitimement cette chirurgie à l'écart au bénéfice de l'avènement des techniques de fécondation *in vitro* dans les années 1990. Aujourd'hui, les différents travaux récents sur l'effet délétère de la pathologie tubaire infectieuse en assistance médicale à la procréation (AMP) redonne un regain d'intérêt à l'exploration endoscopique opératoire du pelvis et, en particulier, des trompes lors de l'exploration d'un couple infertile.

Étiologie

L'origine infectieuse est la plus fréquente donnant plus de 80 % de lésions tubo-péritonéales. La salpingite aiguë est le plus souvent une infection sexuellement transmissible (85 % des cas) touchant généralement la femme jeune en âge de procréer (1). Dans 15 % des cas, elle survient suite à une manœuvre endo-utérine (curetage, hystérosalpingographie, hystérocopie, pose de dispositif intra-utérin – DIU). Elle correspond à une infection des trompes par voie ascendante. Parfois, la salpingite est la conséquence d'une appendicite par contiguïté ou, exceptionnellement, survient dans un contexte de septicémie, témoin d'une contamination par voie hématogène. Toutefois, il n'y a qu'un tiers des patientes qui possèdent des antécédents connus et relatés d'infection génitales hautes (2). Mais, l'antécédent de salpingite est significativement plus fréquent en cas d'infertilité tubo-péritonéale comparée à une population témoin (3). Les micro-organismes responsables d'infection tubaire sont représentés en majorité par *Chlamydiae trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et les germes aéro-anaérobies opportunistes. Mais c'est

surtout l'infection due à *Chlamydiae trachomatis* souvent pauci-symptomatique ou asymptomatique qui explique dans la plupart des cas l'existence d'altérations tubaires survenues à bas bruit.

Définition

Il faut distinguer dans les séquelles postinfectieuses tubo-péritonéales la pathologie adhérentielle (fig. 1), et la pathologie tubaire distale (fig. 2) de la pathologie tubaire proximale (fig. 3). Ainsi, le syndrome adhérentiel pelvien et l'occlusion tubaire qu'elle soit distale et/ou proximale sont souvent la conséquence d'une infection à point de départ génital ou parfois de proximité (péritonite appendiculaire). Rares sont les occlusions médio-tubaires qui s'observent généralement à la suite d'infections spécifiques comme la tuberculose (fig. 4) ou la bilharziose (fig. 5). Les altérations tubaires distales n'aboutissent pas toujours à l'occlusion complète de la trompe réalisant ainsi un phimosis infundibulaire (fig. 6). L'occlusion distale complète représente l'hydrosalpinx (fig. 7).

L'hystérosalpingographie (HSG) est l'examen qui permet d'apprécier le mieux la globalité et la fonctionnalité du trajet tubaire (brassage péritonéal du produit de contraste).

Diagnostic

L'hystérosalpingographie fait partie du bilan d'exploration d'un couple infertile. Elle doit être réalisée en 1^{re} partie de cycle, en dehors d'un contexte de grossesse ou d'infection. En dehors de l'allergie à l'iode, le risque principal de cet examen est représenté par la pelvipéritonite, survenant 24 à 48 heures après sa réalisation. Souvent, cette complication survient chez des patientes ayant une altération tubaire distale préexistante. Il est ainsi préférable de privilégier le contrôle tubaire endoscopique et d'éviter la réalisation d'une HSG chez ces patientes aux antécédents de pelvipéritonite. L'analyse

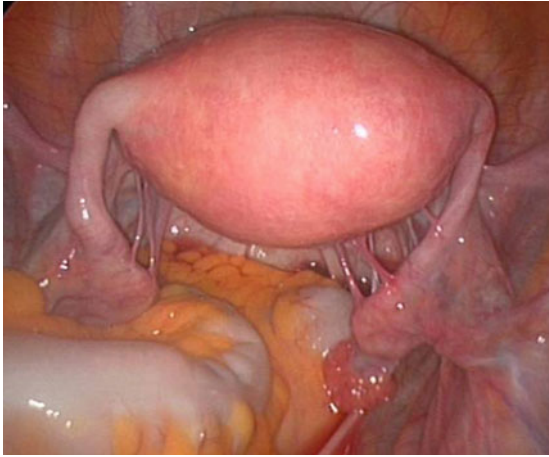


Fig. 1 – Pathologie adhérentielle pelvienne post-infectieuse.

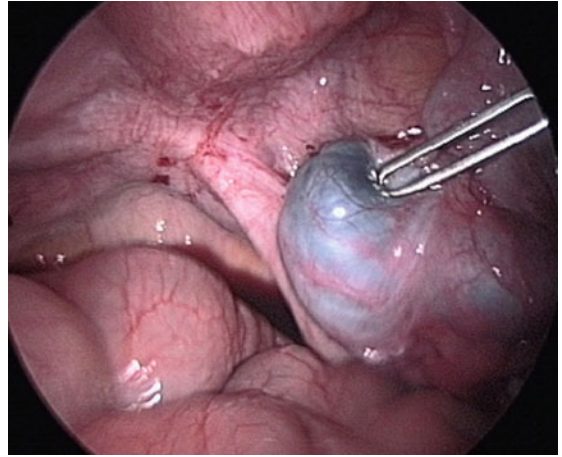


Fig. 2 – Pathologie tubaire distale avec présence d'un hydrosalpinx droit.

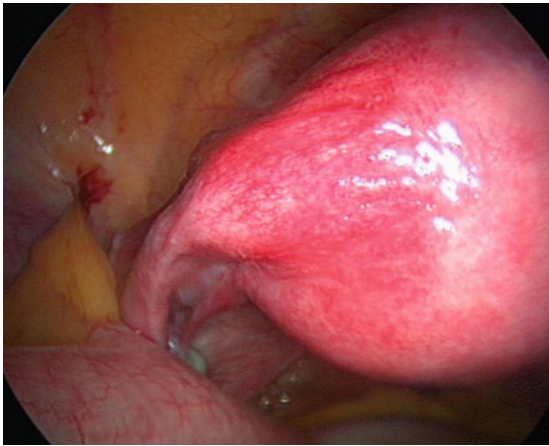


Fig. 3 – Atteinte tubaire cornuèle proximale postinfectieuse.

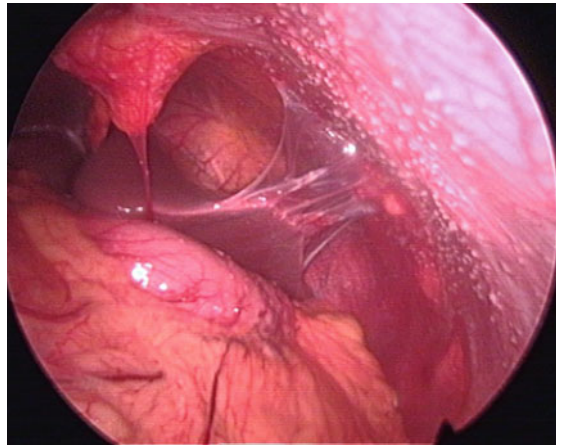


Fig. 4 – Aspect de pseudocarcinose péritonéale : miliaire tuberculeuse péritonéale.

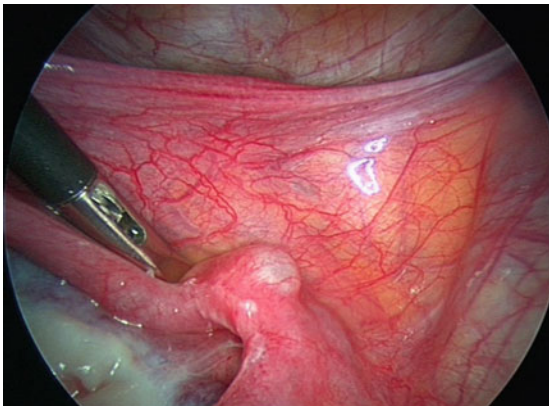


Fig. 5 – Lésion médiotubaire d'une bilharziose pelvienne.

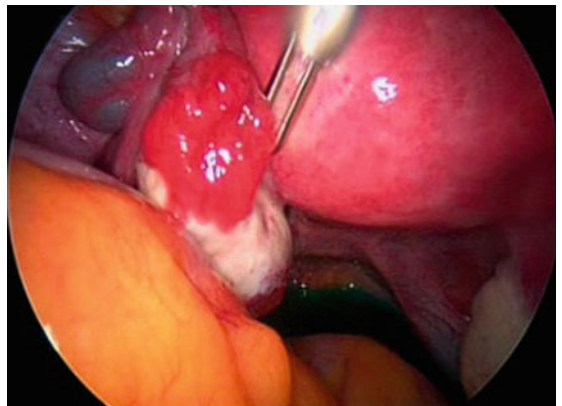


Fig. 6 – Phimosi tubaire gauche.

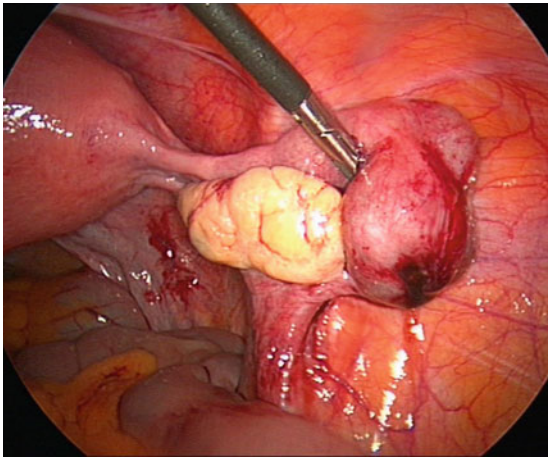


Fig. 7 – Aspect d'un hydrosalpinx droit.

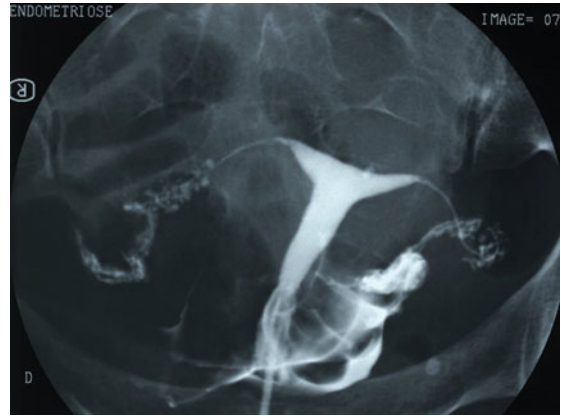


Fig. 9 – Représentation hystérosalpingographique d'une atteinte tubaire proximale souvent d'origine endométriosique : image en "boule de gui".



Fig. 8 – Suspicion d'une pathologie cornuë à l'hystérosalpingographie : arrêt bilatéral du produit de contraste.



Fig. 10 – Aspect à l'HSG d'un phimosis tubaire avec impression de trompe fixée sur tous les clichés.

des clichés radiologiques permet d'emblée de vérifier les bonnes conditions de réalisation : existence d'une traction cervicale permettant de mettre dans l'axe l'utérus, présence de clichés précoces en début de réplétion, présence de clichés en réplétion complète et enfin existence de cliché tardifs (au moins 20 minutes après le retrait du dispositif intra-utérin). Dans ces conditions, l'HSG permet d'objectiver une éventuelle lésion intracavitaire associée, un obstacle tubaire proximal et/ou distal, et l'état de la muqueuse tubaire, étant un élément essentiel du pronostic distal en matière d'infertilité.

Les occlusions proximales posent le problème diagnostique radiologique entre une réelle sténose orga-

nique et un spasme fonctionnel. Parmi les atteintes proximales, l'image d'arrêt à la corne du produit de contraste est celle qui se rencontre le plus souvent, ne permettant pas d'éliminer un facteur spastique fonctionnel (fig. 8). Parmi les lésions proximales, on distingue les images de polypes ostiaux visibles en HSG, qui seront confirmés en hystéroscopie. Mais ce sont surtout les images polydiverticulaires en « boule de gui », souvent bilatérale et siégeant à la jonction isthmo-interstitielle ou isthmique qui représentent la lésion caractéristique d'une atteinte organique de la trompe proximale d'origine infectieuse ou endométriosique (fig. 9).

La rétention distale du produit de contraste sur les clichés d'évacuation est souvent le témoin d'une oblitération partielle de la trompe ou phimosis (fig. 10). L'absence de brassage péritonéal

et la persistance d'une réplétion complète dans l'ampoule tubaire est le témoin d'un hydrosalpinx (fig. 11). La persistance des replis muqueux dans l'ampoule dilatée représente souvent un critère de bon pronostic en termes de fertilité (fig. 12) (4). En revanche, l'absence de plis muqueux ou l'existence d'images de déhiscence de la paroi tubaire seraient le témoin de l'altération de la muqueuse avec, par endroit, sa disparition totale. Cette situation est de mauvais pronostic, en termes de fertilité, y compris après réparation chirurgicale de l'hydrosalpinx. L'échographie pelvienne peut également faire suspecter un hydrosalpinx lorsqu'il existe des images trans-sonores un peu oblongues, liées à la dilatation tubaire. Ces images d'hydrosalpinx visibles à l'échographie endovaginale sont surtout le témoin d'altération tubaire distale chronique de mauvais pronostic (fig. 13).

Toutefois, il existe un certain nombre de faux positifs (30-40 %) à l'HSG (fig. 14) de l'interprétation d'une atteinte tubaire distale qui seront rattrapés par l'endoscopie de bilan légitime dans ce cas-là (5).

En revanche, dans ce contexte d'infertilité, la majorité des études montrent 30 à 50 % de faux négatifs de l'HSG (HSG normale), lorsque celle-ci est corrélée à la coelioscopie (6-8). En particulier, l'HSG n'est pas performante pour les lésions d'endométriose superficielle et les syndromes adhérentiels péri-tubo-ovariens sans hydrosalpinx. Ainsi, un débat existe toujours sur l'intérêt de la coelioscopie systématique dans l'exploration d'un couple infertile.

Altérations proximales

L'aspect d'un nodule cornual palpable en coelioscopie confirme l'atteinte proximale. Ces nodules cornuaux correspondent à un épaississement et une induration pariétale de la trompe (fig. 15). L'existence de nodules bleutés au niveau de la lésion cornuale fait fortement suspecter une étiologie endométriosique (fig. 16), d'autant qu'il existe d'autres localisations pelviennes de l'endométriose.

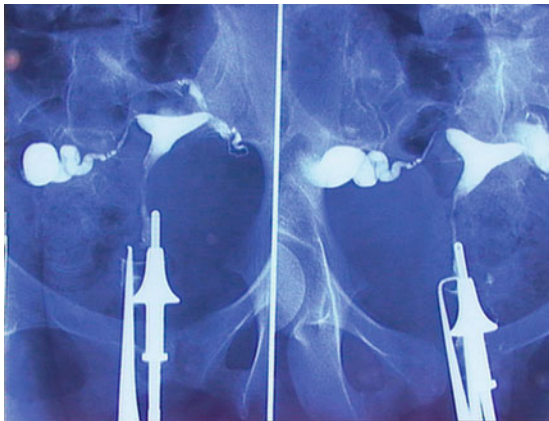


Fig. 11 – Diagnostic d'hydrosalpinx à l'HSG.



Fig. 12 – Hydrosalpinx avec persistance des plis muqueux visible à l'HSG.



Fig. 13 – Image classique d'hydrosalpinx à l'échographie.



Fig. 14 – Fausse image d'hydrosalpinx à l'HSG, infirmée lors de la coelioscopie de bilan.

Avant l'avènement de l'AMP, la reperméabilisation tubaire par microchirurgie laparotomique donnait des résultats encourageant allant jusqu'à plus de 50-60 % de grossesse à deux ans (9-11). Ce type d'anastomoses tubaires réalisées après stérilisations tubaires (fig. 17) donnait même de meilleurs résultats avec presque 70 % de grossesse à deux ans (12).

Toutefois, la complexité de cette technique chirurgicale et le succès de l'AMP ont relégué très rapidement au second plan la réalisation de ce type d'intervention. Longtemps considéré comme relevant de la laparotomie, ce type d'intervention est actuellement possible par coelioscopie dans des mains entraînées. Koh a été le premier à proposer une technique de microchirurgie reproduite en coelioscopie imposant un matériel adapté et donnant sur une série de 31 patientes un taux de grossesse de 71 % à un an (13). Dubuisson, proposant une amélioration de la technique en utilisant le concept de Swolin (14) de reperméabilisation endoscopique à un seul fil, rapporte un taux de grossesse à plus

de 50 % (15). Le tableau I représente une revue de la littérature comparative de réperméabilisation tubaire laparotomique *versus* coelioscopique comportant au moins un effectif conséquent. Finalement, à la lecture de cette revue, la plastie tubaire proximale donne des résultats en moyenne à plus de 50 % de grossesse à deux ans et devrait être aujourd'hui réintroduite comme une des possibilités thérapeutiques de l'infertilité tubaire proximale au même titre que l'AMP sans s'y opposer. En effet, la synergie de ces deux prises en charge augmente les chances de succès de grossesse (16). Ainsi, avant 35-36 ans la microchirurgie tubaire proximale serait plus légitime que l'AMP en première

Tableau I – Revue de la littérature de reperméabilisation tubaire proximale laparotomique *versus* coelioscopique.

Auteurs, année	Nbre	TG (%)	GEU (%)
<i>Microchirurgie laparotomique</i>			
Grant, 1971	73	34	4
Diamond, 1979	31	42	16
Rock, 1979	52	25	4
Winston, 1980	43	NA	2
Gommel, 1983	48	70	6
Donnez, 1987	82	61	7
Dubuisson, 1997	120	74	11
Total	449	51	7
<i>Microchirurgie coelioscopique</i>			
Dubuisson, 1998	32	53	NA
Yadav, 1998	58	62	6
Koh, 1999	31	71	1
Bisonette, 1999	102	63	5
Yoon, 1999	202	76	2
Mettler, 2001	28	54	7
Cha, 2001	37	76	3
Ribeiro, 2004	23	57	0
Total	513	73	3,4

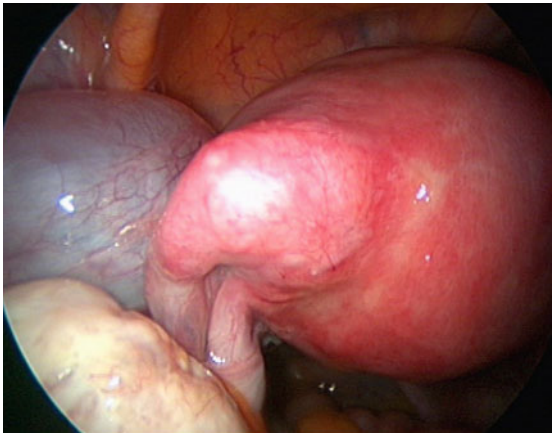


Fig. 15 – Aspect coelioscopique d'une atteinte proximale cornuale.

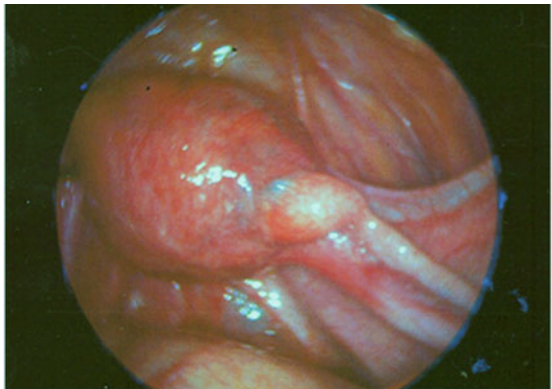


Fig. 16 – Sténose cornuale droite. L'aspect bleuté de la lésion fait suspecter une origine endométriosique.

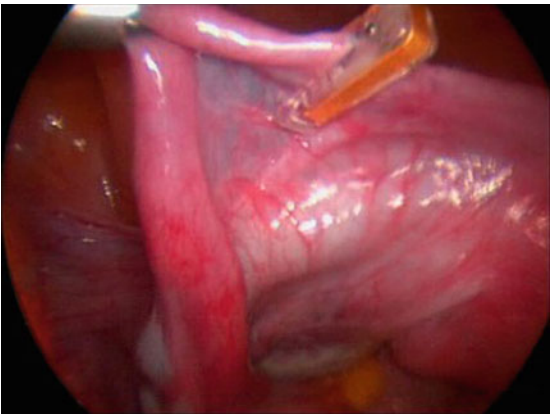


Fig. 17 – Ligature tubaire par clip.

intention. Cette limite d'âge devrait être repoussée à 40 ans dans les cas de stérilisation tubaire, où l'existence de trompes saines est un facteur de bon pronostic (17). L'apparition récente de systèmes robotisés apporte vraisemblablement une alternative d'avenir pour la réparation spécifique de l'atteinte tubaire proximale (18, 19), mais cette option pose le problème financier de l'investissement et de l'amortissement du matériel. Récemment, quelques études comparatives à la laparotomie ont montré une certaine équivalence dans le geste opératoire lors de l'utilisation de la robotique dans la réparation tubaire proximale (20, 21). Le principal avantage étant la période postopératoire lors de l'utilisation du robot endoscopique par rapport à la laparotomie. La plastie tubaire proximale pourrait être vraisemblablement une des indications légitime de la robotique, en matière d'infertilité.

Altérations distales

En ce qui concerne les altérations distales, elles sont les plus fréquentes dans le contexte de l'infertilité et l'atteinte tubaire est souvent bilatérale. Il faut distinguer trois types d'altérations : un syndrome adhérentiel péritubo-ovarien ayant souvent comme représentation radiologique des trompes perméables semblant fixées sur tous les clichés, avec parfois des images de rétention correspondant à des poches péritonéales ; un phimosis tubaire suspecté par un défaut de brassage péritonéal à l'HSG ; et à un stade plus avancé une occlusion complète de la trompe, dont l'image classique est celle de l'hydrosalpinx : dilatation tubaire distale. Le corolaire de ce diagnostic d'altérations distales impose de réaliser dans un premier temps opératoire une adhésiolyse complète du pelvis avant la réalisation du geste endoscopique tubaire : une fimbrioplastie (fig. 18) en cas de phimosis tubaire et une néosalpingostomie ou salpingectomie en cas d'hydrosalpinx.

S'il y a bien un domaine où l'expérience de l'opérateur prend tout son sens, c'est bien celui de la chirurgie de l'infertilité tubaire, tant dans l'appréciation macroscopique de la muqueuse tubaire, que dans la décision de réaliser une néosalpingostomie avec éversion du pavillon, que dans la décision peropératoire de salpingectomie radicale. Bien sûr, la chirurgie tubaire a évolué avec son temps : après la laparotomie, elle est devenue endoscopique pour être finalement reléguée au 2^e plan devant la généralisation des très bons résultats de l'AMP. Ceci était une erreur, car nous savons aujourd'hui que l'existence d'une pathologie tubaire, en particulier l'hydrosalpinx, est un facteur de mauvais pronostic des résultats de la fertilité spontanée et/ou médi-

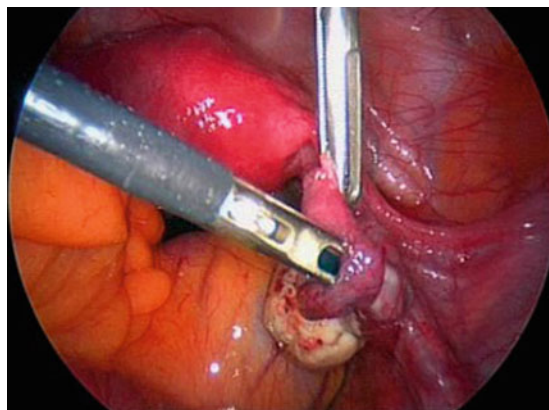


Fig. 18 – Fimbrioplastie à l'aide d'une pince endoscopique atraumatique introduite dans l'orifice distal tubaire.

calement assistée. La chirurgie tubaire doit être désormais intégrée à l'histoire individuelle de la patiente, ou du couple, en tenant compte de son âge et doit faire partie intégrante d'une stratégie thérapeutique combinant éventuellement l'AMP. La chirurgie tubaire et l'AMP ne doivent plus s'opposer, elles devraient être systématiquement complémentaires dans cette stratégie actuelle. Ainsi, le principal critère pronostique reste l'appréciation de la muqueuse tubaire orientant la décision peropératoire entre la réparation tubaire ou le traitement radical.

Facteurs pronostiques de la chirurgie tubaire distale

Parmi les facteurs pronostiques, il faut distinguer les classifications qui apportent une aide à l'évaluation de la muqueuse tubaire des autres scores d'opérabilité ou adhérentiels. La sévérité de l'atteinte tubaire est généralement appréciée par le score tubaire distal français (tableau II), la classification de Boer-Meisel (tableau III) et la classification de Brossens (tableau IV).

La disparition des plis muqueux, l'existence de synéchies intratubaires, l'altération de plus de 50 % de la muqueuse tubaire sont des critères importants de mauvais pronostic. Certains auteurs ont même proposé l'évaluation en microsalpingoscopie de la pigmentation cellulaire après injection de bleu de méthylène (22). Une fixation pycnotique du colorant serait de mauvais pronostic, en particulier avec une muqueuse tubaire paraissant correcte, lors de l'exploration du pelvis par fertioscopie (23).

Finalement, ces classifications représentent le reflet de l'expérience du chirurgien face à la simple estimation visuelle de l'état de la muqueuse tubaire en coelioscopie ou lors d'une salpingoscopie. Elles sont finalement peu utilisées de façon stricte et s'interprètent aujourd'hui comme un système

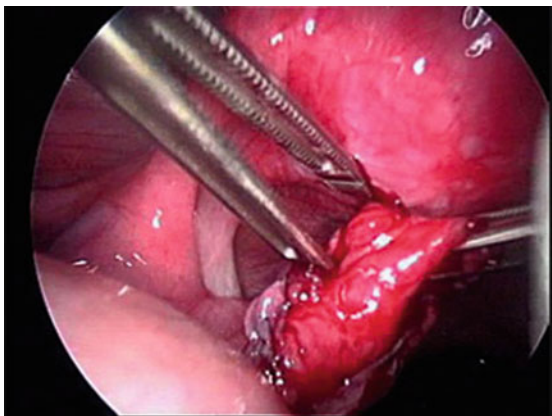


Fig. 19 – Évaluation d'une muqueuse tubaire normale.

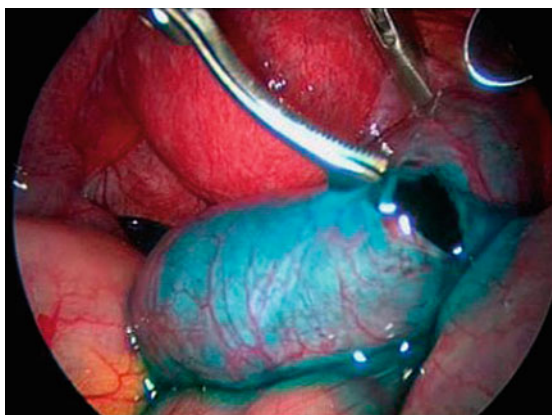


Fig. 20 – Hydrosalpinx à muqueuse altérée atrophique.

inaire : la présence de pli muqueux (fig. 19) favorisera la réparation tubaire ; l'absence complète de plis (fig. 20) imposera le geste radical. D'autres critères interviennent dans le mauvais pronostic : l'existence d'une périhépatite, le caractère bifocal des lésions tubaires (proximales et distales) et l'étendue sévère d'un syndrome adhérentiel pelvien. De nombreuses classifications ont été proposées (24), mais c'est sûrement celle de l'American Fertility Society (AFS) (25) qui est la plus utilisée (tableau V), permettant d'approcher un score adhérentiel pronostique. Bien que cette classification américaine ne soit pas parfaite, elle a le mérite d'avoir montré qu'un stade adhérentiel sévère et/ou un stade évolutif infectieux étaient des éléments de mauvais pronostic.

Adhésiolyse pelvienne et plastie tubaire distale

L'adhésiolyse représente le premier temps opératoire avant une quelconque réparation tubaire. Les adhérences postinfectieuses, postopératoires

Tableau II – Score tubaire distal français.

Score	0	2	5	10
Plis muqueux à l'HSG	Conservés		Diminués	Absents
Paroi muqueuse à la coelioscopie	Normale		Fine	Épaisse ou rigide
Perméabilité tubaire à la coelioscopie	Normale	Phimosi	hydrosalpinx	
	Stade I : 2-5	Stade II : 6-10	Stade III : 11-15	Stade IV : > 15

Tableau III – Classification de Boer-Meisel.

Groupes	Aspect de la muqueuse
Groupe I	Muqueuse normale, plis réguliers
Groupe II	Atteinte modérée de la muqueuse : alternance de zones normales et de zones avec absence de plis muqueux
Groupe III	Muqueuse très altérée avec absence de plis Présence d'adhérences intratubaires

Tableau IV – Classification de Brossens.

Score tubaire de la salpingoscopie	
Grade I	Aspect normal des plis
Grade II	Aplatissement des plis
Grade III	Adhérences fines intratubaires
Grade IV	Synéchie de la lumière tubaire
Grade V	Fibrose des plis

Tableau V – Score adhérentiel de l'American Fertility Society (AFS).

Organes	Type d'adhérences	Surfaces d'adhérences		
		1/3	2/3	Totale
Ovaires	Voile	1	2	4
	Dense	4	8	16
Trompe distale	Voile	1	2	4
	Dense	4	8	16
		Stade minime : 1-6	Stade moyen : 5-15	Stade sévère : ≥ 16

et/ou d'origine endométriosique peuvent grever le pronostic de fertilité. L'adhésiolyse a pour rôle de redonner une anatomie fonctionnelle et une mobilité normale à l'annexe, avant d'entreprendre un geste éventuel sur la trompe. En ce qui concerne les adhérences pelviennes pérutéro-ovariennes, elles doivent être recherchées avec

minutie (fig. 21, 22, 23). L'adhésiolyse doit être effectuée en sectionnant les adhérences aux ciseaux endoscopiques, car souvent lâches et avasculaires. Parfois, l'utilisation de la coagulation bipolaire est nécessaire face à des adhérences denses et très vasculaires. Ainsi, il n'est pas rare également de libérer l'ovaire de sa fossette ovarienne, l'accolement étant dû à la présence d'adhérence intime postinfectieuse, voire post-chirurgicale (chirurgie de l'ovaire, ponction ovarienne par voie vaginale). Pour certains, une résection plutôt qu'une section des adhérences, la plus extensive possible, semble légitime pour diminuer le risque de récurrence.

L'adhésiolyse complète du pelvis est vraisemblablement le geste opératoire le plus bénéfique en matière d'infertilité tubo-péritonéale. En effet, la revue épidémiologique rétrospective effectuée en 1995 par Daya (26) sur la chirurgie distale montre de meilleurs résultats en termes de grossesse pour l'adhésiolyse pelvienne par rapport au geste spécifique de la réparation tubaire (tableau VI).

L'analyse des différentes séries rapportées dans la littérature montre des résultats similaires lorsque l'acte chirurgical est réalisé en coelioscopie. Ainsi, l'adhésiolyse annexielle coelioscopique montre un taux moyen de grossesse supérieur à 45 %, avec un risque de grossesse extra-utérine (GEU) aux alentours de 6 %. Le tableau VII rapporte les principaux résultats des séries de la littérature d'adhésiolyse pelvienne.

Ces bons résultats en termes de grossesse postopératoires incitent à proposer une exploration endoscopique du pelvis la plus exhaustive possible. C'est la raison pour laquelle il semble également indispensable, lors de l'exploration endoscopique pelvienne, de ne pas négliger l'existence d'un syndrome adhérentiel péri-tubo-ovarien, car c'est vraisemblablement ce geste d'adhésiolyse qui apportera les meilleurs résultats ultérieurs en termes de fertilité spontanée. Ainsi, l'exploration pelvienne ne devrait pas se contenter uniquement de la fertiloscopie, même si cette technique chirurgicale apparaît comme de moindre contrainte par rapport à la coelioscopie de bilan. Plusieurs études (27, 28) ont bien montré que la fertiloscopie n'était pas pertinente pour l'exploration d'adhérences péri-tubo-ovarienne et pour l'endométrieose minime. Si le débat reste controversé sur la relation entre endométrieose superficielle et infertilité, il n'en est rien vis-à-vis de l'intérêt de l'adhésiolyse pelvienne. Pour cette raison principale, le contrôle pelvien devrait être réalisé de façon systématique par coelioscopie.

La chirurgie tubaire est surtout représentée par la néosalpingostomie où le facteur pronostique va dépendre de l'état de la muqueuse tubaire. Le tableau VIII rapporte les principaux résultats des

différentes équipes ayant pris en charge la réparation tubaire par endoscopie.

Deux notions sont à prendre en considération lors de l'analyse des résultats de la chirurgie tubaire distale : l'état de la muqueuse et le délai d'obtention des grossesses. En effet, le taux de grossesse

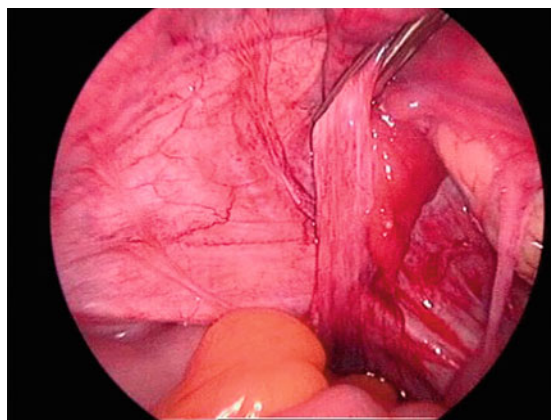


Fig. 21 – Adhérence pelvienne imposant sa section afin de libérer la trompe pour lui redonner une position anatomique fonctionnelle.

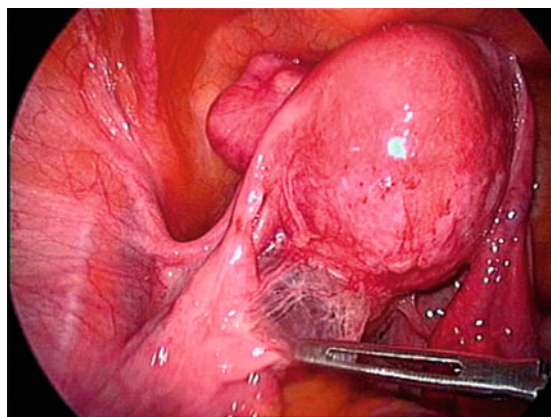


Fig. 22. – Syndrome adhérentiel important d'origine infectieuse.



Fig. 23. – Adhérence péri-tubo-ovarienne : importance de leur libération.

Tableau VI – Revue épidémiologique de la chirurgie tubaire distale par laparotomie. D'après Daya (26).

Geste opératoire	Nbre	GIU (nbre, %)	GIU (nbre, %)	FCS (nbre, %)
Adhésiolyse	379	174 (46 %)	16 (4 %)	21 (6 %)
Fimbrioplastie	707	216 (31 %)	71 (10 %)	35 (5 %)
Salpingostomie	1 128	1 128 (20 %)	87 (8 %)	55 (5 %)

Tableau VII – Évaluation de la fertilité après salpingo-ovariolyse pelvienne coelioscopique.

Auteurs, année	Nbre	GIU (nbre, %)	GEU (nbre, %)
Mintz, 1975	55	26 (47 %)	3 (11 %)
Palmer-Madelenat, 1979	144	42 (29 %)	11 (7,6 %)
Henry-Suchet, 1979	38	16 (42 %)	1 (2,6 %)
Mettler, 1979	44	13 (29 %)	ND
Bruhat, 1980	93	48 (52 %)	7 (7,5 %)
Abeille, 1981	19	7 (37 %)	3 (15 %)
Audebert, 1983	50	15 (30 %)	0
Fayez, 1983	49	23 (47 %)	2 (4 %)
Gomel, 1983	92	57 (62 %)	5 (5,4 %)
Reich, 1987	27	22 (81 %)	1 (4 %)
Tulandi, 1987	63	33 (52 %)	3 (4,7 %)
Donnez, 1989	186	108 (58 %)	ND
Aubriot, 1990	49	26 (53 %)	5 (10 %)
Madelenat, 1996	37	16 (44,4 %)	ND
Popovic, 2005	26	8 (30 %)	ND
Total	972	460 (47,3 %)	41/679 (6 %)

ne dépasse pas 8-10 % lorsqu'il s'agit d'une plastie tubaire distale sur un hydrosalpinx à muqueuse non conservé ou scléro-atrophique (tableau IX). Avant de soupçonner l'effet délétère de l'hydrosalpinx en AMP, qui est aujourd'hui reconnu, il était classique d'orienter plus rapidement les patientes en AMP, leur évitant une chirurgie de trop ou de plus ! Ceci explique certainement le recul de la place de la chirurgie tubaire dans les années 1990-2000, face au développement des différentes techniques prometteuses de l'AMP. Cette notion est actuellement remise en cause.

Seule la vision endoscopique de la muqueuse tubaire distale permet d'évaluer le pronostic, ce qui signifie qu'il faut ouvrir les hydrosalpinx avant de décider d'un quelconque geste chirurgical. Là encore, l'évaluation correcte d'une trompe occluse ne peut se faire qu'après l'injection de bleu de méthylène, qui va objectiver la dilatation tubaire en différenciant un phimosis d'un réel hydrosalpinx (fig. 24).

Cette dilatation tubaire facilitera le geste chirurgical d'ouverture à l'aide des ciseaux endoscopiques (fig. 25).

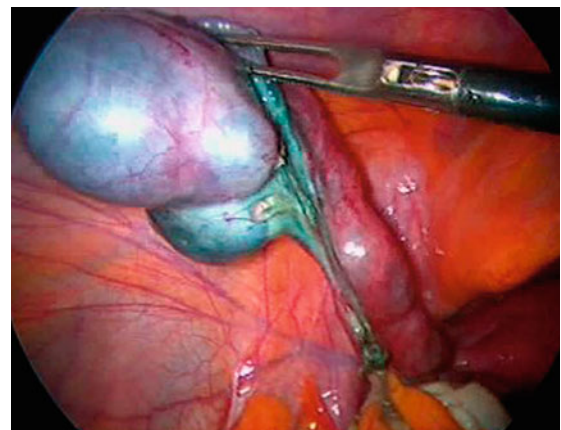
Aujourd'hui, la majorité des équipes évalue de façon macroscopique en peropératoire la muqueuse

Tableau VIII – Évaluation de la fertilité après néosalpingostomie coelioscopique.

Auteurs, année	Nbre	Taux d'accouchement (nbre, %)
Daniell, 1984	21	4 (19 %)
Nezhat, 1984	33	12 (36 %)
Bouquet, 1987	20	5 (25 %)
Reich, 1987	7	2 (29 %)
Manhes, 1987	19	9 (48 %)
Dubuisson, 1990	31	8 (31 %)
Larue, 1990	15	3 (20 %)
Henry-Suchet, 1991	28	9 (32 %)
McComb, 1991	22	5 (22,7 %)
Matvienko, 1991	50	24 (48 %)
Canis, 1991	87	29 (33,3 %)
Audebert, 1992	142	30 (20,4 %)
Donnez, 1994	85	23 (27 %)
Madelenat, 1996	67	18 (26,4 %)
Total	627	181 (29 %)

Tableau IX – Évaluation pronostique de la néosalpingostomie. (Résultats de la majorité des équipes françaises, Audebert, 1992 ; Canis, 1991 ; Dubuisson, 1994 ; Erny, 1993 ; Madelenat, 1996.)

	A	B	C	D	E
Taux de grossesse (%)					
Stades I & II	27,4	40,5	55,5	34,4	44,2
Stades III & IV	11,9	5,5	6,9	0	8,8
Délai (grossesse, mois)	6-12	-	12	< 16	12-18

**Fig. 24** – Épreuve au bleu objectivant l'hydrosalpinx.

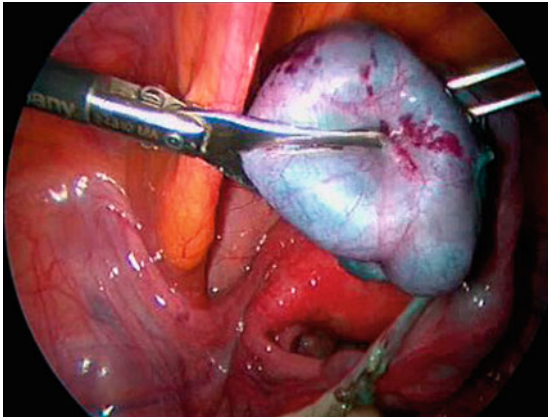


Fig. 25. — Ouverture de l'hydrosalpinx au ciseau endoscopique.

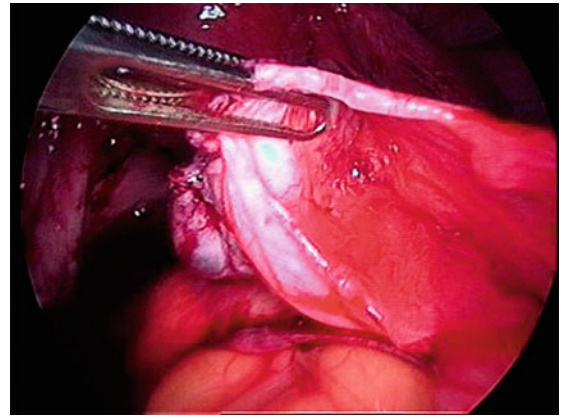


Fig. 26 — Néosalpingostomie, avec vérification de la muqueuse tubaire qui, ici, est correcte.

tubaire distale après ouverture de l'hydrosalpinx. L'hydrosalpinx à muqueuse conservée devrait être réparé : néosalpingostomie (fig. 26, 27).

L'hydrosalpinx avec disparition complète de la muqueuse ou l'existence d'une muqueuse sclérotrophique, avec par endroit une abrasion complète et l'existence de synéchies intraluminales, impose son retrait (fig. 28). Ceci signifie qu'au préalable la patiente a reçu l'information d'une possible salpingectomie.

D'autre part, la majorité des grossesses surviennent dans l'année qui suit la chirurgie tubaire (tableau IX). Pour certains auteurs, le taux cumulé de grossesse intra-utérine atteint plus de 50 % après fimbrioplastie (29), et ne dépasse pas 20 % après néosalpingostomie (30), il est dû à l'existence de facteurs qui augmentent le risque de GEU aux alentours de 15 % : antécédent de salpingite, existence d'une périhépatite ou caractère bilatéral de la réparation tubaire. Même si les résultats globaux d'une plastie tubaire distale à muqueuse conservée apparaissent plus faibles (30-40 %) qu'après une adhésiolyse pelvienne simple (40-50 %), ils sont toutefois assez proches de ceux obtenus après AMP. Ainsi, la décision de réparation tubaire devrait s'intégrer dans une même et unique stratégie de prise en charge du couple infertile. L'acte chirurgical devrait intervenir le plus tôt possible dans l'histoire de ce couple, quels que soient les autres facteurs d'infertilité associés, puisque les résultats de cette chirurgie endoscopique surviennent à moyen terme (un an).

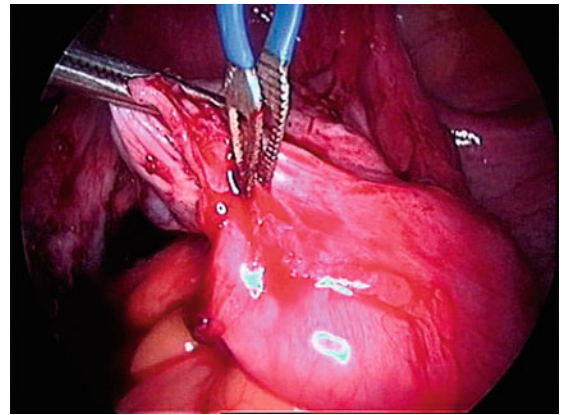


Fig. 27 — Éversion de cette néostomie à l'aide de point de coagulation bipolaire à distance de l'ouverture sur la séreuse tubaire.

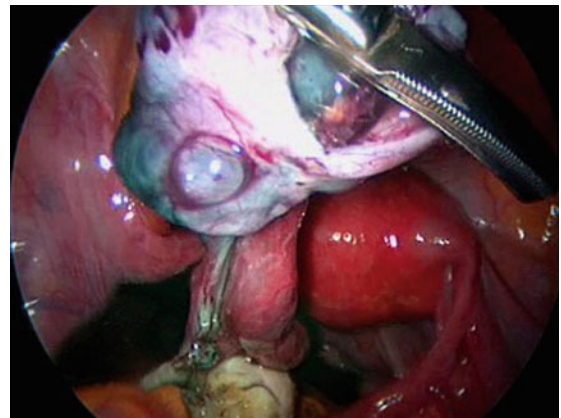


Fig. 28 — Hydrosalpinx de mauvais pronostic imposant son ablation.

Effet délétère des hydrosalpinx sur la fertilité

L'effet délétère des hydrosalpinx (HDX) sur les résultats de l'AMP a été suspecté dès 1994 (31-33). La présence d'hydrosalpinx diminue l'implantation embryonnaire, augmente le risque de fausse cou-

che spontanée et diminue le taux d'accouchement respectivement de 18,2 %, à 15,1 %, et à 6,6 %, chez patientes en AMP, ayant soit des trompes normales, soit des trompes altérées sans hydrosalpinx, soit des hydrosalpinx (31). Ces premiers résultats

ne prouvaient pas que le retrait de l'hydrosalpinx était bénéfique pour l'AMP. L'étude randomisée et multicentrique de la même équipe a permis par la suite de valider cette hypothèse, où la salpingectomie pour hydrosalpinx améliore considérablement les résultats de l'AMP (34). L'existence de défauts muqueux dans l'ampoule et/ou d'adhérences intratubaires sont des critères de mauvais pronostic, rendant licite la réalisation d'une salpingectomie (fig. 29). Ceci signifie qu'au préalable la patiente a reçu l'information d'une possible salpingectomie. La présence d'hydrosalpinx bilatéraux complique considérablement la décision peropératoire.

L'évaluation de l'infertilité du couple et de son parcours prend ici toute sa valeur, où nous recommandons dans un premier temps la conservation et la néosalpingostomie unilatérale, la trompe paraissant la plus satisfaisante étant conservée. En revanche, l'absence totale de muqueuse de façon bilatérale devrait imposer la réalisation d'une salpingectomie bilatérale, d'autant que l'âge de la patiente est supérieur à 35 ans. Ainsi, la salpingectomie pour hydrosalpinx à muqueuse non conservée est devenue une recommandation positive avant l'AMP pour la plupart des auteurs (35, 36), y compris lorsqu'il s'agit de récurrence d'hydrosalpinx. En effet, la récurrence d'hydrosalpinx après néostomie sur une trompe très altérée de mauvais pronostic est d'environ 70 % (37) pour un taux de grossesse (GEU comprise) ne dépassant pas 7,5 %. L'effet négatif sur la fertilité a été rapidement rapporté à un effet toxique du liquide d'hydrosalpinx sur la croissance embryonnaire (38) et sur l'implantation par perturbation de différentes molécules : Hoxa10, intégrine $\alpha\beta_3$ et LIF (39-41). Certains ont même rapporté que le reflux du liquide d'hydrosalpinx vers la cavité utérine empêchait l'implantation embryonnaire (42). Ainsi, l'hypothèse de l'effet toxique du liquide d'hydrosalpinx explique

également l'amélioration de la fertilité spontanée après salpingectomie pour hydrosalpinx unilatéral avec trompe controlatérale normale (43-45).

Si la salpingectomie représente aujourd'hui le traitement de référence de l'hydrosalpinx, elle peut s'avérer difficile dans des circonstances d'hydrosalpinx géant avec syndrome adhérentiel sévère (fig. 30) ou chez des patientes à risque chirurgical endoscopique (patientes multi-opérées, obésité morbide).

La ponction sous antibiotique ne semble pas améliorer les résultats de l'AMP par rapport à un groupe contrôle non ponctionné (46). L'interruption entre la trompe et la cavité utérine reste cependant essentielle. Si la salpingectomie s'avère difficile en peropératoire, il faut réaliser au minimum une ligature/section de la partie proximale de la trompe. Certains auteurs ont même récemment proposé l'utilisation du système Essure® pour l'occlusion proximale des trompes en cas d'hydrosalpinx (47, 48).

Enfin, si la salpingectomie est le traitement de référence de l'hydrosalpinx à muqueuse non conservée, il est clairement établi que la chirurgie radicale tubaire n'a pas ou peu d'effet délétère sur la fonction ovarienne. La réponse ovarienne semble identique avant ou après salpingectomie, qu'elle soit réalisée pour GEU (49) ou hydrosalpinx (50).

Place actuelle de la chirurgie tubaire distale en infertilité

L'âge des patientes et l'intégrité de la cavité utérine représentent les deux seuls facteurs pronostiques qui comptent pour la fertilité (51, 52). L'augmentation actuelle de l'âge en AMP où plus de 50 % des patientes ont plus de 35 ans (53) et l'apparition de critères de mauvais pronostic dès cette période (diminution de l'AMH et du compte de follicule

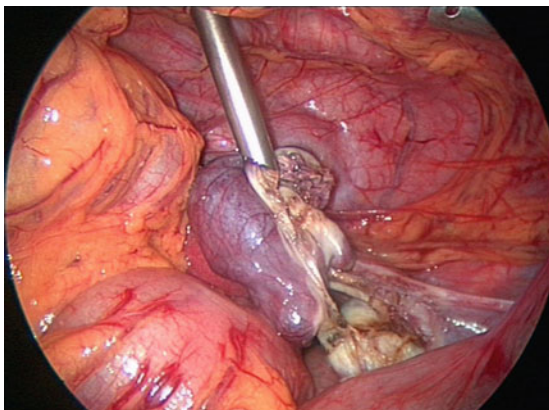


Fig. 29 – Réalisation d'une salpingectomie pour hydrosalpinx.

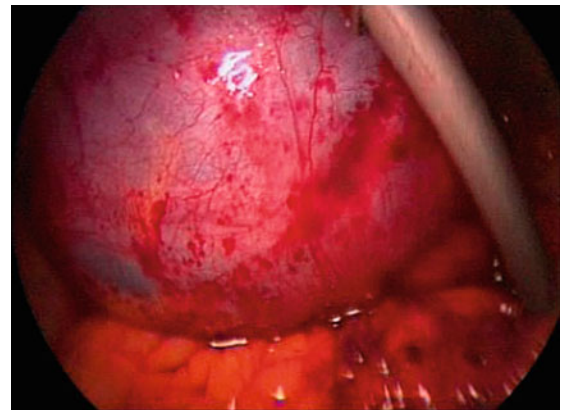


Fig. 30 – Aspect d'hydrosalpinx géant, où la réalisation d'une ligature section pourrait être préférée à la salpingectomie après avoir ouvert l'hydrosalpinx.

antraux) rend encore plus légitime aujourd'hui l'exploration chirurgicale tubaire réparatrice et/ou radicale. La preuve incontestée de l'effet délétère des hydrosalpinx, tant sur la fertilité spontanée que médicalement assistée, redonne également un certain regain d'intérêt à cette chirurgie tubaire qui devient indiscutable, permettant d'éviter de faire perdre du temps aux patientes et de les précipiter plus rapidement dans la voie thérapeutique qu'elles devraient prendre. Bien sûr, hydrosalpinx ne signifie pas salpingectomie systématique. Seule l'exploration macroscopique de la muqueuse tubaire distale a un réel intérêt pronostique. Mais, il est fini le temps où l'on pensait de façon licite que l'AMP pouvait

remplacer la chirurgie. Aujourd'hui, elle doit s'inscrire dans une stratégie d'évaluation de l'infertilité du couple, incluant l'assistance médicale à la procréation et que les deux attitudes thérapeutiques soient complémentaires, quel que soit l'âge. Ainsi, les attitudes thérapeutiques peuvent être différentes, même en présence d'hydrosalpinx. La réparation tubaire associée à une expectative d'au moins un an peut se concevoir chez des patientes de moins de 30 ans, alors qu'une potentialisation des effets de l'AMP et la chirurgie tubaire sont indéniables après 30 ans. Enfin, l'existence d'hydrosalpinx à muqueuse non conservée impose son ablation. Il peut être logique, là encore en fonction de l'âge, d'éviter une

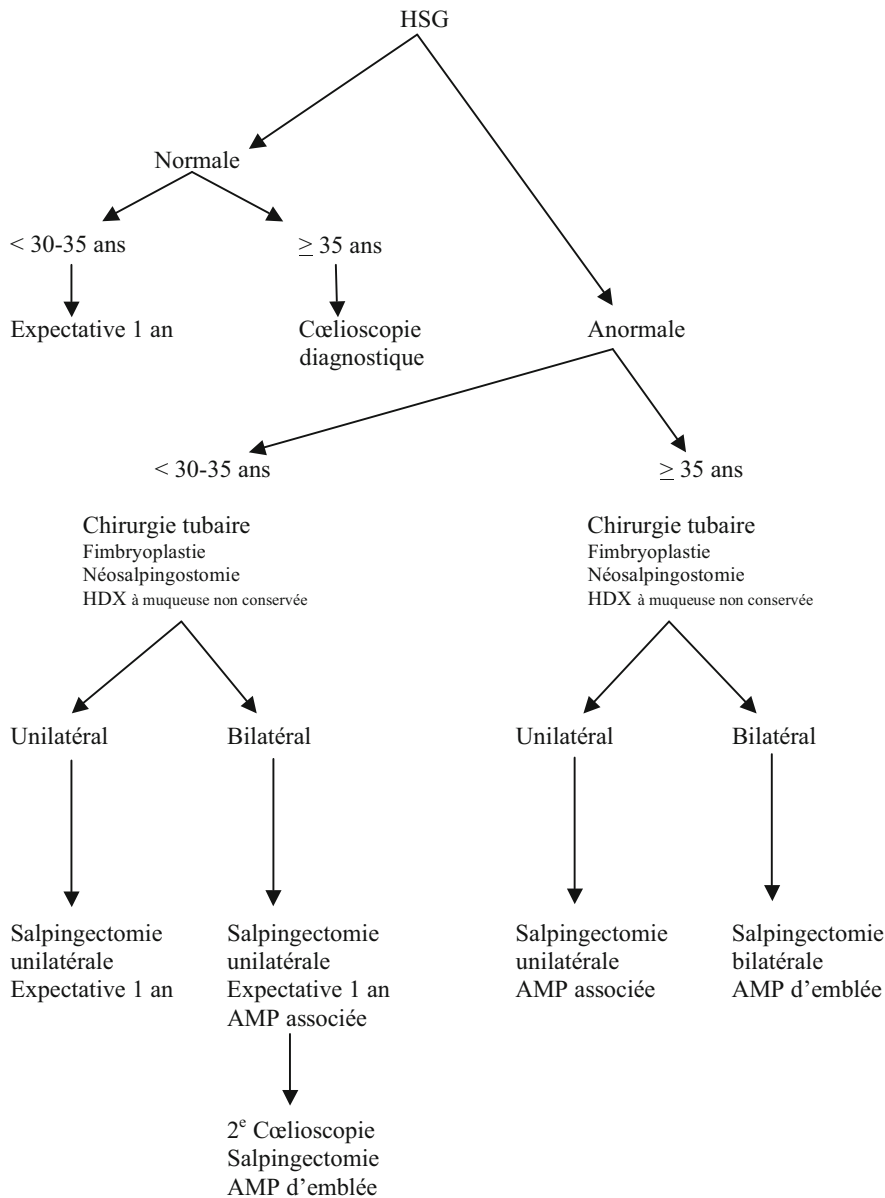


Fig. 31. – Prise en charge actuelle de l'infertilité tubaire distale.

salpingectomie de première intention qui serait psychologiquement mal supportée. En revanche dès 35 ans, l'absence de chirurgie avant AMP est délétère pour la fertilité, en particulier ne pas enlever un hydrosalpinx à muqueuse non conservée grève considérablement le pronostic et fait perdre du temps à la patiente dans sa quête de fertilité.

La figure 31 représente une proposition de prise en charge de l'infertilité tubaire distale.

Prévention des adhérences pelviennes postopératoires

Les adhérences postopératoires intra-abdominales représentent une pathologie très fréquente survenant dans 30 à 90 % des cas selon la voie d'abord chirurgicale : laparotomique ou endoscopique (54). Ces adhérences postopératoires, en particulier pelviennes, sont parfois symptomatiques donnant des douleurs chroniques, mais participent également comme facteur d'infertilité dans 20 à 40 % des cas (55). Depuis longtemps, un certain nombre de produits barrières ont été utilisés, mais peu pratiques lors de leur pose en endoscopie. Des études plus récentes ont montré alors l'intérêt de l'utilisation de gel antiadhérentiel après chirurgie pelvienne, en particulier chez des patientes infertiles (56, 57). Enfin, récemment, l'application d'une solution liquide antiadhérentielle semble avoir montré son caractère facile et simple d'utilisation en endoscopie. Par ailleurs, l'hydroflottation d'une telle solution d'icodextrine à 4 % (Adept®) possède une action significative de plus de 20 % dans la réduction de la genèse des adhérences postopératoires, en particulier dans le contexte de l'infertilité (58). Ainsi, facile d'utilisation, ce lavage endoscopique avec cette solution pourrait être recommandé de façon systématique après chirurgie tubaire.

Conclusion

Les données actuelles de la pratique de l'AMP depuis plus de 20 ans a permis finalement de positionner la place exacte de la chirurgie endoscopique tubaire. L'AMP et la réparation tubaire doivent être proposées de façon complémentaire et synergique. Il faut bien sûr tenir compte de l'âge qui représente un des facteurs pronostiques essentiel, mais l'existence d'un hydrosalpinx ne peut plus laisser indifférent. Dans le parcours d'un couple infertile, la réparation tubaire doit être effectuée quand la vision de la muqueuse tubaire semble correcte, car elle augmente les chances de procréation spontanée. En revanche, l'hydrosalpinx à muqueuse détruite impose la salpingectomie, car elle augmente les chances de grossesse en AMP. On ne devrait plus proposer un parcours

d'AMP aux patientes porteuses d'hydrosalpinx sans en avoir caractérisé leur pronostic.

Références

1. Henry-Suchet J, Goldstein F, Acar J *et al.* (1980) Bacteriological cultures by laparoscopy in salpingitis. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 9: 341-6
2. Henry-Suchet J (1987) Infection génitale haute de la femme. Séquences et conséquences. *Rev Prat* 37: 101-6
3. Trimbo-Kemper T, Trimbo B, Van Hall E (1982) Etiological factors in tubal infertility. *Fertil Steril* 37: 384-8
4. Lang EK, Dunaway HE Jr (2001) Salpingographic demonstration of "cobblestone" mucosa of the distal tubes is indicative of irreversible mucosal damage. *Fertil Steril* 76: 342-5
5. Opsahl MS, Miller B, Klein TA (1993) The predictive value of hysterosalpingography for tubal and peritoneal infertility factors. *Fertil Steril* 60: 444-8
6. Henig I, Prough SG, Cheatwood M, DeLong E (1991) Hysterosalpingography, laparoscopy and hysteroscopy in infertility. A comparative study. *J Reprod Med* 36: 573-5
7. El-Yahia AW (1994) Laparoscopic evaluation of apparently normal infertile women. *Aust NZ J Obstet Gynecol* 34: 440-2
8. Al-Badawi IA, Fluker MR, Bebbington MW (1999) Diagnostic laparoscopy in infertile women with normal hysterosalpingograms. *J Reprod Med* 44: 953-7
9. Gomel V (1977) Tubal reanastomosis by microsurgery. *Fertil Steril* 28: 59-65
10. Dubuisson JB, Aubriot FX, Barbot J *et al.* (1983) Microsurgical treatment of proximal lesions of the fallopian tubes. A propos of 51 cases. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 12: 81-6
11. Dubuisson JB, Chapron C, Ansquer Y, Vacher-Lavenu MC (1997) Proximal tubal occlusion: is there an alternative to microsurgery? *Hum Reprod* 12: 692-8
12. Van Voorhis BJ (2000) Comparison of tubal ligation reversal procedures. *Clin Obstet Gynecol* 43: 641-9
13. Koh CH, Janik GM (1999) Laparoscopic microsurgery: current and future status. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11: 401-7
14. Swolin K (1988) Tubal anastomosis. *Hum Reprod* 3: 177-8
15. Dubuisson JB, Chapron C (1998) Single suture laparoscopic tubal re-anastomosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 10: 307-13
16. Schippert C, Bassler C, Soergel P *et al.* (2010) Reconstructive, organ-preserving microsurgery in tubal infertility: still an alternative to in vitro fertilization. *Fertil Steril* 93: 1359-61
17. Gordts S, Campo R, Puttemans P, Gordts S (2009) Clinical factors determining pregnancy outcome after microsurgical tubal reanastomosis. *Fertil Steril* 92: 1198-202
18. Deguelldre M, Vandromme J, Huong PT, Cadière GB (2000) Robotically assisted laparoscopic microsurgical tubal reanastomosis: a feasibility study. *Fertil Steril* 74: 1020-3
19. Falcone T, Goldberg JM, Margossian H, Stevens L (2000) Robotic-assisted laparoscopic microsurgical tubal anastomosis: a human pilot study. *Fertil Steril* 73: 1040-2
20. Rodgers AK, Goldberg JM, Hammel JP, Falcone T (2007) Tubal anastomosis by robotic compared with outpatient minilaparotomy. *Obstet Gynecol* 109: 1375-80
21. Dharia Patel SP, Steinkampf MP, Whitten SJ, Malizia BA (2008) Robotic tubal anastomosis: surgical technique and cost effectiveness. *Fertil Steril* 90: 1175-9
22. Marconi G, Auge L, Sojo E *et al.* (1992) Salpingoscopy: systematic use in diagnostic laparoscopy. *Fertil Steril* 57: 742-6

23. Watrelot A (2007) Place of transvaginal fertiloscopy in the management of tubal factor disease. *Reprod Biomed Online* 15: 389-95
24. Mage G, Pouly JL, Bouquet de Jolinière J *et al.* (1986) A preoperative classification to predict the intrauterine and ectopic pregnancy rates after distal tubal microsurgery. *Fertil Steril* 46: 807-10
25. American Fertility Society (1988) The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, and distal tubal occlusion. *Fertil Steril* 49: 944-55
26. Daya S (1995) Comparison of, in vitro fertilization with conventional treatment for tubal infertility. Expert conference in Vichy, France, *Références en Gynécologie Obstétrique n°spécial*: 206-14
27. Darai E, Dessolle L, Lecuru F, Soriano D (2000) Transvaginal hydrolaparoscopy compared with laparoscopy for the evaluation of infertile women: a prospective comparative blind study. *Hum Reprod* 15: 2379-82
28. Nawroth F, Foth D, Schmidt T, Römer T (2001) Results of a prospective comparative study of transvaginal hydrolaparoscopy and chromolaparoscopy in the diagnostics of infertility. *Gynecol Obstet Invest* 52: 184-8
29. Saleh WA, Dlugi AM (1997) Pregnancy outcome after laparoscopic fimbrioplasty in nonocclusive distal tubal disease. *Fertil Steril* 67: 474-80
30. Taylor RC, Berkowitz J, McComb PF (2001) Role of laparoscopic salpingostomy in the treatment of hydrosalpinx. *Fertil Steril* 77: 594-600
31. Strandell A, Waldenstrom U, Nilsson L, Hamburger L (1994) Hydrosalpinx reduces in-vitro fertilization/embryo transfer pregnancy rates. *Human Reprod* 9: 861-3
32. Camus E, Poncelet C, Goffinet F *et al.* (1999) Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod* 14: 1243-9
33. Dechaud H (2000) Hydrosalpinx and ART: hydrosalpinges suitable for salpingectomy before IVF. *Hum Reprod* 15: 2464-5
34. Strandell A, Lindhard A (2000) Hydrosalpinx and ART. Salpingectomy prior to IVF can be recommended to a well-defined subgroup of patient. *Human Reprod* 15: 2072-4
35. Johnson NP, Mak W, Sowter MC (2004) Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*: CD002125
36. Zarei A, Al-Ghafri W, Tulandi T (2009) Tubal surgery. *Clin Obstet Gynecol* 52: 344-50
37. Bayrak A, Harp D, Saadat P, Mor E, Paulson RJ (2006) Recurrence of hydrosalpinges after cuff neosalpingostomy in a poor prognosis population. *J Assist Reprod Genet* 23: 285-8
38. Chen CD, Yang JH, Lin KC *et al.* (2002) The significance of cytokines, chemical composition, and murine embryo development in hydrosalpinx fluid for predicting the IVF outcome in women with hydrosalpinx. *Human Reprod* 17: 128-33
39. Bildirici I, Bukulmez O, Ensari A *et al.* (2001) A prospective evaluation of the effect of salpingectomy on endometrial receptivity in cases of women with communicating hydrosalpinges. *Human Reprod* 16: 2422-6
40. Seli E, Kayisli UA, Cakmak H *et al.* (2005) Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukaemia inhibitory factor (LIF) expression at the time of the implantation window. *Hum Reprod* 20: 3012-7
41. Daftary GS, Kayisli U, Seli E *et al.* (2007) Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx. *Fertil Steril* 87: 367-72
42. Eytan O, Azem F, Gull I *et al.* (2001) The mechanism of hydrosalpinx in embryo implantation. *Human Reprod* 16: 2662-7
43. McComb PF, Taylor RC (2001) Pregnancy outcome after unilateral salpingostomy with a contralateral patent oviduct. *Fertil Steril* 76: 1278-9
44. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI (2002) Spontaneous intrauterine pregnancy following salpingectomy for a unilateral hydrosalpinx. *Hum Reprod* 17: 1099-100
45. Sagoskin AW, Lessey BA, Mottla GL *et al.* (2003) Salpingectomy or proximal tubal occlusion of unilateral hydrosalpinx increases the potential for spontaneous pregnancy. *Hum Reprod* 18: 2634-7
46. Hammadieh N, Coomarasamy A, Ola B *et al.* (2008) Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves pregnancy outcome in IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 23: 1113-7
47. Mijatovic V, Veersema S, Emanuel MH *et al.* (2010) Essure hysteroscopic tubal occlusion device for the treatment of hydrosalpinx prior to in vitro fertilization-embryo transfer in patients with a contraindication for laparoscopy. *Fertil Steril* 93: 1138-42
48. Darwish AM, El Saman AM (2007) Is there a role for hysteroscopic tubal occlusion of functionless hydrosalpinges prior to IVF/ICSI in modern practice? *Acta Obstet Gynecol Scand* 86: 1484-9
49. Dar P, Sachs GS, Strassburger D *et al.* (2000) Ovarian function before and after salpingectomy in artificial reproductive technology patients. *Hum Reprod* Jan 15: 142-4
50. Nakagawa K, Ohgi S, Nakashima A *et al.* (2008) Laparoscopic proximal tubal division can preserve ovarian reserve for infertility patients with hydrosalpinges. *J Obstet Gynaecol Res* Dec 34: 1037-42
51. Haebe J, Martin J, Tekepety F *et al.* (2002) Success of intrauterine insemination in women aged 40-42 years. *Fertil Steril* 78: 29-33
52. Klipstein S, Regan M, Ryley DA *et al.* (2005) One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. *Fertil Steril* 84: 435-45
53. Rapport FIVNAT (2003) Résultats de l'AMP
54. Lower AM, Hawthorn RJS, Clark D, Knight AD, Crowe AM (2004) Adhesion related readmissions following gynaecological laparoscopy or laparotomy in Scotland: an epidemiological study of 24,046 patients. *Human Reprod* 19: 1877-85
55. Diamond MP, Freeman ML (2001) Clinical implications of postsurgical adhesions. *Human Reprod Update* 7: 567-76
56. Mettler L (2003) Pelvis adhesions: laparoscopic approach. *Ann NY Acad Sci* 997: 255-68
57. Mais V, Bracco GL, Litta P *et al.* (2006) Reduction of post-operative adhesions with an auto-crosslinked hyaluronan gel in gynaecological laparoscopic surgery: a blind, controlled randomized multicenter study. *Human Reprod* 21: 1248-54
58. Brown CB, Luciano AA, Martin D *et al.* (2007) Adept (icodextrine 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis a double-blind, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 88: 1413-26

H. Dechaud, J.-P. Rouanet,
M. Viala Trentini
et C. Dechanet

Exploration tubaire : tuboscopie et cathétérisme tubaire sélectif

Salpingoscopie

La première tentative de cathétérisme des trompes utérines par voie transcervicale fut reportée dans un travail réalisé en 1849. L'auteur utilisait alors une canule en argent en forme de J pour accéder aux ostia uterotubaires puis, ainsi guidé, il glissait un fanon de baleine dans la lumière tubaire. Au travers de cet article, quatre concepts modernes furent abordés. Premièrement, l'idée que du « sable » puisse obstruer la lumière tubaire et, ainsi, rendre stérile des femmes. Deuxièmement, un objet mécanique pouvait enlever cet obstacle et rétablir la fertilité. Troisièmement, un système co-axial pouvait être utilisé pour cathététiser la lumière tubaire et, enfin, l'accession à la lumière tubaire pouvait se faire par impression tactile.

Durant le siècle suivant, les techniques de cathétérismes tubaires par voie transcervicales ont été recentrées sur la stérilisation et les méthodes d'obstruction de la portion proximale. Dans les années 1960, certains auteurs concluaient qu'il serait impossible de passer des objets à partir de la cavité utérine jusque dans la lumière tubaire parce que celle-ci a un diamètre trop étroit et une variabilité extrême, tant dans ses configurations que dans ses directions. Cependant, en 1970, Mohri décrivait l'utilisation d'un endoscope réalisé avec des fibres de verres souples pour l'observation endotubaire. L'instrument est alors appelé « tubaloscope ». Cette fibre est insérée directement dans l'ostium après repérage hystéroscopique. Toutefois, la taille, la mauvaise qualité de l'image et l'absence de système de transmission des images ont nettement limité l'accès aux trompes et le développement de la technique. Malgré ces inconvénients, le travail de cette équipe représente une étape primordiale vers le développement ultérieur de la falloposcopie qui permettra, vingt ans plus tard, d'explorer entièrement la lumière tubaire.

En 1981, Cornier expose les premiers résultats de l'endoscopie de la portion distale des trompes qu'elle réalise par voie abdominale (1). Dans les suites immédiates, plusieurs équipes décrivent diverses techniques appelées fimbrioscopie, salpingoscopie ou ampulloscopie (2). En 1990 est décrit,

pour la première fois, la falloposcopie qui consiste en une exploration complète de la lumière tubaire par voie transcervicale, grâce au développement de fibres optiques de 0,45 mm de diamètre (3, 4).

Enfin, le développement de la coelioscopie par voie transvaginale a permis de créer le concept de fertiiloscopie qui consiste à réaliser, dans le même temps opératoire, une coelioscopie par voie transvaginale, une hystéroscopie, une épreuve de perméabilité tubaire au bleu de méthylène et une salpingoscopie (5, 6) (tableau I).

Tableau I – Chronologie des principaux événements dans l'élaboration du concept d'endoscopie tubaire.

Année	Auteurs	Contribution
1561	G. Fallopius	Première description anatomique des trompes utérines
1848	WT. Smith	Première tentative de cathétérisme tubaire
1963	WJ. Sweeney	La portion proximale des trompes semble inaccessible
1966	PA. Corfman	Instrumentation pour cathétérisme transcervical
1970	T. Mohri	Première endoscopie tubaire (tubaloscope)
1977	JP. Rouanet	Première salpingographie sélective
1981	E. Cornier	Première endoscopie tubaire par voie transabdominale
1985	MP. Platia	Première recanalisation tubaire sur pathologie proximale
1985	J. Henry-Suchet	Définition de la tuboscopie
1986	E. Confino	Tuboplastie proximale par ballonnet intratubaire
1987	I. Brosens	Salpingoscopie dans l'évaluation tubaire
1990	J. Kerin	Première falloposcopie
1997	S. Gordts	Première fertiiloscopie

Définition

La salpingoscopie est l'endoscopie de la portion distale des trompes de Fallope, à savoir l'exploration visuelle directe du pavillon tubaire et de l'ampoule.

Objectif

L'objectif de la salpingoscopie est d'évaluer directement de visu la muqueuse endotubaire afin d'établir un pronostic de fonctionnalité tubaire, donc de fertilité spontanée ou après chirurgie tubaire (7, 8).

Matériel et technique

Salpingoscopie par voie abdominale

Le salpingoscope utilisé est soit un endoscope rigide de 2,8 mm, soit un endoscope souple (3,4 mm) en cours de coelioscopie (ou de laparotomie). La distension de l'ampoule se réalise avec une perfusion continue de sérum physiologique. La trompe doit être saisie avec délicatesse afin d'éviter les déchirures et les saignements. Une exploration trop longue peut entraîner un œdème muqueux qui peut nuire à l'interprétation des images. De même, la présence de bulles d'air peut entraîner une « compression » des plis et donner une interprétation erronée des images. Les mouvements de l'endoscope doivent être lents et méticuleux afin de ne pas risquer la perforation de la paroi tubaire.

Salpingoscopie par voie vaginale

Les développements récents de la coelioscopie par voie transvaginale ou de la fertiloscopie ont permis de réaliser, par la même voie, et souvent par le même matériel une salpingoscopie (9). L'approche par le cul-de-sac de Douglas facilite le geste et la vision en milieu hydrique donne des images de haute définition (10). De plus, cet examen peut facilement être réalisé sous anesthésie locale avec une très bonne tolérance (11). La technique est simple et consiste à stabiliser le pavillon avec une fine pince introduite par le canal opérateur. Ensuite, l'endoscope est délicatement introduit dans le pavillon puis dans l'ampoule tubaire jusqu'à la jonction isthmo-ampullaire. Durant la procédure, une irrigation est réalisée en continu. La réalisation complémentaire d'une microsalpingoscopie est possible en utilisant un endoscope avec un grossissement de 180 fois (12). Cette microsalpingoscopie doit être réalisée après une épreuve au bleu de méthylène pour examiner le nombre de noyaux cellulaires colorés présent dans l'épithélium tubaire (13). Le dénombrement de ces noyaux colorés permet de classer l'épithélium tubaire de normal (aucune coloration) à pathologique (14). Dans une étude rétrospective sur 500 cas, la salpingoscopie était anormale dans seulement 8 % des trompes perméables. En revanche, la microsalpingoscopie montrait 37 % d'anomalies sur les mêmes trompes (12).

Indication

La salpingoscopie est indiquée chez les patientes suspectes d'une pathologie tubaire entraînant une infertilité. Les antécédents connus ou non de pathologies pelviennes infectieuses (infections génitales hautes) sont une indication majeure de salpingoscopie, car les lésions postinfectieuses peuvent atteindre la muqueuse endoluminale. Il n'existe pas de corrélation entre la sévérité des lésions péritonéales et le degré d'atteinte de la lumière tubaire, ce qui justifie une exploration de cette dernière pour établir le pronostic tubaire.

L'endométriose pelvienne est une deuxième indication de salpingoscopie en sachant que, dans cette pathologie, l'atteinte de la lumière tubaire est souvent peu marquée.

L'antécédent de grossesse ectopique tubaire peut représenter une autre indication de salpingoscopie pour rechercher *a posteriori* une explication lorsqu'un traitement conservateur a été réalisé. Cet examen permet aussi un pronostic de fonctionnalité à partir de l'analyse de la pathologie initialement responsable de la grossesse extra-utérine.

Enfin, l'infertilité idioopathique peut bénéficier d'une étude par salpingoscopie afin de révéler d'éventuelles lésions endotubaires qui passeraient inaperçues avec les moyens d'explorations conventionnels.

Sémiologie

Aspects normaux

Le pavillon doit avoir des franges muqueuses souples et libres de toutes adhérences. La muqueuse de l'ampoule comporte quatre à cinq plis muqueux primaires longitudinaux avec de multiples plis secondaires et tertiaires (fig. 1 et 2). Ces plis ont un très fin réseau vasculaire, bien visible en vision de contact. À la jonction isthmo-ampullaire, le diamètre de la lumière tubaire se rétrécit de façon concentrique, ne permettant pas l'accès de l'endoscope à la portion isthmique des trompes.

Aspects pathologiques

En présence d'un hydrosalpinx ou d'un phimosis tubaire, l'ouverture de la trompe est un préalable indispensable afin de réaliser l'évaluation de l'endosalpinx. Les pathologies de la muqueuse peuvent être soit une atrophie, soit une hypertrophie des plis. L'atrophie peut être étendue, focalisée, complète, sévère ou partielle (fig. 3). En présence d'une

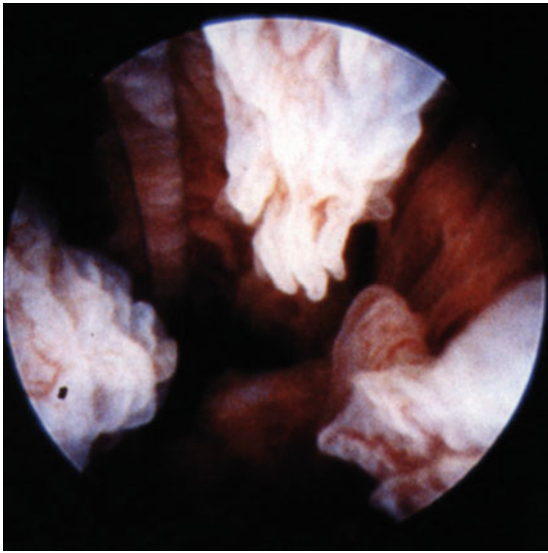
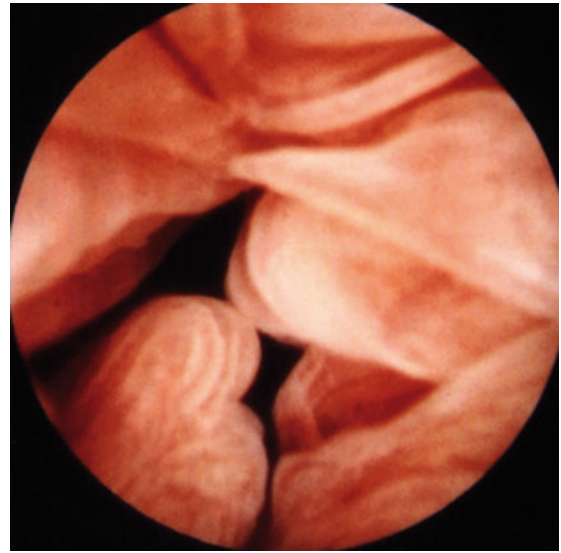


Fig. 1 et 2 – Salpingoscopie ampullaire normale.



atrophie partielle, les plis restant perdent leur mobilité, leur translucidité et, parfois, leur réseau vasculaire donnent l'impression d'une structure « morte ». Le nombre des plis décroît très rapidement en fonction du degré d'atteinte pathologique de la trompe. Une muqueuse atrophique prend un aspect blanc livide. L'hypertrophie des plis se retrouve dans des zones hautement pathologiques. Ces plis sont isolés au sein de l'atrophie sévère. L'aspect est grossier, anarchique. Ils paraissent figés et parfois soumis à une inflammation persistante marquée par une impression d'œdème.

Les anomalies de la vascularisation se rencontrent dans les atrophies où elle prennent l'aspect d'hypo-

vascularisation. Les états inflammatoires aigus se traduisent par une hypervascularisation où le simple contact du scope peut entraîner un saignement endotubaire minime.

Les adhérences intraluminales sont des structures constamment pathologiques, avasculaires. Elles peuvent être isolées ou multiples, fines (vélamenteuses) ou épaisses (fibreuses), interpariétales (synéchies) ou interplis, le plus souvent non obstructives (fig. 4).

Elles marquent toujours un degré d'atteinte très sévère de la trompe. La présence d'adhérences dans un hydrosalpinx signe la non-fonctionnalité de la trompe (15). Les différents aspects normaux et



Fig. 3 – Atrophie de la muqueuse endotubaire.

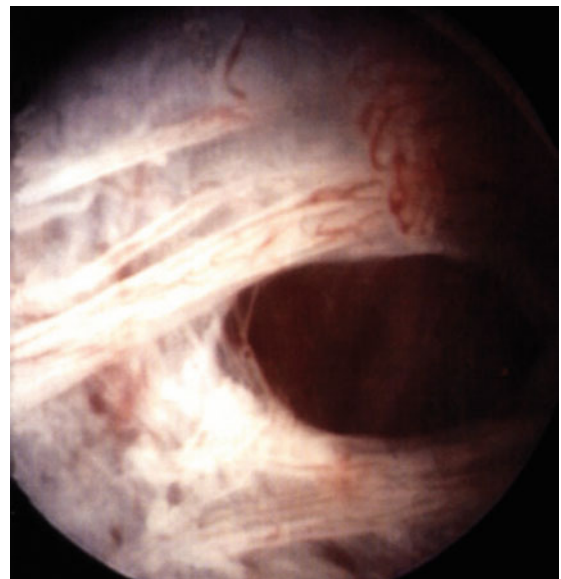


Fig. 4 – Adhérences intra-ampullaires.

pathologiques ont été analysés sous la forme d'un score pronostique en termes de survenue de grossesse (16) (tableau II).

Tableau II – Score tubaire en salpingoscopie.

Grade I	Aspect normal des plis
Grade II	Aplatissement des plis primaires avec espacement de ces plis
Grade III	Adhérences fines entre les plis muqueux
Grade IV	Synéchies de la lumière tubaire
Grade V	Fibrose des plis

Salpingoscopie : contribution à l'investigation tubaire

D'une façon conventionnelle, l'exploration tubaire est réalisée par l'hystérosalpingographie et par la coéloscopie. Aucune des deux ne permet une évaluation des pathologies intratubaires. L'exploration directe de la muqueuse par salpingoscopie lui confère une meilleure pertinence diagnostique (17-19). La salpingoscopie offre une meilleure appréciation tubaire que la simple visualisation du pavillon (fimbrioscopie). Cette dernière technique a 49 % de faux négatifs par rapport à la salpingoscopie sur des pathologies tubaires postinfection génitale haute (20).

La présence d'adhérences intratubaires, identifiées à la salpingoscopie, semble être le facteur ayant le plus mauvais pronostique en termes de grossesses spontanées puisqu'en l'absence d'adhérences, le taux de grossesses intra-utérines est de 59 % alors que la présence d'adhérences réduit ce taux à 22 % et augmente celui des grossesses extra-utérines à 11 % (15).

Une étude sur 163 patientes avec un suivi de 42 mois démontre le caractère pronostique de la salpingoscopie (20). Chez les patientes aux trompes perméables, le taux cumulé de grossesses intra-utérines est de 64 % dans les groupes I et II *versus* 36,7 % dans les groupes III et IV. Aucune grossesse n'est survenue dans le groupe V. Chez les patientes avec des hydrosalpinx, les taux cumulés de grossesses intra-utérines sont de 78,6 % dans les groupes I et II *versus* 23,5 % dans les groupes III et IV. Là aussi, aucune grossesse n'est survenue dans le groupe V (20).

La morphologie de la muqueuse endotubaire apparaît comme le facteur diagnostique et pronostique le plus performant pour évaluer le devenir de fertilité, ainsi que le risque de grossesses tubaires (21).

Cathétérisme sélectif des trompes

La salpingographie sélective ne peut être que consécutive à une hystérosalpingographie laissant

supposer une obstruction tubaire proximale. Si les trompes ne sont pas perméables, le cathétérisme tubaire peut être effectué dans le même temps en accord avec le correspondant gynécologue. Elle présente un double intérêt :

- diagnostique car elle détermine le site de l'obstruction et parfois oriente vers une étiologie ;
- thérapeutique, car la simple injection sélective intratubaire de produit de contraste peut permettre une désobstruction au moins transitoire.

L'étiologie tubo-péritonéale est l'une des principales causes d'infécondité, qu'il s'agisse de la cause principale ou d'une cause associée (22, 23). La première publication concernant l'idée de désobstruction uterotubaire par les voies naturelles date du milieu du XIX^e siècle, bien avant les premières images d'opacification radiologique de l'appareil génital, tandis que la première salpingographie sélective sous guidage fluoroscopique est décrite en 1977 (24) et les premières images publiées dans le traité de radiodiagnostic de Fischgold (25). Cette technique va ensuite progresser grâce aux améliorations du matériel de radiologie vasculaire interventionnelle. Depuis 1985, sous l'impulsion de radiologues américains, en particulier de Thurmond (26-32), elle connaît, outre-Atlantique, un net regain d'intérêt en raison de sa simplicité et des résultats favorables obtenus.

Principes généraux

Ces examens sont réalisés systématiquement en première partie du cycle menstruel. La couverture antibiotique est systématique, en particulier dans le cas de l'exploration radiologique d'une infertilité où un doute peut exister quant à la possibilité d'une infection tubaire méconnue. Classiquement une antibiothérapie à large spectre encadre ces examens. Actuellement, une antibiothérapie deux heures avant l'examen, plus facile à mettre en œuvre, est prescrite. En cas de terrain allergique avéré, un antihistaminique est prescrit la veille et le matin de l'examen. Ce double examen est réalisé en ambulatoire, sans sédatif, en première intention. Sa durée dépend principalement de la position de l'utérus, de l'étendue des lésions tubaires et des difficultés de recanalisation éventuelle.

Deux contre-indications sont formelles :

- Une infection génitale en cours, souvent latente. Un interrogatoire précis de la patiente est indispensable à la recherche d'infections antérieures méconnues. Après mise en place du spéculum, un écoulement suspect par le col indique le report de l'examen. Au moindre doute, une échographie endo-vaginale peut découvrir un salpinx éventuellement causal et doit faire reporter l'examen ;

- Une grossesse débutante, dans le cadre d'un bilan d'infertilité, est possible. Même si ces examens sont réalisés en première partie de cycle, un dosage plasmatique de bêta-hCG la veille est systématique.

Les autres contre-indications classiques sont relatives :

- l'allergie aux produits de contraste ou les terrains atopiques marqués nécessitent une prémédication avant et une surveillance particulière au décours de l'examen. Certaines allergies, en particulier au latex ou au kiwi, méritent des précautions spécifiques en termes de matériel. Il en est de même pour les patientes porteuses du VIH, du virus de l'hépatite C et dans le cadre de certaines myopathies comme la maladie de Steinert ;
- en période ménométrorragique, il est préférable de reporter l'examen pour éviter les images lacunaires liées aux caillots intracavitaires.

Une hystérosalpingographie préliminaire est toujours réalisée dans le cadre du bilan d'infertilité ou pour confirmer une anomalie proximale décrite sur un examen antérieur responsable de l'indication du cathétérisme sélectif demandé et qui parfois ne sera pas confirmée.

Le matériel nécessaire est pseudo-chirurgical :

- champs, gants, blouses et compresses stériles ;
- produits de désinfection pour peau et muqueuses ;
- matériel à usage unique (spéculum, sonde à ballonnet, seringues de 10 et 20 cc) ;
- produit de contraste iodé hydrosoluble fluide.

La patiente est installée en position gynécologique, cuisses verticales, pieds dans les étriers, sur une table de radiologie numérique :

- un cliché sans préparation est indispensable ;
- un large coussin en mousse est placé contre la face postérieure des cuisses et permet de poser le matériel sans traction utérine ;
- une désinfection soigneuse de la région anovulaire ;
- la mise en place de champs stériles placés sous les fesses et les membres inférieurs ;
- l'utilisation d'un spéculum radio transparent à usage unique présente l'avantage de pouvoir rester en place durant toute la durée de la procédure ;
- une pince appliquée sur la lèvre antérieure du col n'est pas indispensable mais il est parfois nécessaire de redresser un utérus rétro-, ou antéversé gênant le positionnement et la progression du cathéter. Un hystéromètre n'est plus nécessaire. Aujourd'hui, le cathéter de l'hystérogographie préliminaire sert d'hystéromètre et parfois de désilet transvaginal. Il s'agit d'un cathéter à ballonnet à usage unique. Le ballonnet, gonflé au niveau du col ou de l'isthme, empêche ainsi

l'évacuation spontanée du produit de contraste. Ce type de cathéter permet selon les modèles de passer en trans-vaginal une sonde de cathétérisme sélectif et de réaliser une salpingographie sélective dans le même temps en toute sécurité.

La salpingographie sélective constitue la seconde étape de l'examen en cas d'obstruction tubaire proximale avérée (33, 34). Elle est éventuellement suivie d'une tentative de recanalisation. Sa technique est univoque et nécessite :

- un cathéter porteur, de calibre 5F, va servir de désilet dans l'endocol et la cavité utérine, mais peut également être remplacé par tout introducteur de type vasculaire 5F ou 6F. La sonde à ballonnet utilisée pour l'hystérogographie préliminaire peut également être idéale à utiliser pour prolonger l'hystérogographie par la réalisation d'une salpingographie sélective ;
- une sonde précourbée à angle de 120° environ de calibre 4F ou moins sera poussée jusqu'à l'ostium du côté choisi ;
- des guides souples de calibre 0,035 inch, en J ou droits, peuvent être nécessaires pour le positionnement dans la cavité et éventuellement l'accès à l'ostium. Pour la recanalisation, on utilise habituellement du matériel de radiologie vasculaire pour petites artères ;
- une petite sonde souple de calibre 3F ou moins pourra cheminer à l'intérieur de la trompe ;
- des guides ultrafins (0,018 inch ou moins) pour la recanalisation.

Technique de la salpingographie sélective (fig. 5)

Mise en place de la sonde 5F qui doit progresser dans l'endocol jusqu'à l'isthme ou mieux dans la cavité. Une injection de produit de contraste permet alors de vérifier et de visualiser la position de l'extrémité de la sonde dans la cavité. La sonde précourbée est alors montée à l'intérieur de la sonde porteuse jusque dans la cavité et dirigée sous scopie latéralement vers l'ostium tubaire, soit seule, soit sur un guide souple en J ou droit selon la morphologie. Le passage de l'ostium tubaire par l'extrémité de la sonde s'accompagne généralement d'une sensation de ressaut ressentie par la patiente. L'injection de produit de contraste est alors réalisée ; le caractère sélectif et la pression suffisent souvent à désobstruer la portion interstitielle. La trompe controlatérale peut être cathétérisée et opacifiée selon les mêmes étapes en retirant et en tournant la sonde 4F à l'intérieur de la sonde porteuse comme en radiologie vasculaire. La scopie intermittente doit être aussi brève que possible ; la dose gonade doit être chiffrée et communiquée.

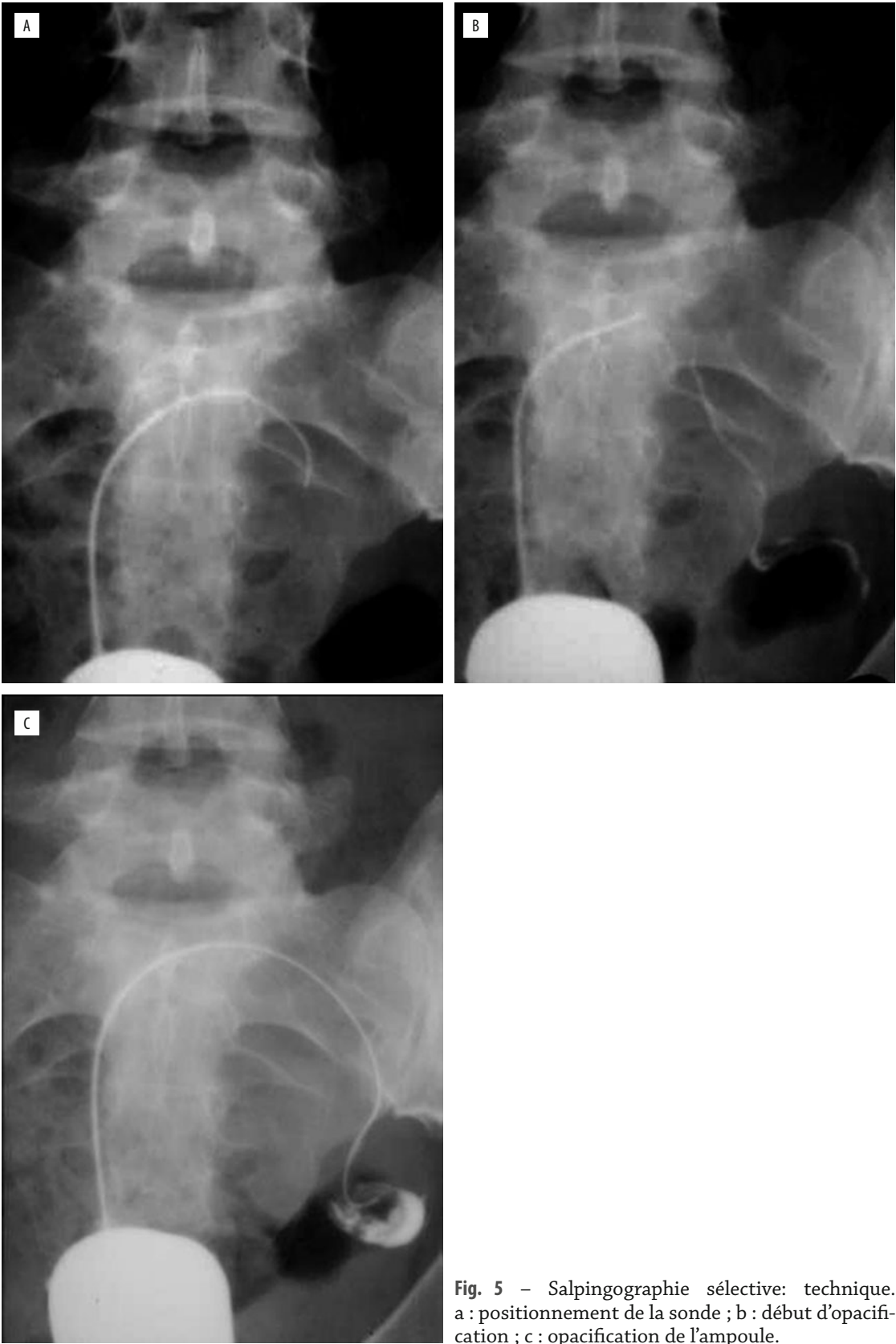


Fig. 5 – Salpingographie sélective: technique.
a : positionnement de la sonde ; b : début d’opacification ; c : opacification de l’ampoule.

Technique de la recanalisation tubaire (fig. 6)

Selon une technique identique à celle de la reperméabilisation vasculaire, de petits mouvements de va-et-vient permettent d'amener l'extrémité distale du guide, ou éventuellement de la sonde, au contact de l'obstruction. Une poussée courte plus précise peut alors permettre de franchir la sténose. Une injection manuelle de produit de contraste permet de vérifier la recanalisation éventuelle, d'apprécier l'état de l'ampoule et la qualité du brassage péritonéal. Certaines équipes associaient systématiquement encore à toutes les reperméabilisations une tuboplastie proximale de l'ostium, en utilisant des sondes à ballonnets semblables à celles utilisées pour les dilatations coronariennes (35, 36). Cette technique qui visait à empêcher l'accumulation à l'ostium de boue tubaire est aujourd'hui abandonnée en raison de

fibroses périostiales consécutives provoquées par la procédure d'élargissement.

Résultats normaux

L'hystérographie présélective doit confirmer l'indication du cathétérisme sélectif et apprécier d'éventuelles difficultés techniques possibles. Ainsi, doivent successivement être étudiés la taille de la cavité utérine, le canal endocervical, les trompes et la cavité péritonéale. L'aspect de la cavité utérine permet d'apprécier la faisabilité du cathétérisme tubaire. Classiquement, l'utérus est antéversé, antéfléchi. Une importante latérodévi-ation peut modifier le choix de la sonde à utiliser. Le remplissage de la cavité doit être manuel et surtout progressif de façon à éviter le spasme tubaire.

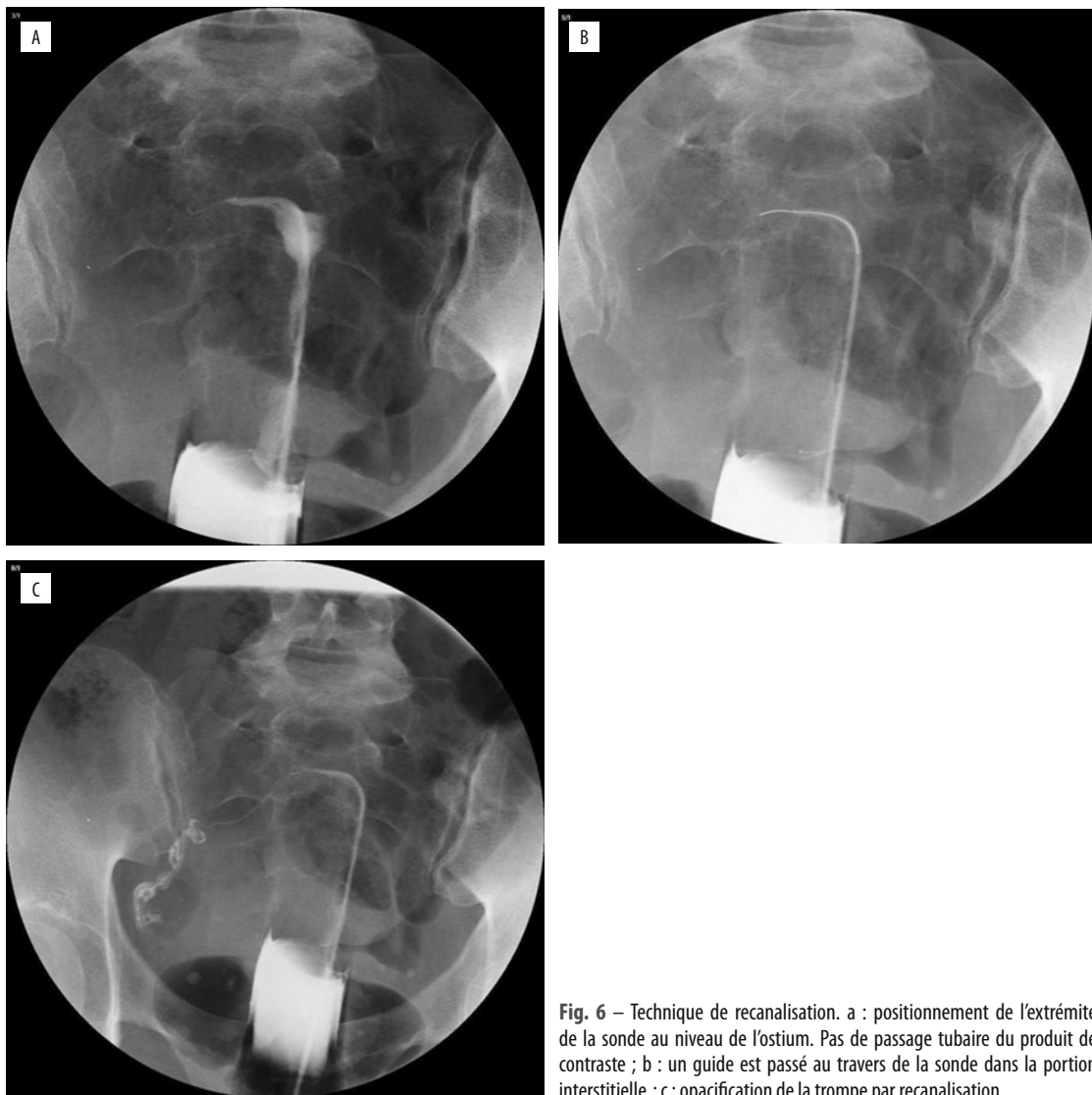


Fig. 6 – Technique de recanalisation. a : positionnement de l'extrémité de la sonde au niveau de l'ostium. Pas de passage tubaire du produit de contraste ; b : un guide est passé au travers de la sonde dans la portion interstitielle ; c : opacification de la trompe par recanalisation.

Salpingographie normale

Les trompes comportent quatre segments ; les portions intéressées par le cathétérisme sélectif sont les portions proximales :

- le segment intramural (ou interstitiel) non cilié traverse le myomètre. Il mesure environ 2 cm. Son origine est marquée par un léger renflement dont la base est séparée de la corne utérine par un pseudo-sphincter prétubaire fréquent. Le diamètre intraluminal est de 1 mm environ ;
- le segment isthmique mesure 2 à 4 cm de longueur. La muqueuse est fragile et comprend des cellules ciliées. Le diamètre interne moyen varie de 0,5 à 1 mm. Son trajet est tortueux et peut être déroulé par des incidences obliques voire de profil.

Après l'hystéroggraphie première de confirmation de l'obstruction proximale, plusieurs cas de figures sont possibles :

- cavité utérine et trompes normales avec passage péritonéal. Il s'agissait d'un examen non fiable ;
- pathologie utérine avec trompes normales ;
- pathologie utérine avec obstruction proximale tubaire ;
- obstruction proximale seule ;
- obstruction isthmique avec opacification partielle de la trompe ;
- pathologie ampullaire distale.

Dans les deux premiers cas, la procédure est bien sûr terminée. Dans les 3^e et 4^e cas, un cathétérisme tubaire peut être licitement tenté. Les autres cas ne sont pas une indication de cathétérisme tubaire, mais bien une contre-indication.

Résultats pathologiques

Les pathologies utérines intéressant la partie proximale des trompes rencontrées en matière d'infertilité sont essentiellement acquises. Il s'agit de myomes et de synéchies angulaires. Les synéchies sont habituellement secondaires à un traumatisme utérin (curetage, manœuvres endo-utérines) ou à une tuberculose génitale ancienne méconnue. Il s'agit de cicatrices de guérison de l'endomètre réalisant un accollement puis une véritable « soudure » fibroconjonctive, voire fibromusculaire antéropostérieure. Elles se traduisent par des images lacunaires, centrales ou marginales, à contours nets parfaitement définis, constantes lors du remplissage cavitaire. Les myomes (fig. 7) des cornes juxtataubaires sont rarement obstructifs et donc une cause rare d'infertilité ; ils restent un diagnostic d'élimination.

L'aspect hystéroggraphique des myomes sous-muqueux se traduit par une image lacunaire, à contours arrondis, s'estompant progressivement lors du remplissage cavitaire. Ils peuvent défor-

mer l'utérus selon leur volume ou leur localisation. L'aspect hystéroggraphique du polype muqueux est souvent identique, mais plus compressible avec une cavité souvent non agrandie.

Les pathologies tubaires sont nombreuses, variées et parfois mal connues. Dans 70 % des cas, l'injection sélective permet d'obtenir une opacification tubaire et un passage péritonéal. Dans les études, environ deux tiers des trompes sont considérées comme normales dans leurs différents segments, avec brassage péritonéal correct. L'étiologie la plus fréquente est l'occlusion par « boue tubaire » interstitielle. Les autres causes sont nombreuses ; il s'agit essentiellement d'endométriose tubaire, de salpingite isthmique nodulaire, d'adhérences tubaires ou périutérines postinfectieuses. Dans 30 % des cas, la salpingographie sélective ne permet pas d'obtenir un passage péritonéal. Une recanalisation est alors nécessaire, sauf en cas de pathologie bifocale connue, en raison de l'inutilité d'un tel acte et du risque infectieux.

Les polypes de jonction (fig. 8) se traduisent par des lacunes arrondies, souvent bilatérales plus ou moins obstructives. Leur responsabilité dans l'hypofertilité est discutée. Cette lésion, volontiers bilatérale, correspond à une évagination de

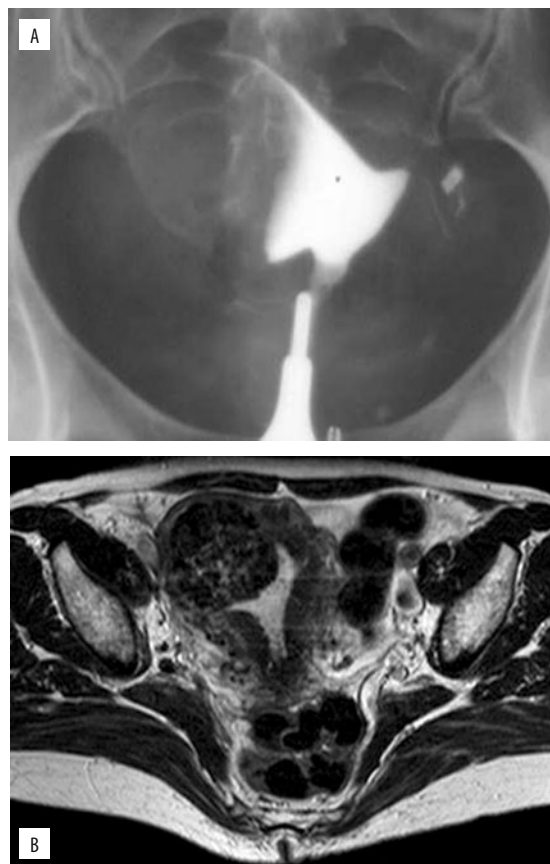


Fig. 7 – a : hystérosalpingographie : myome de la corne droite ; b : IRM T2 axial : myome non remanié occupant toute la corne droite.

la muqueuse utérine dans la portion interstitielle tubaire.

Elle se traduit en hystéroggraphie par une image arrondie ovale à bords réguliers, siégeant à la jonction des deux muqueuses tubaire et utérine au début de la portion interstitielle de la trompe. Ils sont retrouvés dans 10 % des hystérosalpingographies réalisées pour infertilité. La salpingographie sélective est très informative pour démontrer la normalité de la trompe en amont du polype.

Le spasme (fig. 9) avec corne arrondie durable ne peut pas toujours être évité malgré une injection lente ; il est parfois répétitif du même côté chez la même patiente. Il correspond à la contraction de la couche musculaire circulaire et représente le dia-

gnostic différentiel principal des lésions de la portion interstitielle.

Quelques précautions simples semblent diminuer sa fréquence (utilisation de produit de contraste très fluide, injection douce et progressive, mise en confiance de la patiente). Il se lève spontanément en général grâce à la patience, la faible pression d'injection, éventuellement l'utilisation d'antispasmodiques, les massages pelvi-abdominaux ou la mise en procubitus. En cas de spasme tubaire, la corne apparaît arrondie et globuleuse contrairement à l'aspect spiculaire et pointu observé en cas d'obstacle organique. La salpingographie sélective réalisée immédiatement (ou à distance) permet de lever le doute.

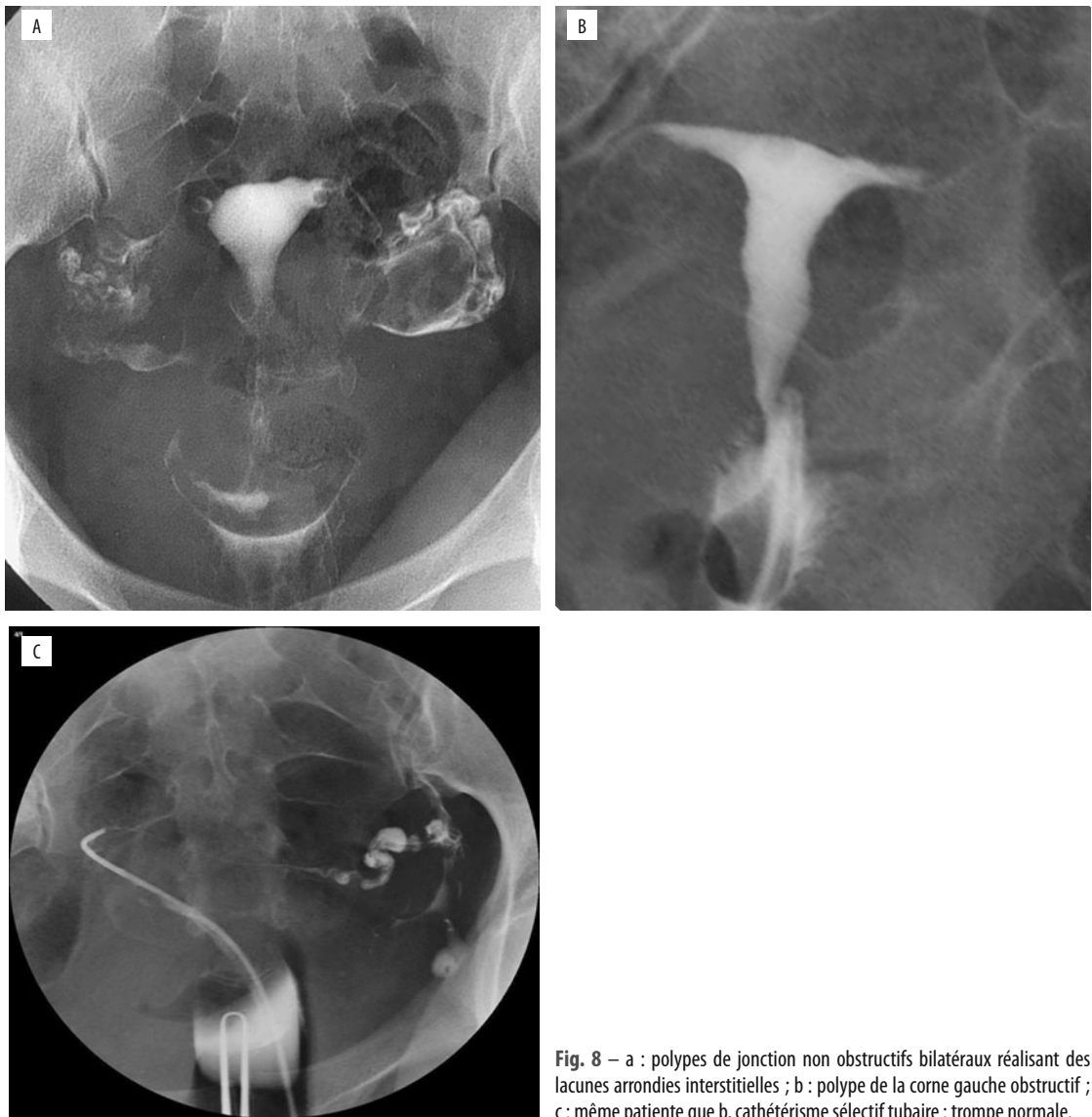


Fig. 8 – a : polypes de jonction non obstructifs bilatéraux réalisant des lacunes arrondies interstitielles ; b : polype de la corne gauche obstructif ; c : même patiente que b, cathétérisme sélectif tubaire : trompe normale.

Le bouchon muqueux (fig. 10) correspond à l'accumulation de sécrétions d'origine tubaire dans la portion interstitielle bloquée au niveau de l'ostium.

Son existence a été confirmée par les travaux de Sulak (37) puis de Kerrin (38) et Letterie (39). La pathogénie est discutée mais il semble que l'association de sécrétions tubaires épaisses associées à un ostium rétréci (de manière congénitale, traumatique ou infectieuse) peut expliquer cette accumulation et la création d'un bouchon muqueux. Ces sécrétions sont facilement expulsées dans le péritoine lors de l'opacification sélective, les portions isthmiques et ampullaires étant généralement normales.

L'endométriiose tubaire est souvent bilatérale, associée ou non à une endométriiose ovarienne et péritonéale. L'atteinte interstitielle correspond en fait à une adénomyose de la corne utérine. L'atteinte de la portion isthmique se traduit par une rigidité tubaire avec des diverticules, le plus fréquemment l'obstruction tubaire est complète (40).

La salpingite isthmique nodulaire est un syndrome se traduisant par la présence de multiples images diverticulaires favorisées par les spasmes fréquents communiquant avec la lumière tubaire isthmique et entraînant un renflement nodulaire de la trompe en regard lié à une fibrose intramurale.

Ces lésions sont le plus souvent bilatérales et se situent surtout à l'origine du segment isthmique, beaucoup plus rarement à la jonction avec l'ampoule. L'étiopathogénie de cette affection est discutée. Il semble que les images décrites puissent correspondre à plusieurs étiologies : endométriiose, tuberculose, lésions inflammatoires non spécifiques (postinfectieuse gonococcique, post-chirurgicales). L'aspect hystérographique est rela-

tivement caractéristique, associant de multiples images d'addition diverticulaires péri-isthmiques volontiers regroupées en amas, dont la communication avec la lumière tubaire est rarement individualisable (40). Des localisations plus distales sont possibles et l'opacification tubaire distale dépend du degré d'obstruction isthmique.

La tuberculose génitale est une affection rare dans nos pays touchant la femme jeune et pouvant être responsable d'hypofertilité. L'hystérographie est proscrite en période évolutive connue, ou suspectée, d'une tuberculose. Les lésions subissent l'évolution classique de la tuberculose avec nécrose caséeuse puis fibrose engageante. Elles sont constamment bilatérales, associant sténoses médio-ampullaires bilatérales, fixées et des dilata-tions. Les plis muqueux, d'abord épaissis, disparaissent. Il peut exister des diverticules pariétaux. L'atteinte de l'isthme entraîne une déformation et une rigidité pariétale avec un aspect moniliforme et pseudodiverticules.

Le granulome lipoïdique est rare en Europe. Il s'agit d'une salpingite chronique avec réaction fibreuse à cellules géantes qui est la conséquence d'une réaction à corps étrangers (produit de contraste liposoluble).

Les tumeurs de la trompe sont exceptionnelles et en principe non la cause d'infertilité, qu'il s'agisse de tumeurs bénignes (fibromes, kystes embryonnaires) ou malignes. Les tumeurs malignes primitives touchent surtout la femme péri- et postménopause. Elles sont normalement dépistées au début du passage tubaire. Radiologiquement, la lésion est souvent distale et se présente comme un hydrosalpinx lacunaire et hétérogène, lié à la présence du bourgeon tumoral.

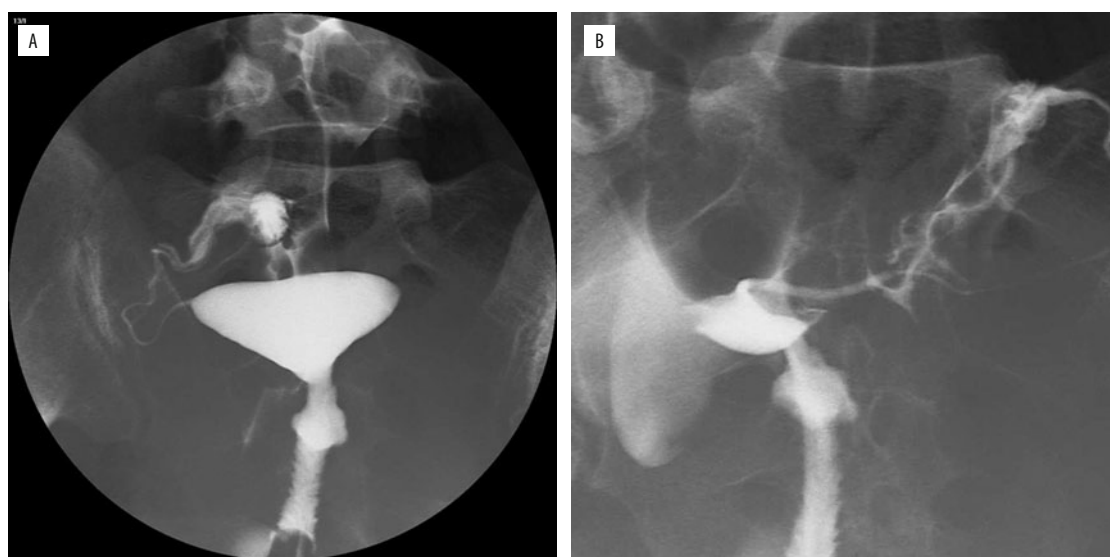


Fig. 9 – a : spasme caractéristique au niveau de la trompe gauche ; b : cathétérisme sélectif et opacification d'une trompe normale.

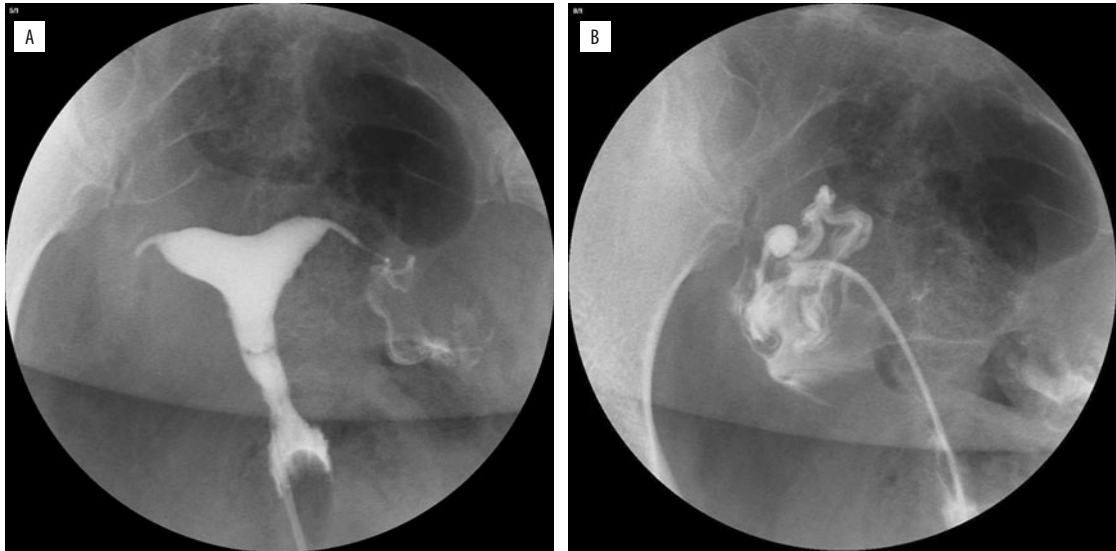


Fig. 10 – Bouchon muqueux interstitiel. a : hystérosalpingographie démontrant une obstruction franche organique de la portion proximale ; b : salpingographie sélective : trompe droite normale.

Résultats

Le cathétérisme tubaire sélectif est possible chez environ 95 % des patientes, dans 80 % de façon bilatérale ou unilatérale sur trompe unique, dans 20 % des cas de façon unilatérale (36). Les 5 % d'échecs sont dus aux malpositions utérines (rétroversion fixée en particulier), aux polypes bilatéraux de la jonction tubaire, aux polypes fibreux volumineux, aux synéchies utérines et aux sténoses infranchissables de l'endocol (41). Certaines morphologies particulières de la cavité utérine et des ostia ne peuvent être vaincues que si l'on dispose de sondes de diverses courbures, en particulier pour les trompes dites « erecta » c'est-à-dire verticales, qui nécessitent des sondes presque droites. Dans 70 % des cas, la simple opacification tubaire sous injection manuelle permet d'obtenir un passage péritonéal (42).

Deux types d'obstruction doivent être distingués.

- Les obstructions proximales courtes isolées : la recanalisation n'intéresse que la portion interstitielle de la trompe sur un court segment. Les portions isthmiques et ampullaires sont normales et le brassage péritonéal est normal. Le pronostic est excellent.
- Les sténoses irrégulières interstitielles et isthmiques sur endométriose tubaire, salpingite isthmique nodulaire ou séquelles infectieuses avec adhérences tubaires et périutérines. Dans ces cas, l'opacification est irrégulière et la portion ampillaire apparaît fixée et rigide avec effacement des plis. Le passage

péritonéal est faible et retardé voire absent. Le pronostic fonctionnel est complexe et incertain.

La recanalisation tubaire est réalisable dans 50 % des cas (36). À un an, le risque de réocclusion après recanalisation est de 50 % (36). Dans les suites d'un cathétérisme tubaire réussi, le taux de grossesse varie entre 21 et 48 % selon les séries (30, 43-45), significativement supérieur à celui de la patiente n'ayant pas bénéficié de salpingographie sélective (42), ce qui est en faveur de la théorie du bouchon muqueux dans la genèse de l'infertilité d'origine tubaire. Le taux moyen de grossesse dans la littérature est de l'ordre de 30 %, ce qui est proche de la fécondité naturelle pour un couple normal. Le taux de grossesse extra-utérine est lié à l'étendue des lésions tubaires. En cas d'obstruction proximale, ce taux est pratiquement le même que celui des femmes ne présentant pas d'anomalie tubaire. En revanche, en cas de trompes pathologiques, au niveau isthmique ou ampillaire, ce taux est nettement supérieur, de l'ordre de 15 % (44).

Le moment respectif de l'hystérosalpingographie avec cathétérisme tubaire et de la coelioscopie dans la prise en charge des pathologies tubaires, même proximales, n'est pas toujours clairement défini. Il semble qu'elles soient complémentaires (46). Hystérosalpingographie et salpingographie sélective pourraient être proposées de première intention, permettant d'obtenir un nombre de grossesses non négligeable tout en demeurant un examen relativement simple et peu agressif. En cas d'échec, une évaluation coelioscopique est alors nécessaire, mais celle-ci bénéficie alors des informations des explorations radiologiques (36, 47).

Complications de la salpingographie sélective et de la recanalisation

Le taux des complications est très faible et la mortalité est nulle en cumulant l'ensemble des séries. Les complications majeures théoriques sont :

- la rupture tubaire, mais aucun cas n'a été publié. De petites érosions de la paroi tubaire peuvent se produire lors des recanalisations difficiles. Elles n'ont en général pas de traduction clinique mais les recanalisations, en particulier, doivent être réalisées par un opérateur entraîné à la radiologie interventionnelle ;
- les complications infectieuses sont la conséquence d'une dissémination péritonéale à partir d'un salpinx réveillé et doivent être prévenues par l'antibiothérapie prescrite à type prophylactique.

Des complications mineures sont possibles, mais rares :

- les saignements postprocédure sont banals à condition d'être de faible abondance et de courte durée (24 à 48 h) ;
- lors de recanalisations réussies ou lors de procédures difficiles, qui nécessitent une mobilisation utérine et un temps d'examen un peu plus long, des douleurs abdominales et pelviennes peuvent survenir. Elles être prévenues et/ou traitées par antispasmodiques et éventuellement anti-inflammatoires (36, 44) ;
- les passages vasculaires peuvent survenir lorsque la pression d'injection est trop forte ; ils n'ont aucune incidence avec les produits de contrastes actuellement utilisés ;
- l'irradiation gonadique (48, 49) est à prendre en compte, surtout dans le cadre d'un bilan d'hypofertilité. Pour que l'irradiation soit minimale, certaines règles de bonne pratique doivent être observées :
 - réduire le temps d'exposition et la quantité de la dose ;
 - utiliser une scopie de haute résolution avec focalisation ;
 - éviter les clichés de contrôle inutiles ;
 - utiliser les agrandissements seulement si nécessaire, car la dose est alors plus importante.

Conclusion

La salpingographie sélective avec ou sans recanalisation est une technique simple dans des mains entraînées, qui comporte peu de complications. Elle permet dans plus de 80 % des cas d'hypofertilité d'origine tubaire, avec trompes non vues à l'hystérosalpingographie, d'obtenir au moins une trompe perméable. Elle doit donc être proposée en première intention, avant les techniques de micro-

chirurgie tubaire et de fécondation *in vitro*, qui de toute façon restent possibles, en cas d'hypofertilité persistante après salpingographie sélective. Elle se place naturellement avant la coelioscopie qu'elle ne peut évidemment pas remplacer. Elle est le simple prolongement d'une hystérogaphie de qualité réalisée pour bilan de stérilité quand les trompes ne sont pas opacifiées.

Références

1. Cornier E (1985) Per-celioscopic ampullosalpingoscopy. Paris, J Gynecol Obstet Biol Reprod 14: 459-66
2. Surrey ES (1999) Microendoscopy of the human fallopian tube. J Assoc Gynecol Laparosc 6: 383-9
3. Kerin JF (1996) Falloposcopy: antegrade imaging in the management of oviductal disease. J Assoc Gynecol Laparosc 3 (Suppl) 21
4. Dechaud H, Daures JP, Hedon B (1998) Prospective evaluation of falloposcopy. Hum Reprod 13: 1815-8
5. Gordts S, Puttemans P, Gordts S, Brosens I, Campo R (2005) Transvaginal laparoscopy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 19: 757-67
6. Watrelot A, Dreyfus JM, Andine JP (1999) Evaluation of the performance of fertiloscopy in 160 consecutive infertile patients with no obvious pathology. Hum Reprod 14: 707-11
7. Puttemans PJ, De Bruyne F, Heylen SM (1998) A decade of salpingoscopy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 81: 197-206
8. Marana R, Rizzi M, Muzii L et al. (1995) Correlation between the American Fertility Society classifications of adnexal adhesions and distal tubal occlusion, salpingoscopy, and reproductive outcome in tubal surgery. Fertil Steril 64: 924-9
9. Suzuki T, Shibahara H, Hirano Y et al. (2005) Feasibility and clinical significance of endoluminal assessment by transvaginal salpingoscopy during transvaginal hydro-laparoscopy in infertile women. J Minim Invasive Gynecol 12: 420-5
10. Watrelot A, Nisolle M, Chelli H et al. (2003) Is laparoscopy still the gold standard in infertility assessment? A comparison of fertiloscopy versus laparoscopy in infertility. Results of an international multicentre prospective trial: the 'FLY' (Fertiloscopy-Laparoscopy) study. Hum Reprod 18: 834-9
11. Dechaud H, Ali Ahmed SA, Aligier N et al. (2001) Does transvaginal hydro-laparoscopy render standard diagnostic laparoscopy obsolete for unexplained infertility investigation? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 94: 97-102
12. Watrelot A, Dreyfus JM, Cohen M (2002) Systematic salpingoscopy and microsalingoscopy during fertiloscopy. J Am Assoc Gynecol Laparosc 9: 453-9
13. Watrelot A, Hamilton J, Grudzinskas JG (2003) Advances in the assessment of the uterus and fallopian tube function. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 17: 187-209
14. Marconi G, Quintana R (1998) Methylene blue dyeing of cellular nuclei during salpingoscopy, a new in-vivo method to evaluate vitality of tubal epithelium. Hum Reprod 13: 3414-7
15. De Bruyne F, Puttemans P, Boeckx W, Brosens I (1989) The clinical value of salpingoscopy in tubal infertility. Fertil Steril 51: 339-40
16. Brosens I, Boeckx W, Delattin P et al. (1987) Salpingoscopy: a new pre-operative diagnostic tool in tubal infertility. Br J Obstet Gynaecol 94: 768-73
17. Marana R, Catalano GF, Muzii L (2003) Salpingoscopy Curr Opin Obstet Gynecol 15: 333-6

18. Marchino GL, Gigante V, Gennarelli G *et al.* (2001) Salpingoscopic and laparoscopic investigations in relation to fertility outcome. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 8: 218-21
19. Marana R, Catalano GF, Muzii L *et al.* (1999) The prognostic role of salpingoscopy in laparoscopic tubal surgery. *Hum Reprod* 14: 2991-5
20. De Bruyne F, Hucke J, Willers R. The prognostic value of salpingoscopy. *Hum Reprod* 1997;12(2):266-71
21. Vasquez G, Boeckx W, Brosens I (1995) Prospective study of tubal mucosal lesions and fertility in hydrosalpinges. *Hum Reprod* 10: 1075-8
22. De Graef M, Juhan V, Kassem Z *et al.* (2005) Hystérosalpingographie et cathétérisme sélectif des trompes. *Encycl Med Chir (Paris, Elsevier SAS)* 34-605 - A - 10
23. Rouanet JP, Chalut JC (1977) Une application du cathétérisme sélectif : la salpingographie. *Nouv Press Med* 31: 2785
24. J Chalut, Lemaitre G, Tubiana JM, Weill F (1980) Gynécologie. In : Fischgold H, ed. *Traité de radiodiagnostic* tome 9. Paris, Masson
25. Thurmond AS, Novy M, Uchida B, Rosch J (1987) Fallopian tube obstruction: selective salpingography and recanalization. *Radiology* 163: 511-4
26. Thurmond AS, Rosch J (1990) Nonsurgical fallopian tube recanalization for treatment of infertility. *Radiology* 174: 371-4
27. Thurmond AS (1994) Pregnancies after selective salpingography and tubal recanalization. *Radiology* 190: 11-13
28. Thurmond AS (1998) Interventional radiology in the treatment of infertility: fallopian tube catheterization. *Radiographics* 18: 919-22
29. Thurmond AS, Machan LS, Maubon AJ *et al.* (2000) A review of selective salpingography and fallopian tube catheterization. *Radiographics* 20: 1759-68
30. Thurmond AS, Cohen DJ, Geller ME *et al.* (2000) Selective salpingography and proximal tubal recanalization by community radiologist. *J Women Imaging* 2: 11-4
31. Thurmond AS, Rösch J (1990) Nonsurgical fallopian tube recanalization for treatment of infertility. *Radiology* 174: 74-9
32. Tristant H, Benmussa M (1994) Indication, technique et aspects normaux. In : Tristant H, Benmussa, eds. *Atlas d'hystérosalpingographie*. Paris, Masson : 9-34
33. Tristant H, Benmussa M (1994) Fibromyomes. In : Tristant H, Benmussa, eds. *Atlas d'hystérosalpingographie*. Paris, Masson : 93-118
34. Rouanet JP, Maubon A, Lopez FM *et al.* (1991) Salpingographie sélective et radiologie interventionnelle tubaire. *Rev Fr Gynecol Obstet* 86: 731-5
35. Maubon AJ, De Graef M, Boncoeur-Martel MP, Rouanet JP (2001) Interventional radiology in female infertility: technique and role. *European Radiol* 11: 771-8
36. Osada H, Kiyoshi Fujii T, Tsunoda I *et al.* (2000) Outpatient evaluation and treatment of tubal obstruction. *Fertil Steril* 73: 1032-6
37. Sulak PJ, Letterie G, Coddington C *et al.* (1987) Histology of proximal tubal occlusions. *Fertil Steril* 48: 437-40
38. Kerrin JF, Surrey ES, Williams DB *et al.* (1991) Falloposcopic observation of endotubal isthmus plugs as a cause of reversible obstruction and their histological characterization. *J Laparoendosc Surg* 1: 103-10
39. Letterie GS, Sakas EL (1991) Histology of proximal tubal obstruction in cases of unsuccessful tubal canalization. *Fertil Steril* 56 : 831-5
40. Tristant H, Benmussa M (1994) Diverticule, endométriose, polypes et cancer tubaires. In : Tristant H, Benmussa eds. *Atlas d'hystérosalpingographie*. Paris, Masson : 183-200
41. Lang EK, Dunaway HE (2000) Efficacy of salpingography and transcervical recanalization in diagnosis categorization, and treatment of fallopian tube obstruction. *Cardiovasc Intervent Radiol* 23: 471-422
42. Rouanet JP, Maubon A, Ferru JM, Marès P (1998) Salpingographie sélective et radiologie interventionnelle tubaire. In : Ardaens Y, Cornud F, eds. *Imagerie et infertilité du couple*. Paris, Masson : 145-51
43. Kamiyama S, Miyagi H, Kanazawa K (2000) Therapeutic value of selective salpingography for infertile women with patent fallopian tubes: the impact on pregnancy rate. *Gynecol Obstet Invest* 49: 36-40
44. Papaionnou S, Afnan M, Girling AJ *et al.* (2003) Diagnostic and therapeutic value of selective salpingography and tubal catheterization in an unselected infertile population. *Fertil Steril* 79: 613-7
45. Papaionnou S, Afnan M, Girling AJ *et al.* (2002) Long term fertility prognosis following selective salpingography and tubal catheterization in women with proximal tubal blockage. *Hum Reprod* 17: 2325-30
46. Woolcott R, Fisher S, Thomas J, Kable W (1999) A randomized, prospective, controlled study of laparoscopic dye studies and selective salpingography as diagnostic tests of fallopian tube patency. *Fertil Steril* 72: 785-95
47. Maubon A, Rouanet JP, Cover S *et al.* (1992) Fallopian tube recanalization by elective salpingography: an alternative to more invasive techniques? *Hum Reprod* 7: 1425-8
48. Nakamura K, Ishiguchi T, Maekoshi *et al.* (1996) Selective fallopian tube catheterization in female infertility: clinical results and absorbed radiation dose. *Eur Radiol* 6: 565-9
49. Karande VC, Pratt DE, Balin MS *et al.* (1997) What is the radiation exposure during a gynecoradiologic procedure? *Fertil Steril* 67: 401-3

A. Watrelot

Fertiloscopie

Introduction

Jusque dans les années 1990, tout bilan d'infertilité se terminait, lorsqu'aucune pathologie n'avait été découverte, par une coelioscopie dite « de fin de bilan ».

Peu à peu, cette pratique a disparu en raison, d'une part, des progrès considérables de la procréation assistée et, d'autre part, en raison du caractère relativement invasif de la coelioscopie non totalement dénuée de risques.

De même, l'essor de l'échographie a rendu inutile l'utilisation de la coelioscopie pour le recueil des ovocytes lors de la fécondation *in vitro* (FIV). Ce progrès majeur a néanmoins eu comme corollaire qu'il n'était plus nécessaire d'avoir une compétence chirurgicale pour traiter l'infertilité.

La question maintes fois posée dès lors était : « Est-il nécessaire de réaliser une coelioscopie dans le bilan d'infertilité ? »

La réponse assez invariablement a été : non de façon systématique, mais oui en cas de doute soit sur l'hystérosalpingographie (HSG), soit en raison d'une histoire médicale évocatrice (notion de salpingite, sérologie de *Chlamydia* positive ou chirurgie pelvienne antérieure par exemple).

En réalité, en se contentant de moyens non invasifs comme l'HSG, il a été démontré que le taux de faux négatif était important, entre 20 et 35 % dans la méta-analyse de Swart (1) même en l'absence d'antécédents évocateurs.

Dès lors, il semblait intéressant de trouver un moyen diagnostique suffisamment précis pour éviter ces faux négatifs mais sans avoir la lourdeur de la coelioscopie. De là est né le concept de l'hydrolaparoscopie transvaginale (THL) décrite par Gordts (2), que nous avons complété, modifié et baptisé fertiloscopie, il y a maintenant dix ans (3).

Le concept de fertiloscopie (4)

Nous avons défini la fertiloscopie comme l'association dans le même temps d'une hydrolaparoscopie transvaginale couplée à une épreuve de perméabi-

lité, une salpingoscopie et une microsalpingoscopie et enfin à une hystérocopie. La fertiloscopie est donc une endoscopie transvaginale, l'optique étant introduit dans le cul-de-sac de Douglas. Le milieu d'observation étant le sérum physiologique et non le CO₂ comme dans une coelioscopie.

Buts

Pour une évaluation complète des facteurs mécaniques de l'infertilité, il apparaît nécessaire de renseigner quatre paramètres que sont la perméabilité tubaire, l'environnement tubopéritonéal, la cavité utérine et la muqueuse tubaire. La fertiloscopie est finalement la seule exploration chirurgicale qui aujourd'hui permet d'évaluer avec précisions ces paramètres.

Technique

La fertiloscopie nécessite une instrumentation adaptée de façon à réaliser facilement l'intervention. Plusieurs systèmes ont été proposés, soit réutilisables (THL-Circon, États-Unis puis TVE-K Storz, Allemagne), soit à usage unique (Fertiloscopy kit-Fertility Focus Ltd., Royaume-Uni).

Notre préférence va aux introducteurs à usage unique que nous avons contribué à développer (Introducteurs FTO 1-29 et FTO 1-40, Fertility Focus Ltd., Royaume-Uni). Cette instrumentation nous semble très bien adaptée car chaque introducteur est muni, à son extrémité, d'un ballon qui évite toute sortie intempestive du cul-de-sac de Douglas en cours d'intervention, tout en autorisant un recul maximum de l'optique qui « s'appuie » sur le ballon. Par ailleurs, l'usage unique est probablement préférable dans le cadre de la chirurgie vaginale ambulatoire ou même en cabinet comme cela se pratique outre-Atlantique.

Préparation

Un mini-lavement type Normacol™ est administré à la patiente peu avant l'intervention, dans le

but d'aplatir le rectum, ce qui augmente l'espace de sécurité pour l'introduction des instruments.

Anesthésie

Il est possible de pratiquer la fertiloscopie soit sous anesthésie locale stricte, soit avec une courte anesthésie générale (du type de celle pratiquée pour le recueil d'ovocytes pour la fécondation *in vitro*).

Dans le cas d'une anesthésie locale, la technique se déroule ainsi : anesthésie du cul-de-sac vaginal postérieur à l'aide d'un gel anesthésique, type EMLA® gel. L'anesthésie de surface de la muqueuse vaginale est obtenue en 8-10 minutes. Puis un bloc paracervical est pratiqué à la Xylocaïne adrénalinée® ; 15 cc sont injectés latéralement de chaque côté, infiltrant principalement les ligaments utéro-sacrés.

La fertiloscopie peut ensuite commencer en ayant pris le soin d'ajouter un anesthésique local (Xylocaïne®) dans le sérum physiologique, préchauffée à 34-35 °C, servant à créer l'hydropéritoine.

Examen préopératoire

La fertiloscopie commence toujours par un toucher vaginal de contrôle. À ce moment, il est encore possible de renoncer si l'on dépiste une lésion passée inaperçue à la consultation (nodule endométriosique de la cloison rectovaginale ou rétroversion fixée).

Technique

Exposition du col : il est nécessaire d'utiliser un spéculum type Collin et de le positionner verrou du côté gauche de l'opérateur, cela permet lors de l'ouverture d'exposer et de « déplier » le cul-de-sac postérieur, la valve antérieure du spéculum restant au contact de la lèvre antérieure du col.

Mise en place du premier introducteur (FH 1-29 FFL) dans la cavité utérine (fig. 1). Cet introducteur permettra de réaliser l'épreuve au bleu de méthylène. Le col est saisi à l'aide d'une pince de Pozzi placée à 8 heures puis l'introducteur est passé dans le col (parfois après une légère dilatation de celui-ci).

Une fois en place le ballon est gonflé avec 3 cc d'air et le mandrin central étant retiré, l'introducteur devient souple et peut être fixé sur la cuisse de la patiente grâce au Velcro® fourni.

Création de l'hydropéritoine (fig. 2) : pour ce faire, une aiguille de Veres standard est introduite sous le col directement dans la cavité péritonéale. L'insertion se fait sur la ligne médiane, à peu près 1 cm sous le col, au niveau de la ligne de réflexion du vagin sur le col ; l'axe d'introduction étant horizontal ou un peu incliné en arrière lorsque l'utérus est rétroversé.

Il est très important de pénétrer dans l'espace péritonéal de façon ferme : tout mouvement lent risquant de créer un espace de dissection entre péritoine et vagin source de fausse route parfois difficile à récupérer (fig. 3).

Une fois en place, le sérum physiologique est instillé grâce à un perfuseur relié, d'une part à l'aiguille de Veres, d'autre part à un flacon de perfusion suspendu à une hauteur de 50-80 cm au-dessus du plan de la table. Aucune pompe n'est nécessaire et la seule gravité permet la création de l'hydropéritoine. La constatation dans le piège à bulles du perfuseur d'un bon flux liquidien signe, en règle, la bonne position de l'aiguille de Veres ; 150 à 200 cc de sérum sont ainsi instillés.

Introduction du deuxième introducteur (FTO 1-40 FFL) (fig. 4) : celui est muni d'une extrémité poin-

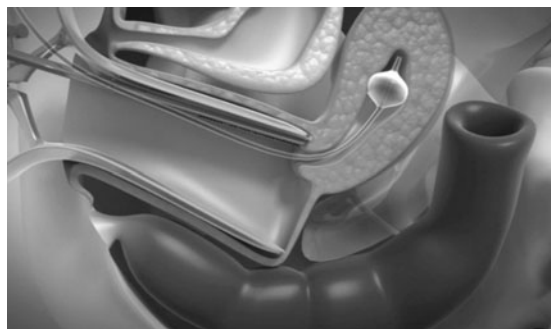


Fig. 1 – Introducteur souple dans la cavité utérine (pour l'épreuve au bleu) et exposition du cul-de-sac postérieur à l'aide d'un spéculum de Collin.



Fig. 2 – Introduction de l'aiguille de Veres.

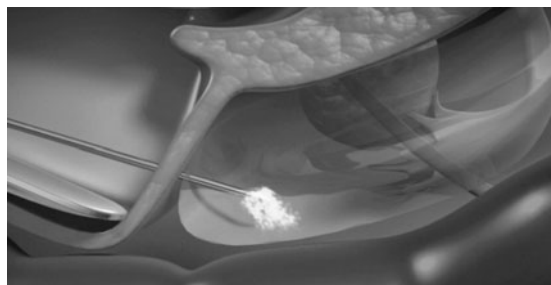


Fig. 3 – Création de l'hydropéritoine.

tue qui permet de l'insérer en lieu et place de l'aiguille de Veres sans incision complémentaire.

Une fois en place, son ballonnet est à son tour gonflé avec 5 cc d'air, son mandrin est retiré ; là aussi, la constatation d'un retour liquidien dans le canal central ou opératoire de l'introducteur signe sa bonne position (fig. 5a et 5b).

Introduction de l'optique (fig. 6) : la fertiloscopie proprement dite peut maintenant débuter. L'optique est poussée sous contrôle de la vue jusqu'à l'extrémité de l'introducteur. Le premier geste consiste ensuite à reculer l'ensemble optique-introducteur en butée arrière en s'appuyant sur le ballonnet qui empêche de sortir du cul-de-sac de Douglas et permet de déplisser celui-ci donnant une vision plus panoramique.

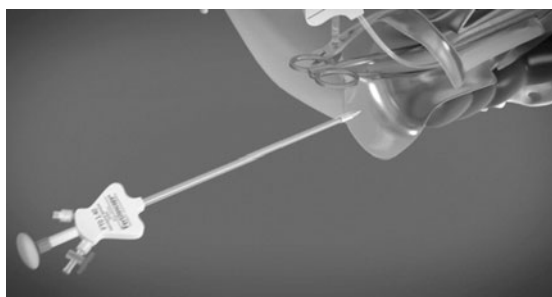


Fig. 4 – Introduction du fertiloscope.

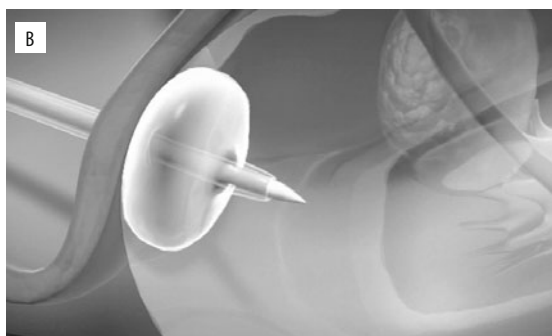
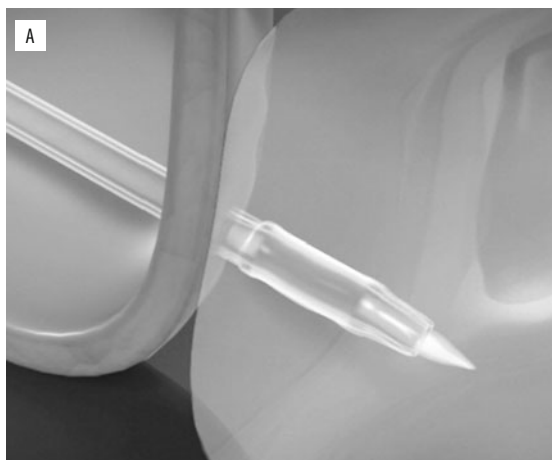


Fig. 5 a et b – Gonflage du ballonnet.

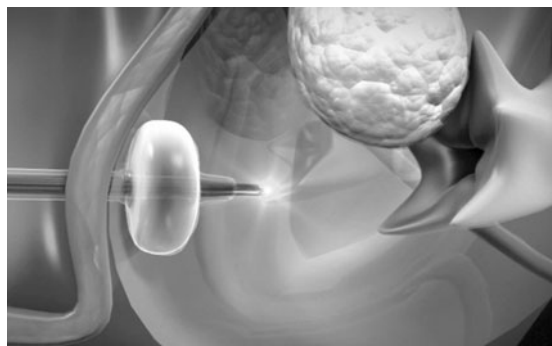


Fig. 6 – Introduction de l'optique (2,7 mm, 30°).

Ce geste paraît essentiel : s'il n'est pas effectué, l'opérateur va chercher en vain les structures génitales qui sont en fait en arrière de la lentille de son optique.

Déroulement des cinq étapes de la fertiloscopie

Hydropelviscopie

À la différence de la coelioscopie, la vision n'est pas panoramique et il faut toujours garder dans son champ de vision un élément que l'on a identifié (comme un ovaire par exemple) et à partir de celui-ci se déplacer vers un autre élément connu et ainsi de suite, grâce à la technique de l'« interface » qui consiste à avoir en permanence dans son champ de vision la limite d'un élément connu puis en le suivant passer de celui-ci à un autre élément connu sans jamais avoir cet élément en plein champ mais toujours en partie de façon à pouvoir se déplacer sans se perdre. Par ailleurs, la vision est inversée par rapport à la vision coelioscopique, ce qui nécessite un certain apprentissage (fig. 7). De même le grossissement, donné par l'optique et la proximité des structures examinées, donne une vision parfaite des détails mais aussi amplifie les anomalies : ainsi un kyste paratubaire centimétrique paraîtra très volumineux et il faut en tenir compte en comparant sa taille avec les structures environnantes connues, faute de quoi l'on s'expose à des diagnostics pathologiques par excès.

Enfin, et là aussi à la différence de la coelioscopie, la vision est totalement physiologique : ce qui

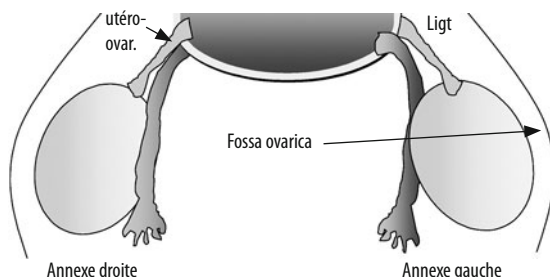


Fig. 7 – Anatomie fertiloscopique.

signifie que les divers éléments sont observés dans leur situation naturelle sans avoir à les mobiliser. Cela permet une excellente appréciation des rapports trompe-ovaire et du mécanisme de captation (« pick-up ») ovocytaire. Lorsque la fertiloscopie est pratiquée au moment de l'ovulation, la captation de l'ovule par la trompe est parfaitement visible, ce phénomène durant environ 1 heure : la trompe, par de très lents mouvements, vient « embrasser » la surface ovarienne à l'endroit de la rupture folliculaire dont le cumulus ovocytaire fait saillie.

Le caractère physiologique de l'examen rend compte également de la vision que va avoir l'opérateur : en effet la trompe apparaît en situation médiale par rapport à l'ovaire qui se trouve au contact de la *fossa ovarica*, alors qu'au cours d'une coelioscopie la trompe paraît externe. En réalité son trajet anatomique la fait partir au-dessus de l'ovaire pour se rabattre ensuite en position médiale dans ses deux tiers distaux : c'est ainsi qu'elle apparaît en fertiloscopie. L'exploration sera systématique passant d'une annexe à l'autre en passant sous la convexité utérine (c'est-à-dire la face postérieure de l'utérus).

Épreuve de perméabilité

Lorsque les différentes structures auront été reconnues, l'on réalisera l'épreuve de perméabilité, celle-ci se fera à l'aide du bleu de méthylène injecté doucement (pour éviter les spasmes tubaires), dans le canal latéral de l'introducteur utérin prévu à cet effet.

Salpingoscopie-microsalpingoscopie

C'est ensuite que la salpingoscopie peut être réalisée en introduisant doucement l'extrémité de l'optique dans le pavillon tubaire, en se souvenant qu'il s'agit d'une lentille fort oblique de 30°, il faut donc en tenir compte dans l'axe d'entrée (fig. 8).

Lorsque la fertiloscopie est pratiquée en phase folliculaire (ce qui est la règle), la trompe a en général

une rigidité suffisante pour se laisser pénétrer par l'optique. Lorsque ceci s'avère difficile ou impossible, il est possible d'introduire dans le canal opératoire de l'introducteur une pince sans griffes de 1,5 mm (5 French) de diamètre pour s'aider en saisissant le pavillon à 12 heures pour stabiliser la trompe. Une fois dans l'ampoule tubaire, il est en général possible d'aller jusqu'au niveau de la jonction isthmo-ampullaire qui bien sûr, compte tenu de son petit calibre, ne peut être pénétrée. La salpingoscopie permettra d'étudier les plis muqueux majeurs et mineurs, leur épaisseur ou leur disparition et surtout recherchera l'existence d'adhérences intra-ampullaires extrêmement péjoratives. En pratique, la salpingoscopie est souvent normale en particulier lorsque la perméabilité tubaire est bonne. C'est pour cela qu'il semble intéressant d'examiner plus avant l'aspect de la muqueuse tubaire, en utilisant un optique à grossissement (type Hamou II-Storz, Allemagne), il est possible de pratiquer la microsalpingoscopie. Pour ce faire, il suffit d'actionner la mollette située près de l'oculaire pour obtenir un grossissement de 100 fois, suffisant pour examiner la muqueuse tubaire. À ce grossissement, outre la microvascularisation particulièrement bien identifiée par le passage des globules rouges, il est possible d'évaluer la qualité de la muqueuse tubaire en appréciant le nombre de noyaux cellulaires colorés par le bleu de méthylène (fig. 9 et 10).

Chaque noyau coloré révèle une cellule anormale, inflammatoire ou en apoptose, et Marconi a démontré que plus le nombre de noyaux colorés était important moins la muqueuse était fonctionnelle (5) et partant, moins les chances de grossesse étaient importantes. Marconi a décrit quatre stades en fonction du nombre de noyaux colorés par le bleu de méthylène. À l'usage, cette distinction semble un peu artificielle et surtout subjective. Pour notre part, nous ne retenons que deux stades : normal quand aucun ou très peu de noyaux sont colorés (sur moins de trois plis muqueux différents), anormal quand beaucoup de noyaux sont colorés. Lorsque de nombreux noyaux cellulaires sont colorés, ceux-ci sont situés sur les plis muqueux et entre ceux-ci. Nous avons pratiqué des microbiopsies de ces muqueuses anormales. Celles-ci ont révélé la présence de lésions de salpingite chronique avec en particulier la présence de mastocytes entre les plis muqueux. Lorsque des mastocytes sont présents, cela permet d'affirmer que l'inflammation tubaire est toujours présente. On peut considérer ces trompes comme probablement inaptes à remplir leur fonction reproductive. Ceci traduit probablement la notion bien connue que la perméabilité tubaire est une condition nécessaire mais non suffisante pour qu'une trompe assure correctement sa fonction dans la reproduction.

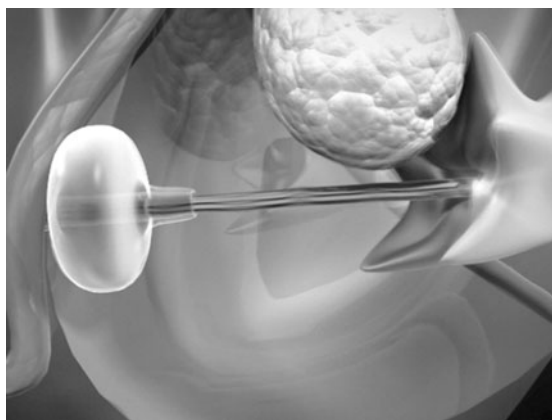


Fig. 8 – Salpingoscopie.



Fig. 9 – Microsalpingoscopie normale.

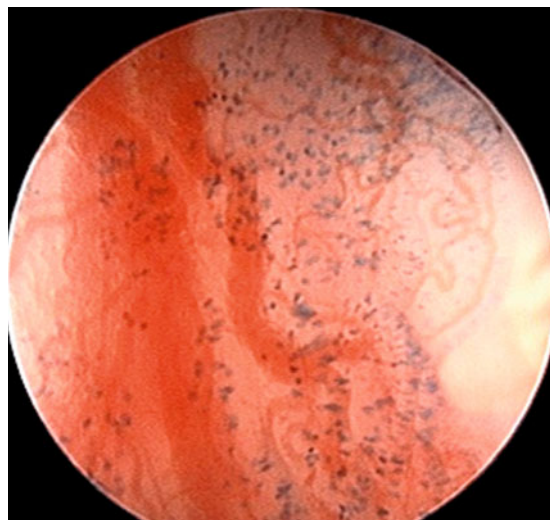


Fig. 10 – Microsalpingoscopie anormale.

Hystéroscopie

Une hystéroscopie classique, réalisée avec le même endoscope, termine toujours la procédure afin de compléter les renseignements obtenus. Certains préfèrent la faire au début, les deux techniques sont possibles.

Fertiloscopie opératoire

À l'origine, la fertiloscopie (comme la coelioscopie) était purement diagnostique. Progressivement nous avons essayé de voir si certaines interventions étaient possibles par cette voie. Pour cette raison, le fertiloscope (FH 1-40) fut muni d'un canal opératoire de 5 French autorisant un certain nombre de gestes thérapeutiques. La progression s'est faite lentement, le prérequis étant que le geste proposé devait être au moins aussi efficace que le même effectué par coelioscopie. Par ailleurs, les possibilités apparaissaient plus limitées, l'opérateur ne disposant au cours d'une fertiloscopie que d'un canal opératoire. Enfin, il était nécessaire de réaliser une chirurgie totalement exsangue car le moindre saignement dans le cul-de-sac de Douglas obscurcit très notablement la vision de l'opérateur. En pratique, évoluant en milieu liquidien, seule une coagulation bipolaire pouvait être envisagée. Plusieurs systèmes sont disponibles dans le diamètre de 5 French : aiguilles bipolaires réutilisables (Storz, Allemagne ou Ovadrill-FFL, Royaume-Uni) ou usage unique (Versapoint-Gynecare-États-Unis). En complément des moyens de coagulation bipolaire, il existe une instrumentation conventionnelle de même diamètre comprenant des ciseaux froids, des pinces à préhension et à biopsie. Les interventions possibles sont les suivantes : adhésiolyse, traitement des endométrioses et drilling

ovarien chez les patientes présentant un syndrome des ovaires micropolykystiques (OPK).

Adhésiolyse

Il est possible de réaliser un ovaro-salpingo-lysis par fertiloscopie. Celui-ci est efficace pour les adhérences situées entre la partie distale de la trompe, les ovaires et la paroi latérale du pelvis. Grâce au grossissement « naturel » de l'optique, le geste s'apparente à celui que l'on effectuait auparavant en microchirurgie classique. L'adhésiolyse commencera toujours par la coagulation des petits vaisseaux intra-adhérentiels et sera éventuellement complétée au ciseau froid.

Endométriose

Seules les lésions minimales sont susceptibles d'être traitées par coagulation. Connaissant l'importance d'un traitement complet, il paraît légitime de recourir à une coelioscopie complémentaire dès que les lésions apparaissent importantes.

Drilling ovarien

Le drilling ovarien peut être proposé chez les patientes présentant un OPK. Ce drilling, ou multiperforation ovarienne, a d'abord été décrit par laparotomie comme une variante moins agressive que la résection cunéiforme des ovaires. Par la suite, le drilling a été décrit par coelioscopie et la méta-analyse de Campo (6) a montré que les résultats étaient identiques quelle que soit l'énergie utilisée : courant monopolaire, bipolaire, ou laser. Fernandez (7) a, de ce fait, proposé de réaliser le drilling par voie fertiloscopique au moyen d'une électrode bipolaire. La technique est simple : il s'agit de réaliser le premier temps de la fertiloscopie, c'est-à-dire l'hydropelviscopie puis de repérer le ligament utéro-ovarien, (fig. 11) repère majeur, de façon à identifier de façon

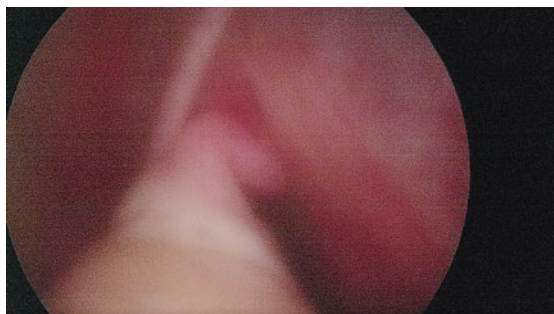


Fig. 11 – Ligament utéro-ovarien.

formelle l'ovaire (qui pourrait dans certains cas être confondu avec le sigmoïde) (8), puis de réaliser le drilling proprement dit : 4 à 8 perforations sont effectuées sur chaque ovaire.

La sonde bipolaire (en général Versapoint-Gynaecare, États-Unis) est appliquée sur la surface ovarienne ; quand le courant est délivré, l'électrode pénètre la corticale ovarienne et la constatation de bulles apparaissant à la surface signe le fait que l'électrode a atteint la medulla et que l'on peut arrêter l'application du courant bipolaire. Le temps opératoire est bref toujours inférieur à 15 minutes.

Ainsi réalisé chez les patientes présentant un OPK (selon les critères de Rotterdam) et chez lesquels le citrate de clomifène a été inefficace, on obtient un taux d'ovulation spontané de 75 % et un taux de grossesse dans les six mois de près de 60 % sans aucune grossesse multiple ni syndrome d'hyperstimulation.

Complications

Comme toute intervention chirurgicale, la fertiloscopie comporte certains risques. Ceux-ci sont en fait minimes et faciles à éviter. Le seul vrai risque est lié à la voie d'abord : il en effet possible de déplorer une effraction du rectum lorsque, soit l'aiguille de Veres, soit le fertiloscope sont insérés. La prévention de cette complication est essentiellement clinique : un toucher vaginal doit toujours être réalisé au cours de la consultation et répété au dernier moment. Toute pathologie détectée dans le cul-de-sac postérieur est une contre-indication à la fertiloscopie et devra entraîner une conversion en coelioscopie. En pratique, il s'agit soit de lésions d'endométriose du cul-de-sac de Douglas, soit de rétroversion utérine fixée ou son équivalent en cas de myome postérieur enclavé dans le cul-de-sac de Douglas. Ces contre-indications représentent 4,8 % des cas dans notre expérience. Il faut souligner qu'à la différence des perforations digestives observées en coelioscopie et d'une particulière gravité, les perforations en cours de fertiloscopie touchent le rectum dans son trajet sous-péritonéal et non dans

la cavité péritonéale. C'est pour cela que de façon constante le seul traitement de ces perforations est médical : surveillance et antibiotique (9). Tout geste chirurgical complémentaire (coelioscopie et *a fortiori* laparotomie) ne montre rien et est totalement inutile. En pratique, la majorité des perforations surviennent en début d'expérience lors des 50 premières fertiloscopies. Le taux de perforation atteint alors 0,5 à 0,8 % pour ensuite se stabiliser aux alentours de 0,2 à 0,4 %.

Enfin soulignons le risque de blessure digestive lors du drilling ovarien (le sigmoïde étant confondu avec l'ovaire) et l'impérieuse nécessité de ne commencer le drilling qu'après repérage formel du ligament utéro-ovarien.

Résultats

Dans un premier temps, il a fallu démontrer que la fertiloscopie faisait jeu égal avec la coelioscopie. Pour cela, nous avons réalisé la FLY study (Fertiloscopy versus Laparoscopy) (10). Il s'agissait d'une étude prospective, multicentrique et randomisée comparant fertiloscopie et coelioscopie chez la même patiente (seuls étaient considérés les deux premiers stades de la fertiloscopie : exploration et épreuve au bleu de méthylène, à l'exclusion de la salpingoscopie très rarement faite en routine en coelioscopie). Les résultats ont montré une concordance excellente entre fertiloscopie et coelioscopie. Il s'agissait d'ailleurs de la première étude effectuée de cette manière pour comparer deux méthodes chirurgicales.

À titre indicatif, nous rapportons notre série personnelle qui s'étale de 1998 à 2008 et qui représente une série continue de 2 500 cas (11).

Cent quarante-cinq cas (5,8 %) ont été d'emblée exclus comme présentant une contre-indication à la technique en raison soit d'une rétroversion utérine fixée, soit plus souvent d'une endométriose du cul-de-sac rectovaginal.

Sur les 2 355 cas restants, nous avons aussi enlevé les 122 cas (5,1 %) réalisés en démonstration opératoire et pour laquelle nous manquons du suivi post-opératoire. De même, nous avons retiré les 138 cas (5,8 %) de drilling ovarien qui sont pris en compte séparément, soit au total 2 095 cas analysables.

D'autre part, la salpingoscopie et la microsalingoscopie n'ont été introduites qu'en 2000, de sorte que seulement 1 646 patientes en ont bénéficié. Parmi celles-ci, la salpingoscopie a été possible pour au moins une trompe dans 1 498 cas soit 91,0 % des cas.

Nous avons divisé ces 1 498 cas en quatre groupes : – groupe I : patientes avec fertiloscopie normale et muqueuse tubaire normale à la salpingoscopie ;

- groupe II : patientes avec fertiloscopie anormale et muqueuse anormale ;
- groupe III : patientes avec fertiloscopie normale et muqueuse anormale ;
- groupe IV : patientes avec fertiloscopie anormale mais muqueuse normale.

Nous avons proposé le schéma thérapeutique suivant :

- groupe I : indication d'insémination intra-utérine (IIU) ;
- groupes II et III : indication de fécondation *in vitro* (FIV) ;
- groupe IV : indication de chirurgie réparatrice. Dans ce groupe, la chirurgie réparatrice pouvait être constituée, soit par un traitement fertiloscopique (en cas d'adhérences limitées), soit par un traitement coelioscopique (essentiellement adhésiolyse, salpingoplastie distale) soit enfin, dans de rares

cas, par un traitement par microchirurgie dans le cas d'obstruction proximale de bon pronostic.

La répartition dans les quatre groupes s'établit ainsi : groupe I, $n = 872$ (58,2 %) ; groupe II, $n = 129$ (8,6 %) ; groupe III, $n = 202$ (13,4 %) et groupe IV, $n = 295$ (19,6 %) (fig. 12).

Le suivi de ces patientes sur une période (courte) de 6 mois montre un taux de grossesse respectivement de 20,6 % dans le groupe I, 35,7 % (patientes IIU) dans les groupes II et III (patientes FIV), et 35,2 % dans le groupe IV (patientes chirurgie).

Il est intéressant de noter que, lorsque la sélection est précise, le groupe IV (chirurgie) fait « aussi bien » que les groupes II et III (FIV).

Ainsi, la fertiloscopie, bien loin d'être en « compétition » avec la FIV, apparaît comme un outil d'aide à la décision (fig. 13), permettant d'orienter plus vite et mieux les patientes infertiles (12).

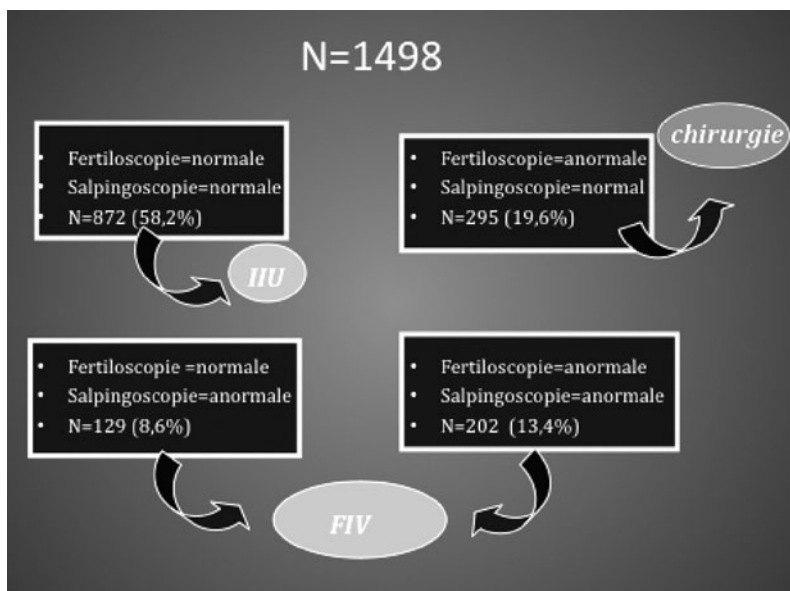


Fig. 12 – Répartition de l'effectif ($n = 1\,498$).

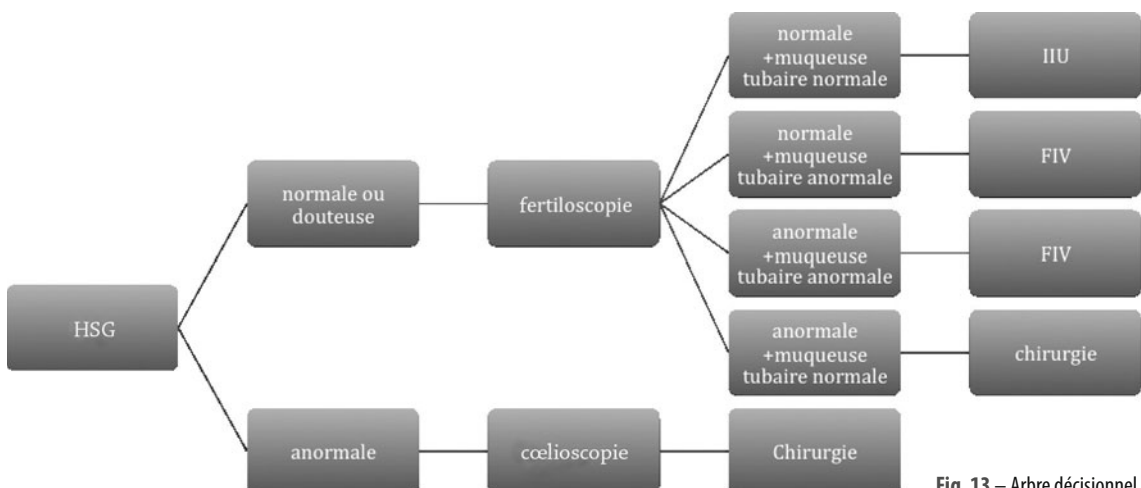


Fig. 13 – Arbre décisionnel.

Perspectives

La fertiloscopie a maintenant dix ans ; c'est le minimum nécessaire pour voir une technique se diffuser et commencer à s'imposer. Par ailleurs, l'ère du « tout FIV » des années 1990-2000 n'a pas contribué à rendre cette technique populaire.

Néanmoins, de plus en plus de patientes souhaitent, si possible, éviter la lourdeur et le caractère artificiel de la FIV et sont donc très ouvertes à bénéficier d'une méthode qui pourra, dans certains cas, leur permettre d'éviter de recourir à la FIV. De même, lorsque le bilan de base n'a rien découvert, le diagnostic d'infertilité inexplicée est très difficile à porter par ces patientes, de sorte qu'elles sont très demandeuses pour que tout soit mis en œuvre pour essayer de mettre un diagnostic (et donc un traitement) sur leur infertilité. Reste le problème de la formation des chirurgiens : la fertiloscopie n'est pas une technique difficile, elle demande néanmoins, comme toute technique chirurgicale nouvelle, un apprentissage. Cet apprentissage est court et l'on considère que la réalisation de cinq ou six fertiloscopies est suffisante pour acquérir la technique de base. Une quinzaine de fertiloscopies semble nécessaire pour pratiquer, en routine, la salpingoscopie.

Conclusion

Depuis 10 ans, la fertiloscopie a évolué : de purement diagnostique elle est devenue également thérapeutique (13). Dans l'avenir, il est probable que les développements du NOTES (*natural orifice surgery*) (14), auxquels la fertiloscopie est associée, permettront d'aller plus loin dans les possibilités thérapeutiques.

Enfin, au plan diagnostique, la possibilité de réaliser la fertiloscopie sous stricte anesthésie locale laisse entrevoir la possibilité que la fertiloscopie se substitue aux moyens d'investigation classique comme l'HSG.

Cette approche est privilégiée par les Anglo-Saxons (en particulier aux États-Unis), la fertiloscopie étant pratiquée chez eux en « office surgery ».

Références

1. Swart P, Mol BW, Van Beurden M *et al.* (1995) The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *Fertil Steril* 6: 486-91
2. Gordts S, Campo R, Rombauts L, Brosens I (1998) Transvaginal hydrolaparoscopy as an outpatient procedure for infertility investigation. *Hum Reprod* 13: 99-103
3. Watrelot A, Gordts S, Andine JP, Brosens I (1997) Une nouvelle approche diagnostique : la fertiloscopie. *Endomag* 21: 7-8
4. Watrelot A, Dreyfus JM, Andine JP (1999) Evaluation of the performance of Fertiloscopy in 160 consecutive infertile patients with no obvious pathology. *Hum Reprod* 14: 707-11
5. Marconi G, Quintana R (1998) Methylene blue dyeing of cellular nuclei during salpingoscopy, a new in vivo method to evaluate vitality of tubal epithelium. *Hum Reprod* 13: 3414-7
6. Campo S (1998) Ovulatory cycles, pregnancy outcome and complications after surgical treatment of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Surv* 53: 297-308
7. Fernandez H, Watrelot A, Alby JD *et al.* (2004) Fertility after ovarian drilling by transvaginal fertiloscopy for treatment of polycystic ovary syndrome. *J Assoc Gynecol Laparosc* 11: 374-8
8. Chiesa-Montadou S, Rongier C, Garbin O, Nisand I (2003) À propos de deux complications au cours du drilling ovarien par fertiloscopie. *Gyn Obst Fertil* 31: 844-6
9. Gordts S, Watrelot A, Campo R, Brosens I (2001) Risk and outcome of bowel injury during transvaginal pelvic endoscopy. *Fertil Steril* 76: 1238-41
10. Watrelot A, Nisolle M, Hocke C *et al.* (2003) Is laparoscopy still the gold standard in infertility assessment? A comparison of Fertiloscopy versus laparoscopy in infertility. *Hum Reprod* 18: 834-9
11. Watrelot A, Dreyfus JM (2008) Fertiloscopy. *Encycl Med Chir (Paris, Elsevier SAS). Techniques chirurgicales – Gynécologie* : 41-517
12. Watrelot A (2007) Place of transvaginal fertiloscopy in the management of tubal factor disease. *RBMonline* 15: 389-95
13. Tanos V, Bigatti G *et al.* (2005) Transvaginal endoscopy: new technique evaluating female infertility. Three Mediterranean countries' experiences. *Gynecol Surg* 2: 241-3
14. Marescaux J, Dallemagne B, Perretta S *et al.* (2007). Surgery without scars: report of transluminal cholecystectomy in a human being. *Arch Surg* 142: 823-6; discussion 826-7

A. Fauconnier, G. Legendre
et B. Paillusson

Myomes et infertilité

Introduction

Les myomes utérins sont présents chez 20 à 50 % des femmes en âge de procréer (1). La découverte, dans le bilan d'infertilité, d'un myome isolé ou associé à d'autres facteurs est ainsi devenue une situation fréquente en pratique clinique qui suscite deux questions principales :

- les myomes utérins (en fonction de leur symptomatologie, de leur situation et/ou de leur taille) diminuent-ils les chances de procréation du couple ? Ont-ils des conséquences sur le déroulement des grossesses ?
- l'ablation de ces myomes restaure-t-elle la fertilité ? Quelles sont les conséquences de la chirurgie des myomes sur la fertilité et le déroulement des grossesses ?

Après quelques rappels épidémiologiques et physiopathologiques sur la relation entre myome et infertilité, nous étudierons l'influence des myomes sur la fertilité spontanée d'une part et en procréation médicalement assistée (PMA) d'autre part. Ensuite, nous étudierons l'impact de la prise en charge thérapeutique des myomes sur la fertilité : pour la myomectomie, pour le traitement médical et pour l'embolisation. Une dernière partie intéressera les principaux effets secondaires et complications éventuelles des différents traitements. Enfin, une synthèse proposera une stratégie de prise en charge des myomes dans le cadre de l'infertilité en fonction des caractéristiques des myomes et des patientes.

Une revue de la littérature a été effectuée à partir de la banque de données Medline jusqu'au 1^{er} mai 2009, à partir des mots clés « myomas », « fibromas » et « infertility », recensant les méta-analyses, les essais cliniques, les revues de la littérature, les recommandations pour la pratique clinique dans les revues de langue anglaise ou française.

Épidémiologie

Prévalence des myomes chez les femmes infertiles

La prévalence exacte des myomes chez les femmes infertiles n'est pas connue. En effet, dans la plupart des séries de populations infertiles l'existence d'un myome utérin n'est ni recherchée ni comptabilisée comme cause de l'infertilité (2, 3). Dans d'autres études, il n'est comptabilisé que lorsqu'il s'agit de la seule anomalie retrouvée, ce qui est rarement le cas.

Dans les études de prévalence faites avant PMA, l'existence d'un myome est retrouvée dans 4 à 19 % des cas (4-6). Ce taux est au mieux équivalent à celui observé en population générale (7, 8). Cette absence de différence s'explique vraisemblablement par une sélection des patientes. En effet, dans certains centres de PMA, les myomes sont systématiquement opérés avant la réalisation d'une fécondation *in vitro* (FIV) ou d'une *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) lorsqu'ils sont trop volumineux ou qu'ils déforment la cavité (4, 5). Par ailleurs, il est possible qu'une partie des patientes porteuses de myomes et présentant une infertilité conçoivent spontanément après une intervention chirurgicale. Ainsi, pour plusieurs auteurs, les myomes utérins ne seraient reconnus comme seule cause d'infertilité au sein d'une population de femmes infertiles que chez 1 à 2 % des patientes (1, 9, 10).

Prévalence de l'infertilité chez les femmes porteuses de myome

En population générale, la prévalence de l'infertilité, définie comme au moins un an de désir de grossesse sans conception, est estimée entre 10 et 15 % (11).

Pour les femmes porteuses de myomes ayant nécessité une intervention chirurgicale, l'analyse

de plusieurs études montre l'existence d'un excès de risque d'infertilité. Un auteur retrouve 40 % d'infertilité sur une série consécutive de patientes opérées pour myome utérin (12). Buttram, dans sa méta-analyse portant sur 1 698 patientes opérées, retrouve 27 % d'infertilité (9). Il convient cependant d'être prudent dans l'interprétation de ces chiffres. En effet, les promoteurs de la myomectomie présentent cette technique comme préservant ou améliorant la fonction reproductrice des patientes. Ceci peut être à l'origine d'un biais de publication.

Un auteur retrouve, sur une population de 60 femmes enceintes porteuses de myomes non opérés, 43 % d'infertilité supérieure à deux ans (13).

L'existence d'une telle association entre myome et infertilité peut, au moins partiellement, s'expliquer par l'âge des femmes au moment de la conception du fait que l'incidence des myomes augmente avec l'âge (7).

Impact des myomes sur la fertilité en procréation spontanée

Seule l'étude quasi randomisée de Bulletti (14), qui compare une population de femmes infertiles porteuses de myomes à une population de femmes infertiles sans myome existe dans la littérature (tableau I). Le taux de conception est significativement diminué en cas de myomes (11 % de taux de conception *vs* 25 % ; $p = 0,02$). Cette étude, qui souffre cependant d'un manque de précision sur la taille, le nombre et la localisation des myomes, permet de démontrer la responsabilité des myomes sur la fertilité en cas de procréation spontanée.

Impact des myomes sur la fertilité en procréation médicalement assistée

Les techniques de PMA sont des modèles très utiles pour mettre en évidence l'impact des myomes sur l'infertilité. En effet, les techniques de fécondation *in vitro* (FIV et/ou ICSI), qui s'affranchissent des problèmes de stérilité tubaire, des problèmes endocriniens et d'interaction avec la glaire cervicale, peuvent permettre d'approcher l'influence des myomes sur le taux d'implantation. En revanche, le modèle de la FIV ne permet pas d'évaluer l'impact des myomes sur la migration spermatique et le transport embryonnaire.

Ainsi, depuis l'étude quasi expérimentale « historique » de Stovall (4), qui retrouve une diminution du taux d'implantation, du taux de grossesse clinique et du taux de grossesse viable chez les patientes porteuses de myomes, l'hypothèse de la causalité

de certains myomes dans l'infertilité est fortement suggérée.

La méta-analyse de Donnez compare les résultats de FIV de patientes porteuses de myomes déformant la cavité, de patientes porteuses de myomes ne déformant pas la cavité et de patientes sans myome (groupe contrôle) (15). Le taux de grossesse chez les patientes avec myomes déformant la cavité est significativement plus bas que celui des patientes porteuses de myomes sans déformation cavitaire (taux de grossesse 9 % *vs* 29,1 %) et que celui du groupe témoin (25 %).

L'influence des myomes sur la fertilité est confirmée par la méta-analyse plus récente de Pritts qui regroupe 23 séries et qui retrouve une diminution significative du taux de grossesse, du taux d'implantation et un taux plus important de fausse couche spontanée en présence de myomes (toutes localisations et tailles confondues) (16). La baisse du taux d'implantation est retrouvée dans le sous-groupe myomes sous-muqueux, mais également dans le sous-groupe des myomes ne retentissant pas sur la cavité utérine en comparaison avec une population de patientes sans myome (16). En revanche, les patientes porteuses de myomes sous-séreux ne présentent pas de différence significative en termes de fertilité par rapport à la population témoin (16).

Si l'effet des myomes intramuraux sur la fertilité semble démontré (4, 6, 17-22), le problème réside dans la caractérisation des myomes intramuraux (taille, nombre, et surtout présence ou absence de ménorragie) qui n'est pas toujours précisée dans les différentes études sélectionnées (tableau I).

L'étude récente d'Oliveira montre que les myomes interstitiels diminuent les taux de succès en FIV quand ils mesurent plus de 4 cm mais ne modifient pas les résultats lorsqu'ils mesurent moins de 4 cm, les auteurs suggérant ainsi un effet seuil de la taille du myome (23).

Physiopathologie

Différentes hypothèses physiopathologiques

De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer la relation myome-infertilité : altération de la qualité de l'endomètre (1, 24-26) ; distorsion ou agrandissement de la surface endométriale (6, 27) ; modification de la contractilité du myomètre (1, 8, 25) ; modifications vasculaires liées à la présence du myome (25, 28) ; modifications des rapports tubo-ovariens (6) ; obstruction des ostia tubaires ou du défilé cervico-isthmique (6, 25,

Tableau I – Principales études avec un groupe contrôle de patientes infertiles non porteuses de myomes étudiant l'impact des myomes sur la fertilité en procréation spontanée et en procréation médicalement assistée.

Étude	Design de l'étude	Traitement de l'infertilité	Nombre de myomes	Type de myome étudié	Taille des myomes	Nombre de myomes/patiente	Critères d'évaluation	Effet du myome
Bernard (2000) (98)	R	NR	31	IM	10-50 mm	1,4	TC	NS
Bulletti (1999) (14)	P	Procréation naturelle	106	SS/SM/IM	NR	NR	TG	11 vs 42 % ($p = 0,001$)
Check (2002) (17)	P	PMA (ICSI/FIV)	61	SM, IM	< 50 mm	1-7	TG	NS
Dietrich (2000) (19)	R	PMA	8	IM, SS	6-26 mm	1-6	TG, TC	NS
Eldar-Geva (1998) (22)	R	PMA (FIV/ICSI)	88	SM, IM, SS	SS (principal = 22), IM (23,7), SM (44,8)	SS (1,3), IM (1,8), SM (2,7)	TI TG	-SS vs contrôle : NS -SM et IM vs contrôle : S
Farhi (1995) (20)	R	PMA (FIV)	46	SM, IM/SS	NR	NR	TG TI TFCS	NS
Gianaroli (2005) (99)	R	PMA (FIV/ICSI)	75	IM, SM	19-48 mm	1-7	TI TG	vs 26,5 % ($p < 0,05$) NS
Hart (2001) (21)	P	FIV/ICSI	112	IM	< 50 mm	1-4	TI TG	11,9 vs 22 % ($p = 0,018$) 23,3 vs 34,4 % ($p = 0,016$)
Klatsky (2007) (100)	R	Don d'ovocytes	94	IM/SS sans retentissement sur cavité utérine	NR	NR	TI TG	vs 38 % NS vs 54 % NS
Ng (2002) (101)	P	FIV/ICSI	77	IM, SS sans retentissement sur cavité utérine	10-60 mm	1-6	TI TG	NS
Oliveira (2004) (23)	R	ICSI	250	SS/IM, IM, SS	4-69 mm	1-4	TG TI	myome SS ou IM < 4 cm (NS) IM > 4 cm ($p < 0,05$)
Ramzy (1998)* (6)	R	FIV/ICSI	44	IM, SS	IM (moy = 32), SS (moy = 38)	1,2	TG TI TFCS	NS
Seoud (1992) (5)	R	FIV	11	SS, IM	NR	NR	TG TFCS	20 % vs 17 % (NS) 50 % vs 34 % (NS)
Stovall (1998) (4)	P	FIV	91	IM, SS	Moy = 24,2 mm	1,8	TG	53 % vs 44 % ($p < 0,05$)
Surrey (2001) (18)	R	FIV/ICSI	NP cycles	IM	NR	NR	TI	NS

Étude	Design de l'étude	Traitement de l'infertilité	Nombre de myomes	Type de myome étudié	Taille des myomes	Nombre de myomes/patiente	Critères d'évaluation	Effet du myome
Wang (2001) (102)	P	Stimulation simple	34	SM, IM, SS	NR	NR	TG	NS
Wang (2004) (103)	P	Don d'ovocytes	49	SS/IM	< 30 mm	NR	TFCS	NS
Yarali (2002) (104)	R	ICSI	108	IM, SS	5-100 mm	1-8	TG TI	NS

P : Étude prospective ; R : Étude rétrospective ; SM : sous-muqueux, IM : intramural ; SS : sous-séreux ; NR : non renseigné ; TG : taux de grossesse ; TI : taux d'implantation ; TFCS : taux de fausse couche spontanée ; TC : Taux de conception ; S : significatif ($p < 0,05$) ; NS : non significatif ($p > 0,05$).

29-31). Parmi ces multiples hypothèses certaines sont plausibles car elles sont fondées sur des arguments expérimentaux.

Anomalies de la contractilité utérine

L'enregistrement des contractions utérines à l'aide de microcapteurs de pression chez des femmes saines et chez des femmes porteuses de myome a été réalisé par Losif (32). Cet auteur met ainsi en évidence des anomalies de la contractilité utérine (hypo- ou hypercontractilité). Ces anomalies pourraient s'expliquer par : l'effet propre du tissu myomateux qui est lui-même impropre à la contraction ; un effet d'irritation du myomètre adjacent en rapport avec des phénomènes inflammatoires et dégénératifs du tissu myomateux (8) ; la distension de la cavité en rapport avec la présence d'un myome intracavitaire ; la production anormale de prostaglandines par le tissu myomateux lui-même ou l'endomètre avoisinant. La contractilité utérine normale participe au transfert des spermatozoïdes et au transfert ou la nidation de l'œuf fécondé (9, 33). De cette façon, un myome pourrait ainsi gêner le transfert des gamètes ou l'implantation de l'œuf.

Altérations de la muqueuse utérine en rapport avec le développement des myomes

Une étude anatomo-pathologique sur 30 utérus myomateux, porteurs d'au moins un myome sous-muqueux, met en évidence des altérations de l'endomètre à la surface et à distance des fibromes (26). Les altérations sont polymorphes et différents types peuvent coexister dans une même cavité. Elles sont faites principalement d'atrophie muqueuse, mais également d'hyperplasie glandulaire et d'adénomyose superficielle. Ces lésions pourraient résulter de phénomènes mécaniques et hormonaux (26). Les altérations de l'endomètre

associées aux myomes pourraient ainsi gêner l'implantation de l'œuf.

Anomalies de la vascularisation de l'utérus

Plusieurs études contrôlées retrouvent une vascularisation anormale du tissu myomateux et du myomètre sain adjacent (28, 34). L'existence de dilatations veineuses focales ou diffuses de l'endomètre a été mise en évidence. Ces ectasies sont en rapport avec la présence de myomes au sein du myomètre gênant le retour veineux (28). De telles anomalies expliquent la survenue de ménorragies en l'absence de lésion intracavitaire, en particulier dans le cas des myomes interstitiels et sous-séreux ne déformant pas la cavité.

Obstruction cornuale

L'obtention de grossesses après traitement de myomes situés dans les cornes utérines suggère fortement leurs responsabilités dans certaines infertilités (28-31). De tels myomes peuvent ainsi obstruer totalement ou partiellement la portion interstitielle de la trompe et ainsi gêner la fertilité.

Discussion et déductions anatomopathologiques

La relation de causalité entre ces différentes anomalies observées et la présence de myomes utérins est probable. En revanche, l'observation de telles anomalies associées à la présence de myomes ne permet en rien de démontrer leur responsabilité dans l'infertilité. Il nous semble cependant vraisemblable que tous ces mécanismes puissent jouer un rôle pour diminuer la fertilité. Chez une patiente donnée, porteuse d'un myome présentant des caractéristiques anatomiques précises, l'un ou l'autre de ces mécanismes pourrait jouer un rôle prépondérant pour expliquer l'infertilité car les

myomes sont susceptibles d'interférer avec la fertilité à toutes les étapes qui aboutissent à une grossesse clinique (transfert des gamètes, fécondation, implantation, développement de la grossesse).

Résultats des thérapeutiques des fibromes sur l'infertilité

Efficacité de la myomectomie

Résultats sur la fertilité

Afin de démontrer l'efficacité de la myomectomie l'idéal serait de disposer de plusieurs larges études prospectives contrôlées randomisées comparant la fertilité des patientes porteuses de myomes opérées à un groupe témoin de patientes porteuses de myomes non opérées.

Actuellement, seul l'essai contrôlé randomisé de Casini, qui compare l'effet de la myomectomie dans une population de patientes infertiles à l'abstention thérapeutique en procréation naturelle (35), et l'étude quasi randomisée de Bulletti (14) existent dans la littérature. Si l'étude de Bulletti (14) retrouve un taux de grossesse significativement plus élevé après myomectomie par coelioscopie en comparaison avec un groupe témoin de patientes non opérées porteuses de myomes, l'étude de Casini ne retrouve pas d'amélioration significative du taux de grossesse après myomectomie ni pour les myomes intramuraux purs, ni pour les myomes sous-séreux. En revanche, en cas de myomes sous-muqueux (43 % *vs* 27 %, $p < 0,05$) ou intramuraux à composante sous-muqueuse (36 % *vs* 15 %, $p < 0,05$), la myomectomie démontre un bénéfice vis-à-vis de l'abstention thérapeutique (35).

La méta-analyse récente de Pritts recense sept études qui s'intéressent à l'effet de la myomectomie : quatre comparent une population de patientes porteuses de myomes non opérées à une population de patientes porteuses de myomes ayant été opérées (5, 14, 35, 36), les trois autres comparent l'efficacité de la myomectomie à une population de femmes infertiles sans myomes (tableau II).

Cette méta-analyse qui intègre les deux études précédemment citées (14, 35) retrouve un taux de grossesse significativement augmenté [(RR = 2,034 ; [(1,081-3,826)]] après myomectomie pour les myomes sous-muqueux (16). En revanche, en cas de myome intramural, cette méta-analyse ne permet pas de mettre en évidence un effet bénéfique de la myomectomie [(RR = 3,765 ; [(0,47-30,14)]] ne confirmant ainsi pas les résultats de l'étude quasi expérimentale de Bulletti (14). Ainsi, si une diminution du taux de grossesse existe en cas de

myomes intramuraux par rapport à une population témoin, la myomectomie ne permet pas de restaurer la fertilité par rapport à l'abstention. Ces résultats doivent être néanmoins nuancés, d'une part, par les travaux de Bulletti (14, 36) et, d'autre part, par les séries rétrospectives.

En effet, une seconde étude prospective plus récente de Bulletti démontre l'intérêt de la myomectomie en cas de myomes intramuraux de grande taille (> 5 cm) sur une population de patientes en PMA (FIV ou ICSI). Ainsi, les patientes ayant bénéficié d'une myomectomie présentent des taux significativement augmentés de conception (33 % *vs* 15 %, $p < 0,05$) et un taux de grossesse à terme (25 % *vs* 12 %, $p < 0,05$) (36). De plus, plusieurs études rétrospectives retrouvent un taux de conception moyen supérieur à 50 % (37-45) après myomectomie chez des patientes « infertiles », superposable au taux de grossesse de 48 % retrouvé dans la méta-analyse de Donnez après myomectomie (par hystéroscopie, par laparotomie ou laparoscopie) (15). Ce taux de conception est identique, que l'intervention soit effectuée par laparotomie ou par coelioscopie (tableau III) (37).

En revanche, le taux de conception semble lié à l'existence de facteurs d'infertilité associés. Ainsi, dans notre expérience, il est de 69,9 % en l'absence de facteur d'infertilité associé et de 31,5 % en présence d'un ou plusieurs facteurs ($p < 0,001$) (43). La présence de facteurs d'infertilité associés doit, de ce fait, nuancer les indications chirurgicales, ce d'autant que les adhérences postopératoires peuvent aggraver le pronostic de fertilité.

Facteurs prédictifs de succès ou d'échec de la myomectomie

Toutes les études retrouvent un bénéfice réel en cas de myome comme seul facteur d'infertilité (taux de conception variant de 61 à 76 %) alors que l'efficacité de la myomectomie est discutable en cas de facteurs d'infertilité associés (taux de conception variant de 24 à 38 %) (40, 41, 43, 46).

Certains facteurs, non directement impliqués dans la réalisation de la myomectomie, peuvent avoir une influence sur le taux de grossesse (47). Ainsi, l'âge supérieur à 35 ans, une durée d'infertilité de plus de deux ans, l'association à d'autres facteurs d'infertilité (pathologie tubaire, ovarienne, infertilité masculine) et la localisation postérieure des myomes semblent diminuer les taux de grossesse (47-50). En présence de ménométrorragies, la myomectomie semble en revanche améliorer franchement le taux de grossesse (48). Certains facteurs inhérents aux myomes, tels que la taille du plus volumineux, le nombre total de myomes réséqués et le retentissement intracavitaire du myome, ne semblent pas avoir d'influence sur le taux de grossesse postopératoire (47-49).

Tableau II – Principales études avec groupe contrôle étudiant l'impact de la myomectomie sur la fertilité.

Étude	Type	Groupe contrôle	Design	Traitement de l'infertilité	Nombre de myomes	Type de myome étudié	Taille des myomes	Nombre de myomes/patiente	Type de myomectomie	Critères d'évaluation	Effet myomectomie
Bulletti (2004) (36)	P	Patientes infertiles porteuses de myomes	Chirurgie vs Abstinence	PMA	84	SS, IM	Au moins 1 > 50 mm	1-5	MPC	TG	33 % vs 15 % <i>p</i> < 0,05
Bulletti. (1999) (14)	P	Patientes infertiles avec et sans myomes	Chirurgie vs Abstinence et Chirurgie vs témoins infertiles sans myomes	0	106	IM, SS	NR	NR	MPC	TG	11 % vs 42 % <i>p</i> = 0,001
Casini (2006) (35)	ECR	Patientes porteuses de myomes	Chirurgie vs Abstinence	0	170	SM, IM	NR	NR	HSC	TG	NS
Narayan (10)	P	Patientes infertiles sans myome	Chirurgie vs témoins infertiles sans myome	FIV	28	SM	NR	NR	HSC	TG TFCS	vs 26,3 % (<i>p</i> < 0,05) 23,1 vs 15,8 % (NS)
Seoud (1992) (5)	R	Patientes infertiles sans myome et patientes infertiles porteuses de myomes	Chirurgie vs Abstinence et Chirurgie vs témoins infertiles sans myome	FIV	11	SM, IM, S	NR	NR	MPL, HSC	TG TFCS	20 % vs 17 % (NS) 50 % vs 34 % (NS)
Surrey (2005) (105)	R	Patientes infertiles sans myome	Chirurgie vs témoins infertiles sans myome	FIV/ICSI/Don d'ovocytes	101	SM, IM, SS	14-68 mm	1-4	MPL, HSC	TG	NS
Varasteh (1999) (106)	R	Patientes infertiles sans myome	Chirurgie vs témoins infertiles sans myome	NP	36	SM	> 20 mm	NR	HSC	TG TFCS	S NS

P : Étude prospective ; R : Étude rétrospective ; ECR : essai contrôlé randomisé ; SM : sous-muqueux ; IM : lintramural ; SS : sous-séreux ; NR : non renseigné ; TG : taux de grossesse ; TI : taux d'implantation ; TFCS : taux de fausse couche spontanée ; TC : taux de conception ; HSC : hystérectomie ; MPC : myomectomie par celioscopie ; S : significatif (*p* < 0,05) ; NS : non significatif (*p* > 0,05).

Tableau III – Taux de conception après myomectomie par laparotomie ou cœlioscopie et principaux facteurs pronostiques sur la fertilité.

Études	Type d'étude	Analyse multivariée	Nombre de cas	Type de l'intervention	Taux de conception	Facteurs prédictifs de succès de la myomectomie	Facteurs prédictifs d'échec de la myomectomie
Vercillini, 1998 (41)	Méta-analyse	-	138	MPL	57 %		Âge > 35 ans Infertilité > 2 ans Association à d'autres facteurs d'infertilité
Li, 1999 (42)	R	Oui	51	MPL	57 %		Association à d'autres facteurs d'infertilité
Seracchioli, 2000 (37)	P	Non	65/65	MPL/MPC	56 %/54 %	-	-
Fauconnier, 2000 (48)	R	Oui	91	MPC	53 %	Ménoménoragies-	Localisation postérieure Association à d'autres facteurs d'infertilité
Dessole, 2001 (50)	R	Oui	103	MPC	41 %	Âge < 35 ans Infertilité < 3 ans	Association à d'autres facteurs d'infertilité
Rossetti, 2001 (40)	R	Non	29	MPC	65 %	-	-
Di Gregorio, 2002 (44)	R	Non	148	MPC	50 %	-	-
Donnez, 2002 (15)	Méta-analyse	-	MPL/MPC	1255	49 %		Âge > 35 ans Association à d'autres facteurs d'infertilité
Malzoni, 2003 (70)	R	Non	38	MPC	55 %	-	-

P : prospective ; R : rétrospective ; MPC : myomectomie par cœlioscopie ; MPL : myomectomie par laparotomie.

Efficacité du traitement médical

Le traitement médical fait appel essentiellement aux analogues de la *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH), au danazol, aux *selective estrogen receptor modulators* (SERMs) et *selective progesterone receptor modulators* (SPRMs) et à la mifépristone (51). Ces médicaments ne permettent pas la disparition des myomes mais ont un effet suspensif. Les analogues de la GnRH sont les mieux évalués et sont probablement les plus efficaces, avec un effet d'une part sur le volume des myomes et d'autre part sur les saignements (52). Une autorisation de mise sur le marché leur est accordée en tant que « traitement adjuvant pour préparer un geste chirurgical ». Les effets secondaires liés à l'hypoestrogénie induite leur interdisent une utilisation prolongée. Même si plusieurs cas de conceptions spontanées après plusieurs mois d'agonistes de la GnRH dans le cas de myomes interstitiels cornuaux occlusifs ont été rapportés, les traitements médicaux actuellement disponibles sont incompatibles avec la fonction de reproduction du fait de leur interaction avec l'axe hypothalamo-

hypophyso-ovarien, et ne sont donc pas adaptés aux femmes jeunes désireuses de grossesse.

Efficacité de l'embolisation

Principes de l'embolisation

L'embolisation utérine est une technique de radiologie interventionnelle utilisée depuis 1995 pour le traitement des myomes utérins symptomatiques (53). Elle consiste à occlure les artères utérines grâce à des particules non résorbables (alcool de polyvinyl [PVA], microsphères calibrées de tris-acryl, coils, colles acryliques), entraînant une dévascularisation définitive des myomes. L'artère utérine augmentée de calibre vascularise à la fois les myomes et le myomètre normal. Dans les myomes interstitiels, l'artère utérine donne naissance à un réseau périphérique qui entoure le myome : c'est le plexus péri-myomateux. Les branches artérielles de ce plexus ont un diamètre de 500 à 900 μm et constituent la cible de l'embolisation. Les artères destinées au myomètre sain sont de plus petite taille.

Les résultats de grandes séries prospectives et d'essais randomisés comparatifs avec la chirurgie confirment l'efficacité de l'embolisation des myomes utérins, d'environ 85 % sur les symptômes hémorragiques ou de compression, avec un taux de complications faible de l'ordre de 5 % (53-55).

Perspectives de l'embolisation des myomes utérins

Initialement, la technique d'embolisation standard consistait en l'occlusion complète des deux artères utérines par des particules de PVA, souvent associées à des fragments de gélatine ou à des coils (56). Ces particules avaient tendance soit à s'agréger, entraînant une occlusion artérielle plus proximale qu'attendue, soit à former des débris de plus petite taille que la taille théorique, entraînant une migration plus distale pouvant léser le myomètre, l'endomètre ou les annexes (57, 58).

Depuis 2003, des modifications de la technique d'embolisation ont été introduites avec succès pour diminuer le taux de complications (57). Elles consistent d'une part en une embolisation ciblée du plexus artériel périmyomateux, et d'autre part en l'utilisation de microsphères de tris-acryl parfaitement calibrées de plus de 500 µm de diamètre. Cette nouvelle stratégie d'embolisation a fait la preuve de son efficacité et de son innocuité dans une population de femmes sans désir de grossesse. Cependant, concernant les femmes en âge de procréer, il existe peu d'études à ce jour évaluant la fertilité après embolisation des myomes utérins.

Compte tenu de ces progrès techniques, l'embolisation limitée des artères utérines pourrait donner des résultats équivalents, si ce n'est supérieurs, à ceux de la chirurgie dans certaines indications : polymyomatose utérine interstitielle diffuse symptomatique, récurrence après myomectomie. Il paraît, dès lors, utile de proposer à ces patientes désireuses de grossesse une embolisation des myomes utérins, dans le strict cadre, à l'heure actuelle, d'un essai thérapeutique (59).

Effets indésirables des traitements sur la fertilité et les grossesses

Effets indésirables de la chirurgie

Adhérences et synéchies

La myomectomie par laparotomie ou par coelioscopie est une intervention à fort risque adhérentiel (60-66). Ces adhérences sont liées à l'hystérotomie et diminuent la fertilité après myomectomie (61, 65, 67, 68). Lorsque l'intervention est réalisée par coelioscopie la fréquence des adhérences pos-

topératoires est beaucoup plus faible (29 à 64 %) (60, 61, 63, 66, 69-71). Ce risque adhérentiel est d'autant plus important que le myome est de localisation postérieure et de type interstitiel (1, 61, 63, 66, 71). Cependant, il convient d'interpréter très prudemment ces résultats : les séries publiées sont rétrospectives et la comparaison est difficile tant les groupes étudiés sont différents. En effet, la myomectomie par coelioscopie est classiquement réservée à des myomes de petite taille et de nombre restreint alors que la laparotomie s'adresse généralement à des myomes plus importants ou à des patientes aux antécédents de chirurgie adhésiogène. Aucune série randomisée n'a comparé le risque d'adhérences entre ces deux voies d'abord dans cette indication.

Les complications postopératoires de la résection hystéroscopique sont elles principalement marquées par les infections et le risque de synéchies qui est évalué à 10 % après hystéroscopie de contrôle (72).

Rupture de l'utérus gravide

Des cas de ruptures utérines au cours des grossesses survenant après myomectomies (par coelioscopie ou laparotomie) ont été rapportés (73-76). La fréquence de ces événements est faible après myomectomie par laparotomie (77-79). Ce risque est encore mal évalué pour les myomectomies par coelioscopie mais ne semble pas différer du risque après laparotomie.

Pour la résection hystéroscopique, le risque de rupture utérine en cours de grossesse est nul dès lors qu'il n'y a pas eu de perforation utérine. En effet un seul cas de rupture utérine post-résection hystéroscopique d'un myome utérin est rapporté dans une revue récente de la littérature (80). Dans ce cas, une perforation à l'anse de résection monopolaire avait compliqué la procédure et pouvait expliquer la rupture utérine (81).

Devenir des grossesses

Le devenir obstétrical des patientes enceintes après myomectomie par coelioscopie ne diffère pas de celui observé après myomectomie par laparotomie. Seule l'étude randomisée de Seracchioli compare le devenir obstétrical de 66 patientes opérées par coelioscopie à celui de 65 patientes opérées par laparotomie (37). Le taux de fausse couche est de 20 % dans le premier groupe contre 12 % dans le deuxième groupe, sans que cette différence ne soit significative. Il n'existe pas de différence en termes de prématurité ou de voie d'accouchement (35 % de voie vaginale dans le premier groupe contre 22 % dans le deuxième groupe).

Embolisation

Hystérectomie postembolisation

De nombreux cas d'hystérectomies secondaires ont été rapportés, principalement lors des débuts de l'embolisation des myomes utérins. Il s'agissait essentiellement d'hystérectomies réalisées pour le traitement de complications infectieuses ou pour nécrose utérine secondaire. Même si la multiplicité des cas rapportés est marquante, l'incidence réelle de l'hystérectomie secondaire, évaluée par de larges séries prospectives, est finalement assez faible, de 0,2 à 2 %, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que l'hystérectomie d'hémostase post-myomectomie par laparotomie (82, 83).

Complications endométriales postembolisation

Exceptionnellement, des complications endométriales (syndrome d'Asherman, atrophie endométriale) à l'origine d'une aménorrhée ont été décrites (84). Ces complications ont remis en cause l'utilisation de particules de PVA de petite taille, car la réaction inflammatoire chronique était plus marquée qu'avec les microsphères de tris-acryl et la petite taille des particules, pouvaient être à l'origine d'ischémie endométriale et myométriale.

Insuffisance ovarienne postembolisation

L'incidence de l'aménorrhée d'origine ovarienne postembolisation peut être évaluée à 3 %, mais peut atteindre 41 % des cas pour les patientes de plus de 50 ans (85). La physiopathologie avancée est la migration des particules d'embolisation vers la vascularisation ovarienne, soit parce que la vascularisation ovarienne est assurée de manière prédominante par les artères utérines, soit parce qu'il existe une anastomose perméable entre l'artère utérine et l'artère ovarienne (5 à 10 % des cas) (86).

Plusieurs auteurs rapportent des cas isolés d'insuffisance ovarienne transitoire au décours d'embolisation de myomes utérins survenant chez des patientes de plus de 40 ans (87, 88). Dans une étude prospective intéressant 32 femmes âgées de 26 à 45 ans, Ahmad rapporte deux cas d'aménorrhées et d'élévations transitoires de la *follicule stimulating hormone* (FSH) après embolisation pour les deux patientes péri-ménopausiques connues (89). Cependant, en sélectionnant une série de 20 patientes de moins de 40 ans avec FSH < 10 UI/L, Tropeano n'observe pas d'effets secondaires sur la fonction ovarienne après embolisation (90). L'essai prospectif randomisé de Mara comparant l'embolisation des myomes utérins à la myomectomie retrouve une augmentation significative transitoire de la FSH chez 5,2 % des patientes embolisées, cette proportion n'étant pas significativement différente

entre les deux groupes (91). Cette étude rapporte également une grossesse obtenue chez une patiente qui avait présenté une aménorrhée transitoire de six semaines postembolisation.

La question de l'irradiation délivrée au cours de la procédure d'embolisation a aussi été étudiée, comme facteur potentiel d'insuffisance ovarienne. L'irradiation des ovaires a été évaluée à une dose moyenne inférieure à 10 cGy, alors qu'on admet une dose seuil pour l'insuffisance ovarienne définitive de 375 à 400 cGy selon l'âge des patientes (92, 93).

Conséquences obstétricales de l'embolisation

Les données concernant le devenir des grossesses après embolisation des myomes utérins sont limitées et souvent contradictoires.

Ainsi, l'essai randomisé de Mara, déjà cité, retrouve un taux de fausse couche spontanée plus important (64 % vs 23 %) et un taux d'accouchement plus faible (19 vs 48 %) chez les patientes embolisées que chez les patientes traitées par myomectomie (91). Cette étude confirme les résultats de la série de Goldberg de 52 grossesses après embolisation, qui montre une augmentation du risque d'avortement spontané, de présentation dystocique, d'accouchement prématuré, de césarienne et d'hémorragie de la délivrance (94). À l'inverse, plusieurs auteurs ne rapportent pas de complication particulière au cours des grossesses obtenues après embolisation des myomes utérins (95-97).

Synthèse - Stratégie thérapeutique

La découverte d'un myome utérin dans le bilan d'une infertilité est une situation clinique fréquente qui nécessite non seulement de faire la part de la responsabilité du myome dans l'infertilité, mais également d'envisager son impact sur une grossesse future. La prise en charge thérapeutique repose essentiellement sur la chirurgie. En effet, le traitement médical n'est absolument pas licite et l'embolisation du fait des incertitudes, quant aux conséquences possibles sur la fertilité immédiate, ne peut se concevoir que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Les bénéfices attendus de la myomectomie doivent néanmoins être mis en balance avec les risques éventuels (hémorragies, adhérences, rupture utérine). Ainsi, le recours aux techniques à invasion réduite (hystéroscopie ou laparoscopie) doit être privilégié du fait de leurs bénéfices en termes de convalescence et d'adhérences postopératoires par rapport à la laparotomie.

L'exploration de la cavité utérine permet de mettre en évidence les myomes déformants la cavité

dont l'ablation permet d'améliorer la fertilité des patientes (en procréation spontanée comme en PMA). En l'absence de facteurs associés majeurs, la responsabilité du myome dans l'infertilité est d'autant plus probable que celui-ci pénètre en profondeur le myomètre et qu'il s'accompagne de ménométrorragies ; on peut donc légitimement proposer une myomectomie en cas de myome interstitiel, y compris pour les myomes de taille moyenne (environ 4-5 cm), ce d'autant que le myome est proche de la cavité utérine ou entraîne des ménométrorragies. Quand le bilan préopératoire révèle un facteur d'infertilité majeur (masculin, tubaire ou ovulatoire) associé à la présence du myome, la responsabilité de ce dernier est en revanche plus difficile à mettre en évidence et l'intérêt de la myomectomie beaucoup plus discutable.

Références

- Verkauf BS (1992) Myomectomy for fertility enhancement and preservation. *Fertil Steril* 58: 1-15
- Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ *et al.* (1985) Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291: 1693-7
- Spira A (1986) Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod* 1: 111-5
- Stovall DW, Parrish SB, Van Voorhis BJ *et al.* (1998) Uterine leiomyomas reduce the efficacy of assisted reproduction cycles: results of a matched follow-up study. *Hum Reprod* 13: 192-7
- Seoud MA, Patterson R, Muasher SJ, Coddington CC 3rd (1992) Effects of myomas or prior myomectomy on in vitro fertilization (IVF) performance. *J Assist Reprod Genet* 9: 217-21
- Ramzy AM, Sattar M, Amin Y *et al.* Uterine myomata and outcome of assisted reproduction. *Hum Reprod* 1998 13: 198-202
- Stevenson CS (1964) Myomectomy for Improvement of Fertility. *Fertil Steril* 15: 367-84
- Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL *et al.* (1997) Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 90: 967-73
- Buttram VC Jr, Reiter RC (1981) Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 36: 433-45
- Narayan R, Rajat, Goswamy K (1994) Treatment of submucous fibroids, and outcome of assisted conception. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1: 307-11
- Cramer DW, Walker AM, Schiff I (1979) Statistical methods in evaluating the outcome of infertility therapy. *Fertil Steril* 32: 80-6
- Rubin IC (1958) Uterine fibromyomas and sterility. *Clin Obstet Gynecol* 1: 501-18
- Hasan F, Arumugam K, Sivanesaratnam V (1991) Uterine leiomyomata in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 34: 45-8
- Bulletti C, De Ziegler D, Polli V, Flamigni C (1999) The role of leiomyomas in infertility. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 6: 441-5
- Donnez J, Jadoul P (2002) What are the implications of myomas on fertility? A need for a debate? *Hum Reprod* 17: 1424-30
- Pritts EA, Parker WH, Olive DL (2009) Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril* 91: 1215-23
- Check JH, Choe JK, Lee G, Dietterich C (2002) The effect on IVF outcome of small intramural fibroids not compressing the uterine cavity as determined by a prospective matched control study. *Hum Reprod* 17: 1244-8
- Surrey ES, Lietz AK, Schoolcraft WB (2001) Impact of intramural leiomyomata in patients with a normal endometrial cavity on in vitro fertilization-embryo transfer cycle outcome. *Fertil Steril* 75: 405-10
- Dietterich C, Check JH, Choe JK *et al.* (2000) The presence of small uterine fibroids not distorting the endometrial cavity does not adversely affect conception outcome following embryo transfer in older recipients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 27: 168-70
- Farhi J, Ashkenazi J, Feldberg D *et al.* (1995) Effect of uterine leiomyomata on the results of in-vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 10: 2576-8
- Hart R, Khalaf Y, Yeong CT *et al.* (2001) A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 16: 2411-7
- Eldar-Geva T, Meagher S, Healy DL *et al.* (1998) Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertil Steril* 70: 687-91
- Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP *et al.* (2004) Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 81: 582-7
- Jacobson FJ, Enzer N (1956) Uterine myomas and the endometrium; study of the mechanism of bleeding. *Obstet Gynecol* 7: 206-10
- Hunt JE, Wallach EE (1974) Uterine factors in infertility—an overview. *Clin Obstet Gynecol* 17: 44-64
- Deligdisch L, Loewenthal M (1970) Endometrial changes associated with myomata of the uterus. *J Clin Pathol* 23: 676-80
- Sehgal N, Haskins AL (1960) The mechanism of uterine bleeding in the presence of fibromyomas. *Am Surg* 26: 21-3
- Farrer-Brown G, Beilby JO, Tarbit MH (1971) Venous changes in the endometrium of myomatous uteri. *Obstet Gynecol* 38: 743-51
- Kessel B, Liu J, Mortola J *et al.* (1988) Treatment of uterine fibroids with agonist analogs of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 49: 538-41
- Ben-Ami M, Battino S, Shalev E (1993) Pregnancy following GnRH agonist therapy of uterine leiomyoma obstructing a single fallopian tube. *Hum Reprod* 8: 780-1
- Gardner RL, Shaw RW (1989) Cornual fibroids: a conservative approach to restoring tubal patency using a gonadotropin-releasing hormone agonist (goserelin) with successful pregnancy. *Fertil Steril* 52: 332-4
- Iosif CS, Akerlund M (1983) Fibromyomas and uterine activity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 62: 165-7
- Coutinho EM, Maia HS (1971) The contractile response of the human uterus, fallopian tubes, and ovary to prostaglandins in vivo. *Fertil Steril* 22: 539-43
- Forssman L (1976) Distribution of blood flow in myomatous uteri as measured by locally injected ¹³³Xenon. *Acta Obstet Gynecol Scand* 55: 101-4
- Casini ML, Rossi F, Agostini R, Unfer V (2006) Effects of the position of fibroids on fertility. *Gynecol Endocrinol* 22: 106-9
- Bulletti C, De Ziegler D, Levi Setti P *et al.* (2004) Myomas, pregnancy outcome, and in vitro fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 1034: 84-92
- Seracchioli R, Rossi S, Govoni F *et al.* (2000) Fertility and obstetric outcome after laparoscopic myomectomy of

- large myomata: a randomized comparison with abdominal myomectomy. *Hum Reprod* 15: 2663-8
38. Malzoni M, Sizzi O, Rossetti A, Imperato F (2006) Laparoscopic myomectomy: a report of 982 procedures. *Surg Technol Int* 15: 123-9
 39. Rossetti A, Sizzi O, Soranna L *et al.* (2001) Long-term results of laparoscopic myomectomy: recurrence rate in comparison with abdominal myomectomy. *Hum Reprod* 16: 770-4
 40. Rossetti A, Sizzi O, Soranna L *et al.* (2001) Fertility outcome: long-term results after laparoscopic myomectomy. *Gynecol Endocrinol* 15: 129-34
 41. Vercellini P, Maddalena S, De Giorgi O *et al.* (1998) Abdominal myomectomy for infertility: a comprehensive review. *Hum Reprod* 13: 873-9
 42. Li TC, Mortimer R, Cooke ID (1999) Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod* 14: 1735-40
 43. Dubuisson JB, Fauconnier A, Chapron C *et al.* (2000) Reproductive outcome after laparoscopic myomectomy in infertile women. *J Reprod Med* 45: 23-30
 44. Di Gregorio A, Maccario S, Raspollini M (2002) The role of laparoscopic myomectomy in women of reproductive age. *Reprod Biomed Online* 4 (Suppl 3): 55-8
 45. Soriano D, Dessolle L, Poncelet C *et al.* (2003) Pregnancy outcome after laparoscopic and laparoconverted myomectomy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108: 194-8
 46. Darai E, Dechaud H, Benifla JL *et al.* (1997) Fertility after laparoscopic myomectomy: preliminary results. *Hum Reprod* 12: 1931-4
 47. Poncelet C, Benifla JL, Batallan A *et al.* (1997) Myoma and infertility: analysis of the literature. *Gynecol Obstet Fertil* 2001 29: 413-21
 48. Fauconnier A, Dubuisson JB, Ancel PY, Chapron C (2000) Prognostic factors of reproductive outcome after myomectomy in infertile patients. *Hum Reprod* 15: 1751-7
 49. Vercellini P, Maddalena S, De Giorgi O *et al.* (1999) Determinants of reproductive outcome after abdominal myomectomy for infertility. *Fertil Steril* 72: 109-14
 50. Dessolle L, Soriano D, Poncelet C *et al.* (2001) Determinants of pregnancy rate and obstetric outcome after laparoscopic myomectomy for infertility. *Fertil Steril* 76: 370-4
 51. Fernandez H, Azoulay C, Rostoker G (2005) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Drug treatments for uterine fibroma: rationale. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 34: 360-405
 52. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M (2001) Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev* CD000547
 53. Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N *et al.* (1995) Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 346: 671-2
 54. Pelage JP, Le Dref O, Soyer P *et al.* (2000) Fibroid-related menorrhagia: treatment with superselective embolization of the uterine arteries and midterm follow-up. *Radiology* 215: 428-31
 55. Spies JB, Ascher SA, Roth AR *et al.* (2001) Uterine artery embolization for leiomyomata. *Obstet Gynecol* 98: 29-34
 56. Spies JB, Scialli AR, Jha RC *et al.* (1999) Initial results from uterine fibroid embolization for symptomatic leiomyomata. *J Vasc Interv Radiol* 10: 1149-57.
 57. Pelage JP, Le Dref O, Beregi JP, *et al.* (2003) Limited uterine artery embolization with tris-acryl gelatin microspheres for uterine fibroids. *J Vasc Interv Radiol* 14: 15-20
 58. Siskin GP, Englander M, Stainken BF *et al.* (2000) Embolic agents used for uterine fibroid embolization. *Am J Roentgenol* 175: 767-73
 59. Fauconnier A, Pelage JP, Lacombe P, Ville Y (2004) Embolization of uterine fibroids and infertility: is a clinical trial conceivable? *Gynecol Obstet Fertil* 32: 818-24
 60. Bulletti C, Polli V, Negrini V *et al.* (1996) Adhesion formation after laparoscopic myomectomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 3: 533-6
 61. Dubuisson JB, Fauconnier A, Chapron C *et al.* (1998) Second look after laparoscopic myomectomy. *Hum Reprod* 13: 2102-6
 62. Diamond MP (1996) Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group. *Fertil Steril* 66: 904-10
 63. Mais V, Ajossa S, Piras B *et al.* (1995) Prevention of de novo adhesion formation after laparoscopic myomectomy: a randomized trial to evaluate the effectiveness of an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier. *Hum Reprod* 10: 3133-5
 64. Nezhat C, Nezhat F, Silfen SL *et al.* (1991) Laparoscopic myomectomy. *Int J Fertil* 36: 275-80
 65. Tulandi T, Murray C, Guralnick M (1993) Adhesion formation and reproductive outcome after myomectomy and second-look laparoscopy. *Obstet Gynecol* 82: 213-5
 66. Ugur M, Turan C, Mungan T *et al.* (1996) Laparoscopy for adhesion prevention following myomectomy. *Int J Gynaecol Obstet* 53: 145-9
 67. Gehlbach DL, Sousa RC, Carpenter SE, Rock JA (1993) Abdominal myomectomy in the treatment of infertility. *Int J Gynaecol Obstet* 40: 45-50
 68. Berkeley AS, DeCherney AH, Polan ML (1983) Abdominal myomectomy and subsequent fertility. *Surg Gynecol Obstet* 156: 319-22
 69. Hasson HM, Rotman C, Rana N *et al.* (1992) Laparoscopic myomectomy. *Obstet Gynecol* 80: 884-8
 70. Malzoni M, Rotond M, Perone C *et al.* (2003) Fertility after laparoscopic myomectomy of large uterine myomas: operative technique and preliminary results. *Eur J Gynaecol Oncol* 24: 79-82
 71. Takeuchi H, Kinoshita K (2002) Evaluation of adhesion formation after laparoscopic myomectomy by systematic second-look microlaparoscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 9: 442-6
 72. Fernandez H, Kadoch O, Capella-Allouc S *et al.* (2001) Hysteroscopic resection of submucous myomas: long term results. *Ann Chir* 126: 58-64
 73. Friedmann W, Maier RF, Luttkus A *et al.* (1996) Uterine rupture after laparoscopic myomectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 75: 683-4
 74. Dubuisson JB, Chavet X, Chapron C *et al.* (1995) Uterine rupture during pregnancy after laparoscopic myomectomy. *Hum Reprod* 10: 1475-7
 75. Harris WJ (1992) Uterine dehiscence following laparoscopic myomectomy. *Obstet Gynecol* 80: 545-6
 76. Pelosi MA, 3rd, Pelosi MA (1997) Spontaneous uterine rupture at thirty-three weeks subsequent to previous superficial laparoscopic myomectomy. *Am J Obstet Gynecol* 177: 1547-9
 77. Finn WF, Muller PF (1950) Abdominal myomectomy: special reference to subsequent pregnancy and to the reappearance of fibromyomas of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 60: 109-16
 78. Davids AM (1952) Myomectomy; surgical technique and results in a series of 1,150 cases. *Am J Obstet Gynecol* 63: 592-604
 79. Brown AB, Chamberlain R (1956) Te Linde RW. Myomectomy. *J Obstet Gynecol* 71: 759-63
 80. Sentilhes L, Sergent F, Berthier A *et al.* (2006) Uterine rupture following operative hysteroscopy. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 1064-70
 81. Yaron Y, Shenhav M, Jaffa AJ *et al.* (1994) Uterine rupture at 33 weeks' gestation subsequent to hysteroscopic uterine perforation. *Am J Obstet Gynecol* 170: 786-7

82. Walker WJ, Pelage JP (2002) Uterine artery embolisation for symptomatic fibroids: clinical results in 400 women with imaging follow up. *BJOG* 109: 1262-72
83. Pron G, Mocarski E, Cohen M *et al.* (2003) Hysterectomy for complications after uterine artery embolization for leiomyoma: results of a Canadian multicenter clinical trial. *J Assoc Gynecol Laparosc* 10: 99-106
84. Tropeano G, Litwicka K, Di Stasi C *et al.* (2003) Permanent amenorrhea associated with endometrial atrophy after uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Fertil Steril* 79: 132-5
85. Pron G, Cohen M, Soucie J *et al.* (2003) The Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial. Part 1. Baseline patient characteristics, fibroid burden, and impact on life. *Fertil Steril* 79:112-9
86. Payne JF, Robboy SJ, Haney AF (2002) Embolic microspheres within ovarian arterial vasculature after uterine artery embolization. *Obstet Gynecol* 100: 883-6
87. Amato P, Roberts AC (2001) Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. *Fertil Steril* 75: 438-9
88. Hascalik S, Celik O, Sarac K, Hascalik M (2004) Transient ovarian failure: a rare complication of uterine fibroid embolization. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83: 682-5
89. Ahmad A, Qadan L, Hassan N, Najarian K (2002) Uterine artery embolization treatment of uterine fibroids: effect on ovarian function in younger women. *J Vasc Interv Radiol* 13: 1017-20
90. Tropeano G, Di Stasi C, Litwicka K *et al.* (2004) Uterine artery embolization for fibroids does not have adverse effects on ovarian reserve in regularly cycling women younger than 40 years. *Fertil Steril* 81: 1055-61
91. Mara M, Maskova J, Fucikova Z *et al.* (2008) Midterm clinical and first reproductive results of a randomized controlled trial comparing uterine fibroid embolization and myomectomy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 31: 73-85
92. Spies JB, Roth AR, Gonsalves SM, Murphy-Skrzyniarz KM (2001) Ovarian function after uterine artery embolization for leiomyomata: assessment with use of serum follicle stimulating hormone assay. *J Vasc Interv Radiol* 12: 437-42
93. Nikolic B, Spies JB, Campbell L *et al.* (2001) Uterine artery embolization: reduced radiation with refined technique. *J Vasc Interv Radiol* 12: 39-44
94. Goldberg J, Pereira L, Berghella V (2002) Pregnancy after uterine artery embolization. *Obstet Gynecol* 100: 869-72
95. McLucas B, Goodwin S, Adler L *et al.* (2001) Pregnancy following uterine fibroid embolization. *Int J Gynaecol Obstet* 74:1-7
96. Pinto Pabon I, Magret JP, Unzurrunzaga EA *et al.* (2008) Pregnancy after uterine fibroid embolization: follow-up of 100 patients embolized using tris-acryl gelatin microspheres. *Fertil Steril* 90: 2356-60
97. Ravina JH, Aymard A, Ciraru-Vigneron N *et al.* (2000) Arterial embolization of uterine myoma: results apropos of 286 cases. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 29: 272-5
98. Bernard G, Darai E, Poncelet C *et al.* (2000) Fertility after hysteroscopic myomectomy: effect of intramural myomas associated. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 88: 85-90
99. Gianaroli L, Gordts S, D'Angelo A *et al.* (2005) Effect of inner myometrium fibroid on reproductive outcome after IVF. *Reprod Biomed Online* 10: 473-7
100. Klatsky PC, Lane DE, Ryan IP, Fujimoto VY (2007) The effect of fibroids without cavity involvement on ART outcomes independent of ovarian age. *Hum Reprod* 22: 521-6
101. Ng EH, Ho PC (2002) Doppler ultrasound examination of uterine arteries on the day of oocyte retrieval in patients with uterine fibroids undergoing IVF. *Hum Reprod* 17: 765-70
102. Wang W, Check JH, Dietterich C, Lurie D (2001) Effect of fibroids on cumulative probability of pregnancy in women taking follicle maturing drugs without assisted reproductive technology. *Clin Exp Obstet Gynecol* 28: 86-8
103. Wang W, Check JH (2004) Effect of corporal fibroids on outcome following embryo transfer in donor-oocyte recipients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 31: 263-4
104. Yarali H, Bukulmez O (2002) The effect of intramural and subserous uterine fibroids on implantation and clinical pregnancy rates in patients having intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 266: 30-3
105. Surrey ES, Minjarez DA, Stevens JM, Schoolcraft WB (2005) Effect of myomectomy on the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 83: 1473-9
106. Varasteh NN, Neuwirth RS, Levin B, Keltz MD (1999) Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy and myomectomy in infertile women. *Obstet Gynecol* 94: 168-71

V. Gayet, D. De Ziegler,
B. Borghèse, F.X. Aubriot
et C. Chapron

Endométriose et infertilité

Introduction

L'endométriose est une maladie gynécologique fréquente dont la prévalence dans la population générale est estimée entre 6 et 10 % (1). Elle atteint des femmes en âge de procréer. De nombreuses études ont montré que l'endométriose était responsable d'infertilité mais les facteurs causant l'infertilité en cas d'endométriose restent mal établis. Ceci est dû pour une part à la grande diversité de l'endométriose et au fait que sa physiopathologie reste mal élucidée.

Épidémiologie

La prévalence de l'endométriose peut atteindre 35 à 50 % dans une population sélectionnée de femmes infertiles ou souffrant de douleurs pelviennes ou les deux (2). De même, 30 à 50 % des patientes endométriosiques ont une infertilité (3). Hugues *et al.* ont rapporté un taux de fécondité mensuelle pour les patientes présentant une endométriose de 2 à 10 % comparée à une fécondité mensuelle de 15 à 20 % dans la population générale. Pour Strathy *et al.*, le risque d'infertilité est multiplié par 20 si une endométriose est présente (4). Dans les cas d'endométriose modérée et sévère, nous ne disposons que de très peu de données concernant la fertilité naturelle. Adamson, dans une série personnelle, rapporte un taux de fertilité de 3 % après un délai de 12 mois. Pour d'autres équipes, la sévérité de l'endométriose n'augmente pas l'infertilité.

Mécanismes de réduction de la fertilité

Modifications anatomiques liées à l'endométriose

Ces modifications anatomiques sont donc très variables et dépendent de la localisation de l'endométriose et de son stade. Il peut s'agir de séqueles

inflammatoires tubaires, d'adhérences péritubaires, périovariennes en particulier dans les stades III et IV. Les adhérences peuvent être des lésions authentiquement endométriosiques, en particulier quand elles sont hémorragiques mais elles peuvent aussi être secondaires à la rupture d'un kyste dont le liquide est très adhésiogène ou être la conséquence de l'inflammation. En cas d'adhérences, il s'agit le plus souvent d'une infertilité tubaire perturbant le transport des spermatozoïdes, la captation de l'ovocyte, le transport ovocytaire et la fécondation. Pour les lésions d'endométriose superficielle, les mécanismes semblent plus complexes et peuvent survenir à différents stades : lors de la folliculogénèse, de l'ovulation, de la fécondation ou de l'implantation. Il peut aussi s'agir d'une mauvaise qualité embryonnaire liée à la présence des implants endométriosiques.

Modifications cytologiques et biochimiques du liquide péritonéal

Le développement des lésions d'endométriose superficielle dépend de différents facteurs contenus dans le liquide péritonéal. Le contenu du liquide péritonéal apparaît essentiel dans la physiopathologie de l'endométriose (5). Il est constitué principalement par le transsudat plasmatique, l'exsudat ovarien, et à un moindre degré par le fluide tubaire, voire le reflux tubaire menstruel et les sécrétions des macrophages. L'exsudat ovarien est principalement issu des follicules dominants et du corps jaune et représente la majeure partie du liquide péritonéal. Différentes études ont regardé la composition du liquide péritonéal des femmes porteuses d'endométriose. Celles-ci ont constaté une variation quantitative et qualitative de nombreuses substances dont certaines sont directement impliquées dans la réponse inflammatoire. Mais ces études descriptives ne permettent pas d'affirmer le rôle causal de ces substances dans la genèse des lésions.

Les conclusions formulées à partir de ces travaux restent donc à un stade d'hypothèses. Un grand nombre de marqueurs de l'inflammation (cytokines, facteurs de croissance, facteurs angiogéniques) sont présents en quantité plus importante dans le liquide péritonéal et peuvent pérenniser la pathologie endométriosique. Ces facteurs proviennent des lésions elles-mêmes ou de cellules immunitaires tels les macrophages. Cette réaction inflammatoire peut être induite par la présence de sang ou de débris endométriaux dans la cavité abdominale lors des menstruations.

De nombreuses études ont été publiées ces dernières années sur les modifications du liquide péritonéal et leur éventuelle implication dans la fertilité. De manière caractéristique, le volume du liquide péritonéal augmente en cas d'endométriose (5). De prime abord, ceci semble avoir peu d'importance clinique. Le liquide péritonéal (LP) contient toutefois différentes cellules dont des macrophages, des cellules NK (*natural killers*), des lymphocytes, des éosinophiles, des cellules mésothéliales et des mastocytes. Le LP contient aussi des hormones stéroïdiennes, des prostaglandines, des cytokines et des facteurs de croissance (5).

Outre la modification de son volume, le LP change de composition en cas d'endométriose. Il existe en effet une augmentation du nombre de macrophages ainsi qu'une augmentation de l'activation macrophagique, entraînant une augmentation des cytokines inflammatoires en particulier de l'interleukine (IL-1).

Rôle des cytokines

IL-1 induit la synthèse de prostaglandines et stimule la prolifération fibroblastique, la déposition de collagène ainsi que la formation de fibrinogène contribuant à la fibrose et à la formation d'adhésions dans l'endométriose. Son augmentation serait corrélée à l'infertilité. Le récepteur IL-1RII neutraliserait IL-1 bêta et contrerait ses effets sur les cellules stromales de l'endométriose, ouvrant là une nouvelle voie de traitement (6).

L'augmentation de l'IL-6 est considérée comme inconstante car elle n'est pas retrouvée dans toutes les études. IL-6 est sécrétée par les macrophages en réponse à de nombreuses substances dont l'IL-1. Ce phénomène active les macrophages et entraîne une prolifération des cellules endométriales (7). Une augmentation de l'IL-6 aurait des effets délétères sur la mobilité des spermatozoïdes (8).

La concentration de l'IL-8 est aussi augmentée. Ceci provient vraisemblablement des macrophages péritonéaux. Il s'agit d'une cytokine proangiogénique et pro-inflammatoire. Elle améliore l'adhésion du stroma à la fibronectine (9) mais également stimule l'action des métalloprotéases favorisant l'in-

vasion. Elle est également chémo-attractive pour les leucocytes neutrophiles et induit l'expression d'un grand nombre de molécules d'adhésion. Elle stimulerait la croissance de tissu de type endométrial qu'il soit de type eutopique ou ectopique. La concentration en IL-8 est d'autant plus importante que l'atteinte est sévère (10).

L'IL-10 est aussi sécrétée par les macrophages présents dans la cavité péritonéale. Sa concentration péritonéale serait plus importante chez les patientes endométriosiques (11). Sa forte concentration serait en partie responsable, avec l'IL-6, de perturbation du système immunitaire chez les femmes atteintes d'endométriose. Elle entraînerait une baisse de l'activité des cellules T type TH1. Elle a avec l'IL-6 un rôle modulateur de réponse inflammatoire au niveau des lymphocytes B et des macrophages.

La concentration d'IL-12 est majorée dans l'endométriose sévère. Elle stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les monocytes au niveau de l'endomètre. Elle aurait un rôle sur la prolifération de l'endomètre dans l'endométriose (12).

IL-13 semble diminuée. Il s'agit d'une cytokine inhibant les macrophages. Elle joue un rôle probable dans la pathogenèse de l'endométriose (5). Sa diminution serait à l'origine d'un manque de régulation de l'activité des macrophages.

IL-15 est augmentée. Elle est produite par un grand nombre de cellules dont le tissu endométrial. La progestérone est un inducteur potentiel de l'IL-15 au niveau du stroma ovarien. Cette cytokine active les cellules NK et induit la prolifération et la migration des lymphocytes. Elle joue un rôle dans les phases précoces de la réponse immunitaire. Elle stimule la production de métalloprotéases. Elle a également un effet angiogénique via la majoration de la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) par les cellules NK (13).

IL 18 : il s'agit d'un inducteur de l'INF- (interféron produit par les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK mais aussi par les tissus épithéliaux, les ovaires et l'endomètre). Elle favorise la réponse des cellules NK et stimule l'angiogenèse. Elle a un effet pro-inflammatoire et induit la production de métalloprotéases et de molécules d'adhésion intercellulaire. Sa concentration intrapéritonéale est augmentée chez les femmes endométriosiques surtout dans les atteintes péritonéales superficielles (14). Des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature.

Le TNF α (*tumor necrosis factor α*) est augmenté et jouerait un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'endométriose. Cette cytokine est sécrétée par un grand nombre de cellules (fibroblastes, macrophages, cellules NK, lymphocytes T et B). *In vitro*, le TNF α joue un rôle prédominant dans l'adhésion du stroma endométrial au mésothélium et dans

la prolifération des lésions endométriosiques. Le $\text{TNF}\alpha$ stimule la prolifération du stroma endométriosique via l'induction de production d'IL-8.

D'autres molécules augmentées

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) : elle jouerait un rôle important dans l'initiation et la régulation des lésions endométriosiques. Elle interagit avec les cellules NK et perturbe leur activité. MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) : sa concentration est corrélée à l'importance de la maladie. Ce facteur est spécifique de l'activation des monocytes. Son rôle se situerait au niveau de la croissance et du maintien des lésions, à la fois indirectement par la stimulation de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les macrophages, mais aussi directement par l'induction de la croissance des cellules endométriales. Elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, les fibroblastes et les leucocytes. Sa sécrétion est régulée par des molécules telles que l'IL1, le $\text{TNF}\alpha$, le PDGF (*platelet derived growth factor*) et l'INF- (15). RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) : il s'agit d'une molécule activatrice jouant un rôle attractif au niveau de cellules telles que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les éosinophiles. Son rôle exact n'est pas défini (16).

Fas-ligand (proapoptotique) (17) : Il existe également une augmentation de la concentration de différents facteurs de croissance : VEGF (impliqué dans l'initiation et le maintien de la maladie), IGF (*insulin-like growth factor*) (action mitogène sur les cellules endométriales cultivées *in vitro*), EGF (*epidermal growth factor*) ou facteur de prolifération des cellules endométriales, son effet est controversé, M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages et jouant un rôle dans la prolifération de tissu endométrial, $\text{TGF}\beta$ (*transforming growth factor*) serait responsable de la diminution de l'activité des cellules NK dans le liquide péritonéal, HGF (*hepatocyte growth factor*) à l'effet mitogène.

Contrastant avec l'activation macrophagique, l'activité des cellules NK est en revanche diminuée. Pour certains auteurs, il s'agit d'une conséquence des implants endométriosiques tandis que pour d'autres, c'est cette diminution d'activité qui permet à l'endométriose de se développer.

Les prostaglandines sont également augmentées. Leur production provient en partie des macrophages. Elles jouent également un rôle dans la régulation et la production des cytokines. De plus, l'augmentation du taux d'œstradiol dans le liquide péritonéal stimulerait la COX-2 (cyclo-oxygénase-2) enzyme qui, elle-même, régule la production de prostaglan-

dine E_2 . PGE_2 stimule l'expression de l'aromatase dans les tissus endométriosiques entraînant une production locale d'œstradiol et une résistance à la progestérone. Collectivement, les deux induisent une prolifération de l'endométriose (18).

Le PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein*) est augmenté (19). Cette protéine sécrétée par l'endomètre, les ovaires et le placenta, augmente la synthèse d'androstènedione qui normalement est converti en œstradiol sous l'action de l'aromatase folliculaire. Or, l'activité de l'aromatase folliculaire est diminuée dans l'endométriose et l'aromatisation se fait dans les tissus endométriosiques entraînant une prolifération de l'endométriose.

La cathepsine D est augmentée dans le liquide péritonéal dans les stades 3 et 4 de l'endométriose en comparaison aux stades 1 et 2 (20). Il s'agit d'une enzyme protéolytique impliquée dans la dégradation de la membrane basale et des composants de la matrice extracellulaire.

Une étude a également montré une augmentation de la leptine dans le liquide péritonéal. Il existe une corrélation positive entre le taux de leptine et le stade de la maladie ainsi que la douleur. Ceci suggère que l'action pro-inflammatoire et néoangiogénique de la leptine pourrait contribuer à la pathogénèse de l'endométriose (21).

La multitude des modifications biochimiques rend compte de la complexité de la maladie. Parmi l'ensemble des altérations rencontrées, il semble important de retenir l'augmentation de l'activité macrophagique et des cytokines inflammatoires. Les conséquences de ceci sur la fertilité sont mal connues. L'activation macrophagique entraîne une augmentation du stress oxydatif et des actions néfastes sur l'ovocyte, les spermatozoïdes, l'embryon et le fonctionnement tubaire (2). En particulier, l'augmentation du $\text{TNF}\alpha$ entraînerait une diminution de la liaison spermatozoïde – zone pellicule (22). Il initierait aussi la cascade de la caspase entraînant une augmentation de l'apoptose des cellules spermatiques et une oligospermie. Il augmenterait la production de ROS (*reactive oxygen species*) par les spermatozoïdes qui altèrent la fonction des spermatozoïdes (23). Le TNF aurait également un effet sur la décidualisation de l'endomètre (24). IL-6 diminuerait la mobilité des spermatozoïdes. D'autre part, le liquide péritonéal des patientes endométriosiques contiendrait un inhibiteur de la capture ovocytaire empêchant l'interaction normale entre le cumulus et les franges tubaires (2).

Altération de la réponse immunitaire locale

Le système immunitaire joue très probablement un rôle dans l'initiation de la maladie et dans son développement. Il existe une augmentation des

immunoglobulines G et A ainsi que des lymphocytes dans l'endomètre des patientes atteintes d'endométriose pouvant altérer la réceptivité de l'endomètre et l'implantation de l'embryon. De plus, il existe un taux plus important d'auto-anticorps contre des antigènes endométriaux (auto-anticorps anti-laminine 1...). Des anticorps anti-zone pellucide ont été également rapportés (25).

Altération du liquide folliculaire

Outre les modifications immunologiques au niveau du liquide péritonéal et au niveau de l'endomètre chez les patientes endométriosiques, il existe aussi des altérations du liquide folliculaire. Garrido *et al.* (26) ont montré une augmentation de IL-6 et une diminution du VEGF dans le liquide folliculaire et émis l'hypothèse que ceci pouvait altérer l'ovocyte et lui conférer des difficultés à s'implanter. En effet, le VEGF augmente la croissance folliculaire et sa vascularisation. Il a été aussi décrit une augmentation de la progestérone et une diminution de la testostérone dans le liquide folliculaire en corrélation avec la gravité de la maladie. Ces modifications témoignent de l'atteinte endocrinologique mais ne semblent pas altérer la qualité embryonnaire (27). Il existe également une diminution du taux de cortisol ainsi que du taux d'IGFBP-1 (*insulin like growth factor binding protein 1*) dans le follicule (28, 29). Par ailleurs, on note une augmentation du TNF dans les cellules de la granulosa des patientes endométriosiques ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules de la granulosa qui pourrait être due aux concentrations élevées de Fas ligand dans le sérum et le liquide péritonéal de ces patientes (17).

Altération des fonctions endocrines et ovulatoires

Plusieurs dysfonctions ont été rapportées en présence d'endométriose : altération de la phase lutéale, anomalies de la croissance folliculaire (phase folliculaire plus longue, follicule dominant plus petit (30), pics de LH prématurés ou multiples). Aucune de ces hypothèses n'a cependant été validée (2). Des anomalies du pic de LH peuvent être dues à une insuffisance de l'axe hypothalamo-hypophysaire ou être secondaires à un défaut de signal ovarien. Un défaut de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et ovarien a été mis en évidence et reconnu à cause des taux de progestérone plus faibles et d'une altération du corps jaune. Une étude brésilienne (31) a montré une diminution de l'AMH chez les patientes infertiles atteintes d'endométriose stades I et II par rapport aux patientes atteintes d'une stérilité tubaire. De plus, les patientes endométriosiques avaient une cohorte folliculaire plus hétérogène

que dans le groupe contrôle conduisant à une diminution de la réserve ovarienne chez ces patientes. D'autres études sur l'AMH et l'endométriose sont actuellement en cours.

Altération des mécanismes d'implantation au sein de l'endomètre

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que des anomalies de l'endomètre étaient à la fois à l'origine de l'endométriose et de troubles de l'implantation expliquant l'hypofertilité chez ces patientes. Il existe une augmentation des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-11 et du TNF (32) ainsi qu'une diminution de la production des métalloprotéases. Il y aurait aussi une résistance à l'activité des cellules NK. Il a été décrit également une diminution de la β -intégrine (une molécule d'adhésion cellulaire) durant la fenêtre d'implantation. Plus récemment, une enzyme impliquée dans l'interaction trophoblaste-blastocyte a été mise en évidence dans l'endomètre des patientes (33). Par ailleurs, l'endomètre des patientes endométriosiques serait capable de synthétiser de l'aromatase permettant de produire de l'œstradiol. Or, une augmentation du taux d'œstradiol au sein de l'endomètre empêcherait l'implantation. Des études utilisant des micro-arrays ont permis de mettre en évidence de nombreuses différences durant la fenêtre d'implantation entre l'endomètre des patientes endométriosiques et celui de femmes non malades. Ceci n'a pas permis de conclure si l'infertilité dans l'endométriose était due à un défaut d'implantation mais a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche (34). Enfin, certaines études ont indiqué que les altérations de l'endomètre rencontrées en cas d'endométriose peuvent être corrigées par une suppression transitoire de la fonction ovarienne.

Altération des qualités de l'ovocyte et de l'embryon

Le développement des techniques médicales d'aide à la procréation, en particulier la fécondation *in vitro* (FIV), a permis de comparer les embryons provenant de patientes endométriosiques à ceux de patientes sans endométriose. Plusieurs études ont montré une altération de la qualité embryonnaire chez les patientes atteintes d'endométriose (35). Le défaut d'implantation dans l'endométriose ne serait donc pas seulement dû à une mauvaise réceptivité endométriale mais à une altération des qualités ovocytaires et embryonnaires. L'étude rétrospective de Simon *et al.* (36) portant sur 78 patientes avec une stérilité tubaire et 59 patientes atteintes d'endométriose suivies en FIV a montré une diminution du taux de grossesses obtenues par cycle, une diminution du taux de grossesses par transfert

Tableau I. – Altération des qualités de l'ovocyte et de l'embryon.

Facteurs anatomiques	Séquelles inflammatoires tubaires, adhérences péritubaires, adhérences pérovariennes
<i>Modifications cytologiques et anatomiques du liquide péritonéal</i>	Du volume du liquide péritonéal des macrophages des cytokines IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 IL-13 TNF ICAM-1 MCP-1 RANTES de facteurs de croissance : VEGF, IGF, EGF, M-CSF, TGF β , HGF activité des cellules NK des prostaglandines PAPP-A cathepsine D leptine
<i>Altérations de la réponse immunitaire locale</i>	IgG et A endométriaux lymphocytes endométriaux auto-Ac contre des Ag endométriaux Ac anti-zone pellucide
<i>Altérations du liquide folliculaire</i>	IL-6, VEGF, progestérone, testostérone, cortisol, IGFBP-1, BDNF, apoptose, TNF
<i>Altérations des fonctions endocrines et ovulatoires</i>	dysfonction de la phase lutéale anomalies de la croissance folliculaire pics de LH prématurés ou multiples AMH
<i>Altération des mécanismes d'implantation au sein de l'endomètre</i>	IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF, métalloprotéases Résistance aux cellules NK β -intégrine de l'aromatase et de l'œstradiol
<i>Altération des qualités de l'ovocyte et de l'embryon</i>	du nombre de blastomères à 72 heures des anomalies cytoplasmiques et nucléaires du taux d'implantation si don d'ovocyte provenant d'une patiente endométriosique

embryonnaire et une diminution du taux d'implantation. Le taux d'implantation après don d'ovocytes était le même entre les patientes ayant une infertilité tubaire et les patientes endométriosiques. En revanche, si la donneuse avait de l'endométriose, le taux d'implantation était significativement diminué. Ces résultats sont confortés par l'étude cas-témoins de Diaz *et al.* (37) où, après don d'ovocytes, le taux d'implantation était le même entre le groupe des patientes porteuses d'une endométriose sévère (stades 3 et 4 de la maladie) et le groupe des patientes non endométriosiques (tableau I).

Prise en charge de l'infertilité

Place du traitement médical

Le traitement médical a indéniablement sa place dans la prise en charge de la douleur. Il n'est en revanche pas efficace sur l'infécondité quel que soit le produit utilisé (3). En effet, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées (similaires aux traitements efficaces sur la douleur) : danazol, agonistes de la LH-RH, antagonistes de la GnRH, antioestrogènes, progestatifs ou œstroprogestatifs. Tous ces traitements sont en fait contraceptifs. Une action favorable sur l'infertilité impliquerait donc un effet de rebond de fertilité à l'arrêt du traitement. Or, l'ensemble des données disponibles à ce jour indique que ce n'est pas le cas. En effet, le blocage ovarien sur l'infertilité associée à l'endométriose a fait l'objet d'une méta-analyse

dans la Cochrane Library en 2007 (38). Ces travaux concluent à l'absence de bénéfice sur la fertilité. Il n'y a donc pas de place pour un traitement médical pour une femme endométriosique infertile. En revanche, pour les patientes devant bénéficier d'une FIV, il semble avoir un intérêt à suivre un traitement prolongé par analogues de la GnRH qui optimisent la réceptivité à l'implantation embryonnaire. Une revue récente de la Cochrane database (39) a conclu au bénéfice de l'administration d'agonistes de la GnRH trois à six mois avant une FIV ou une ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) chez les patientes endométriosiques avec une augmentation du taux de grossesses cliniques par quatre. Ces résultats pourraient s'expliquer par une amélioration de la qualité ovocytaire ou par une meilleure réceptivité endométriale.

Place du traitement chirurgical

Le traitement chirurgical a montré son efficacité à favoriser les grossesses spontanées par rapport au traitement médical ou à l'expectative dans toutes les formes d'endométriose (40). Ceci est conforté par une méta-analyse de la Cochrane (41) retrouvant la même supériorité du traitement chirurgical dans les formes légères d'endométriose. Dans ces deux études, il n'y avait pas d'intérêt à l'association d'un traitement médicamenteux en postopératoire (agonistes, progestatif, etc.).

Il existe deux études contrôlées dans la littérature sur le traitement chirurgical de l'endométriose aux stades I et II chez les patientes infertile (42, 43). Si on combine les résultats de ces deux études, le gain

en termes de fertilité est de 8,6 % (41). La chirurgie semble donc avoir sa place dans le traitement de l'infertilité pour les stades I-II. L'efficacité des différentes méthodes chirurgicales (exérèse, électrocoagulation, cryothérapie) semble être identique (42). Pour les stades III et IV, on semble aussi retrouver la supériorité de la chirurgie sur le traitement médical ou l'expectative (40). Les études sont nombreuses mais peu comparatives.

La chirurgie a donc sa place dans le traitement de première intention de l'infertilité chez les patientes endométriosiques. En cas d'endométriose profonde, si les risques potentiels de la chirurgie sont élevés, la stratégie peut être reconsidérée. Un recours direct à la FIV sans geste chirurgical est recommandé (Recommandations pour la pratique clinique, CNGOF, 2006). Il n'y a pas de place à une deuxième chirurgie si la chirurgie initiale ne restaure pas la fertilité. Ceci fait également partie des recommandations du CNGOF (2006).

Ceci reste toutefois à nuancer.

Il existe plusieurs facteurs pouvant influencer les résultats de la chirurgie : l'âge, la durée d'infertilité, la réserve ovarienne, l'existence d'une pathologie utérine associée, les facteurs masculins, l'importance des adhérences ovariennes et tubaires. Tout ceci est à prendre en compte dans la stratégie thérapeutique. Par exemple, en cas de stérilité masculine, le recours à la FIV sans geste chirurgical est recommandé. La notion d'âge fait introduire le concept de FIV d'urgence : la chirurgie ne doit pas retarder la prise en charge de la patiente. Après chirurgie, 80 % des grossesses surviennent la première année avec 60 % dans les six premiers mois.

Après une chirurgie satisfaisante chez une patiente ne présentant pas d'autres facteurs péjoratifs, il est recommandé de respecter un délai d'attente de 6 à 12 mois avant de proposer une nouvelle thérapeutique (RCP CNGOF, 2006). Ce délai est à moduler en fonction de la patiente et des autres facteurs d'infertilité. Une étude italienne a montré qu'après traitement chirurgical de l'endométriose, seulement 51 % des patientes restant infertiles avaient recours à la FIV. Ceci souligne le problème de l'approche globale de l'endométriose et l'absence de collaboration entre les centres de FIV et les chirurgiens (44).

La stratégie chirurgicale est également à élaborer en fonction d'une douleur pelvienne associée à l'endométriose : l'efficacité de la chirurgie sur la prise en charge de la douleur ayant été prouvée.

Place de l'assistance médicale à la procréation

Après échec des traitements chirurgicaux ou en première intention selon le contexte, une prise en charge en médecine de la reproduction est proposée.

La place de la stimulation ovarienne associée ou non à une insémination dans un contexte d'endométriose a largement été étudiée. Une étude sur les éléments affectant les résultats des inséminations intra-utérines (IIU) a mis en évidence le rôle péjoratif de l'endométriose : si on compare les résultats de l'IIU dans l'infertilité inexploquée et dans l'endométriose, il y a un taux de grossesse significativement plus faible dans l'endométriose avec un odds-ratio à 2,79 (45). De plus, il a été montré récemment que la récurrence de l'endométriose était plus fréquente après IIU qu'après FIV contrairement à ce qui était attendu. Ceci pourrait s'expliquer par le blocage des patientes par des analogues de la LH-RH dans les protocoles de stimulation pour la FIV. L'indication des IIU ne semble donc plus avoir de place dans l'endométriose et pourrait même être délétère. Certaines équipes recommandent cependant les IIU dans des stades modérés d'endométriose. Le délai de recours aux IIU est alors de six à douze mois après la chirurgie. Il peut être diminué en présence de facteurs d'infertilité associés comme des troubles de l'ovulation, une hypofertilité masculine. On doit recourir à la FIV d'emblée en présence d'une réserve ovarienne altérée, d'un âge élevé ou d'adhérences très importantes. Le CNGOF recommande de recourir directement à la FIV en cas d'une endométriose de stade III-IV ou d'une localisation tubaire.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'endométriose et la FIV avec des résultats discordants. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines de ces études ont contribué à mieux comprendre les mécanismes entraînant l'infertilité dans la FIV. Une méta-analyse a été réalisée par Barnhart *et al.* (46) : elle reprend 22 études et porte sur 2 377 cycles de FIV chez des patientes endométriosiques et 4 383 cycles de FIV d'indication autre. Le taux de grossesses obtenues après FIV, le taux d'œstradiol, le nombre d'ovocytes recrutés au cours de la stimulation ovarienne, le taux d'embryons obtenus et le pourcentage d'implantation ont été étudiés. Dans la méta-analyse, tous les marqueurs cités précédemment sont diminués dans l'endométriose avec une réduction du taux de grossesses après FIV de 54 % par rapport aux patientes ayant une stérilité tubaire et une diminution significative du taux d'implantation dans l'endométriose (12 % *versus* 18 % pour le groupe de stérilité tubaire). Quand on compare ces marqueurs en fonction de la sévérité de l'endométriose, ils sont tous diminués dans l'endométriose sévère à l'exception du taux d'embryons fécondés. Ceci conduit à une diminution de 36 % du taux de grossesse dans l'endométriose sévère (stades III-IV) par rapport à un stade modéré de la maladie (stades I-II). Tout ceci suggère donc que l'endométriose n'a pas pour seul effet sur la fertilité des modifications anatomo-

miques pelviennes mais qu'elle semble entraîner des modifications des développements folliculaire, ovocytaire et embryonnaire, lui conférant des difficultés à s'implanter. Ces mauvais résultats de la FIV chez les patientes endométriosiques sont toutefois contestés. En effet, d'après les résultats de FIVNAT 2002, le taux de grossesse par ponction était de 22,8 % pour l'endométriose isolée *versus* 21,9 % pour l'infertilité tubaire *versus* 18,9 % pour les infertilités inexplicables. S'il n'est pas certain que les résultats de la FIV (en ce qui concerne le taux de grossesse) soient altérés par l'endométriose, différentes études retrouvent une diminution du taux de fécondation, une diminution du taux d'implantation, une augmentation du nombre d'ampoules utilisées pour la stimulation ovarienne et une diminution du nombre d'ovocytes ponctionnés (47). Une étude récente (48) a montré que les patientes avec une endométriose avancée et qui avaient eu une chirurgie répondaient moins bien aux gonadotrophines (diminution du taux d'œstradiol, doses plus importantes de gonadotrophines, moins d'ovocytes ponctionnés), mais avaient le même taux de naissances que les patientes avec une infertilité tubaire.

De nombreuses études suggèrent que les patientes ayant une endométriose sévère ont intérêt à avoir eu un traitement prolongé par analogues de la GnRH avant de débiter une FIV, en particulier en cas de récurrences post-chirurgicales ou en l'impossibilité d'une chirurgie complète. En effet, chez les patientes avec une endométriose sévère, six mois de traitement hormonal par analogues de la GnRH augmentent le taux de grossesses cliniques (39). La dose de FSH ou d'HMG utilisée pour la stimulation reste la même. La durée de la stimulation reste identique. Le nombre d'ovocytes ponctionnés, le nombre d'embryons obtenus semblent augmentés avec une diminution des fausses couches, de la durée du traitement et diminution des doses de gonadotrophines.

Cas particulier de l'endométriose

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'endométriose est une maladie qui peut se manifester sous des formes très différentes. L'endométriose est une forme à part d'endométriose. La prise en charge de l'endométriose reste débattue. La présence d'endométrioses lors d'une FIV demanderait l'utilisation de plus de gonadotrophines avec une diminution du nombre d'ovocytes ponctionnés (49). Cependant, l'impact sur les résultats de la FIV semble très faible. Ceci suggère que l'endométriose n'altère pas la qualité embryonnaire et le taux de grossesse. L'endométriose n'est pas

une contre-indication à la FIV. La découverte d'un endométriose lors d'une stimulation de FIV ne doit donc pas conduire à l'interruption de la tentative (Recommandations du CNGOF). Il n'y a pas de contamination des ovocytes par le liquide folliculaire.

Faut-il opérer les endométrioses ? La chirurgie n'ayant pas d'effet favorable sur les résultats de la FIV, l'un des arguments restant est la prévention des risques de survenue de complications infectieuses survenant au décours de la ponction d'ovocytes. En effet, plusieurs cas d'abcédation ont été rapportés dans la littérature. Lors de la ponction ovocytaire, il ne faut donc pas ponctionner les endométrioses et proposer une antibiothérapie prophylactique.

Si l'endométriose n'empêche pas la FIV, l'effet délétère de la chirurgie est en revanche largement débattu et la chirurgie itérative expose au risque de diminution de la réserve ovarienne. Ceci est dû à l'absence de plan de clivage de l'endométriose. En effet, l'endométriose est constitué par une invagination du cortex ovarien. Pour les endométrioses de moins de 6 cm, ni le traitement chirurgical, ni le traitement itératif, ni la ponction des endométrioses ne sont recommandés avant la FIV (Recommandations du CNGOF). L'aspiration-drainage des kystes avant la FIV n'a pas d'intérêt sur les résultats, sauf si le kyste mesure plus de 6 cm et la kystectomie intrapéritonéale avant la FIV n'améliore pas les résultats (50).

Au total, il semble préférable d'effectuer une kystectomie pour endométriose si une grossesse spontanée semble possible. Si une FIV est envisagée d'emblée, l'efficacité du traitement chirurgical semble limitée. En cas de récurrence d'endométriose avant FIV, il ne semble pas justifié d'effectuer un nouveau traitement chirurgical.

Concernant les modalités de traitement chirurgical, la kystectomie semble préférable au drainage du kyste ovarien ou à la vaporisation laser. Le taux de grossesses spontanées est augmenté et il y a moins de récurrences d'endométriose, de douleur.

Grossesse et endométriose

D'après les données de FIVNAT, l'endométriose ne cause pas d'augmentation du taux de fausses couches spontanées. Il n'y aurait pas d'augmentation des complications obstétricales chez les patientes atteintes d'endométriose. La grossesse n'aggrave pas la maladie. Le taux de récurrence après traitement chirurgical de l'endométriose est de 28,3 % *versus* 16,7 % en cas de grossesse pour l'endométriose ovarienne, 21,1 % *versus* 14,8 % pour l'endométriose péritonéale, 34,1 % *versus* 19,1 % pour l'endométriose profonde.

Conclusion

L'endométriose est une maladie qui se présente sous diverses formes et dont la physiopathologie est mal connue. Les causes de l'infertilité sont mal comprises, ce qui complique la prise en charge de la maladie. Lors d'une atteinte adhérentielle et tubaire, l'infertilité liée à l'endométriose est facile à expliquer mais dans les autres cas aucune théorie globale n'existe. Les effets sur l'implantation ne sont pas prouvés et, actuellement, l'hypothèse d'une altération de la qualité ovocytaire est plutôt privilégiée. Il y aurait probablement un défaut de maturation ovocytaire durant la fin de phase folliculaire.

La place de la chirurgie reste à définir dans le traitement de l'infertilité liée à l'endométriose d'autant plus avec le développement des techniques de FIV. Les deux techniques améliorent le taux de grossesse et le problème est de savoir dans quels cas il faut recourir à telle technique. Une meilleure connaissance de l'origine de l'infertilité dans l'endométriose permettrait de mieux cibler l'indication du traitement chirurgical. La chirurgie permet également de diminuer les douleurs dans 80 % des cas. La prise en charge de l'infertilité doit bien évidemment prendre en compte cet élément et elle doit donc s'effectuer de manière globale dans le cadre d'une équipe multidisciplinaire incluant à la fois des chirurgiens gynécologiques et des médecins spécialistes de la reproduction.

Références

- Olive DL, Schwartz LB (1993) Endometriosis. *N Engl J Med* 328: 1759-69
- Asrm (Associated Society of Reproductive Medicine) (2004) Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 81: 1441-6
- Hughes EG, Fedorkow DM, Collins JA (1993) A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 59: 963-70
- Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB *et al.* (1982) Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 38: 667-72
- Gazvani R, Templeton A (2002) Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123: 217-26
- Hou Z, Zhou J, Ma X *et al.* (2008) Role of interleukin-1 receptor type II in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril* 89: 42-51
- Giudice LC (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 61: 1-17
- Yoshida S, Harada T, Iwabe T *et al.* (2004) A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum Reprod* 19: 1821-5
- Garcia-Velasco JA, Arici A (1999) Interleukin-8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. *Fertil Steril* 72: 336-40
- Calhaz-Jorge C, Costa AP, Santos MC *et al.* (2003) Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis depend on the severity of the disorder and are higher in the luteal phase. *Hum Reprod* 18: 593-7
- Wu MY, Ho HN, Chen SU *et al.* (1999) Increase in the production of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-12 by lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 41: 106-11
- Gazvani R, Smith L, Fowler PA (2002) Effect of interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8, and IL-12 on endometrial cell survival in combined endometrial gland and stromal cell cultures derived from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 77: 62-7
- Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E *et al.* (2001) Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1823-34
- Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A *et al.* (2003) Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 80: 889-94
- Arici A, Oral E, Attar E *et al.* (1997) Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril* 67: 1065-72
- Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A *et al.* (2006) Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 86: 1616-20
- Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisli UA *et al.* (2002) Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril* 78: 855-9
- Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM *et al.* (1997) Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 600-6
- Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A *et al.* (2003) Increased pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) concentrations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 49: 70-4
- Suzumori N, Ozaki Y, Ogasawara M *et al.* (2001) Increased concentrations of cathepsin D in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 7: 459-62
- Bedaiwy MA, Falcone T, Goldberg J M *et al.* (2006) Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. *Hum Reprod* 21: 788-91
- Faber BM, Chegini N, Mahony M C *et al.* (2001) Macrophage secretory products and sperm zona pellucida binding. *Obstet Gynecol* 98: 668-73
- Said TM, Agarwal A, Falcone T *et al.* (2005) Infliximab may reverse the toxic effects induced by tumor necrosis factor alpha in human spermatozoa: an in vitro model. *Fertil Steril* 83: 1665-73
- Minici F, Tiberi F, Tropea A *et al.* (2008) Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. *Hum Reprod* 23: 530-7
- Szczepanska M, Skrzypczak J, Kamieniczna M *et al.* (2001) Antizona and antisperm antibodies in women with endometriosis and/or infertility. *Fertil Steril* 75: 97-105
- Garrido N, Navarro J, Remohi J *et al.* (2000) Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 6: 67-74
- Pellicer A, Valbuena D, Bauset C *et al.* (1998) The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril* 69: 1135-41
- Smith MP, Keay SD, Margo FC *et al.* (2002) Total cortisol levels are reduced in the periovulatory follicle of infertile

- women with minimal-mild endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 47: 52-6
29. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Freitas FM *et al.* (2003) Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod* 18: 423-8
 30. Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA *et al.* (1997) Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 14: 554-7
 31. Lemos NA, Arbo E, Scalco R *et al.* (2008) Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* 89: 1064-8
 32. Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M *et al.* (2001) Interleukin 1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril* 75: 489-95
 33. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA *et al.* (2003) Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 299: 405-8
 34. Kao LC, Germeyer A, Tulac S *et al.* (2003) Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144: 2870-1
 35. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A *et al.* (1995) Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 10 Suppl. 2: 91-7
 36. Simon C, Gutierrez A, Vidal A *et al.* (1994) Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 9: 725-9
 37. Diaz I, Navarro J, Blasco L *et al.* (2000) Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril* 74: 31-4
 38. Hughes E, Brown J, Collins JJ *et al.* (2007) Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD000155
 39. Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S *et al.* (2006) Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD004635
 40. Adamson GD, Pasta DJ (1994) Surgical treatment of endometriosis-associated infertility: meta-analysis compared with survival analysis. *Am J Obstet Gynecol* 171: 1488-504
 41. Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR *et al.* (2002) Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD001398
 42. Marcoux S, Maheux R, Berube S (1997) Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med* 337: 217-22
 43. Parazzini F (1999) Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod* 14: 1332-4
 44. Somigliana E, Daguati R, Vercellini P *et al.* (2009) The use and effectiveness of in vitro fertilization in women with endometriosis: the surgeon's perspective. *Fertil Steril* 91: 1775-9
 45. Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R *et al.* (1999) Intra-uterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod* 14: 698-703
 46. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C (2002) Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 77: 1148-55
 47. Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J *et al.* (2000) Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 15: 72-5
 48. Matalliotakis IM, Cakmak H, Mahutte N *et al.* (2007) Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility. *Fertil Steril* 88: 1568-72
 49. Somigliana E, Infantino M, Benedetti F *et al.* (2006) The presence of ovarian endometriomas is associated with a reduced responsiveness to gonadotropins. *Fertil Steril* 86: 192-6
 50. Busacca M, Riparini J, Somigliana E *et al.* (2006) Postsurgical ovarian failure after laparoscopic excision of bilateral endometriomas. *Am J Obstet Gynecol* 195: 421-5

E. Daraï, J. Seror,
C. Coutant, R. Rouzier,
M. Bazot et M. Ballester

Endométriose profonde et fertilité

Introduction

L'endométriose est une pathologie gynécologique définie par la présence de glandes endométriales et de stroma en dehors de l'utérus (1). Selon les estimations, elle affecterait de 10 à 15 % des femmes en période de reproduction et atteindrait 40 à 50 % chez les femmes infertiles (2). Des données épidémiologiques suggèrent une augmentation de l'incidence de l'endométriose du fait de l'impact de facteurs environnementaux (3-5).

Il n'existe pas de consensus sur la définition de l'endométriose profonde. Certains auteurs suggèrent qu'une endométriose profonde devrait être évoquée dès lors qu'il existe une infiltration en profondeur de plus de 5 mm. Cette notion fait référence au travail de Koninck *et al.* soulignant qu'il existait une relation directe entre l'infiltration en profondeur et l'intensité des douleurs sans pour cela définir une relation entre la profondeur d'infiltration et le diagnostic de l'endométriose profonde (1). À cette définition sujette à controverse, nous définirons l'endométriose profonde par l'infiltration des structures anatomiques et/ou des organes par du tissu endométriosique.

Bien que l'incidence exacte de l'endométriose profonde reste incertaine, elle affecterait 20 % des patientes porteuses d'une endométriose. Les diverses localisations de l'endométriose profonde par ordre décroissant de fréquence sont les ligaments utéro-sacrés, le recto-sigmoïde, le vagin et la vessie (6). L'endométriose digestive est l'une des formes les plus graves de l'endométriose profonde et affecterait jusqu'à 12 % des patientes présentant une endométriose (7, 8). Le rectum et le recto-sigmoïde représentent jusqu'à 93 % de l'ensemble des lésions intestinales de l'endométriose (8-12).

Outre l'impact négatif des localisations profondes de l'endométriose sur les douleurs et la qualité de vie, elle pourrait avoir un effet négatif sur la fertilité. Il est difficile de faire une relation entre l'infertilité et la présence d'une endométriose profonde du fait de son association quasi systématique à des localisa-

tions superficielles et ovariennes de l'endométriose. Ceci est d'autant plus logique que l'endométriose profonde s'inscrirait dans l'histoire naturelle de l'endométriose par l'apparition première de lésions superficielles qui secondairement évolueraient vers des formes profondes, de ce fait les formes profondes isolées seraient exceptionnelles (13).

Endométriose profonde et fertilité

L'absence de définition consensuelle de l'endométriose profonde représente un facteur limitant permettant d'évaluer les relations entre endométriose profonde et fertilité. De plus, les classifications internationales de l'endométriose, notamment celle de l'American Society of Reproductive Medicine (ASRM), ne prennent pas en compte les lésions profondes. Vercellini *et al.* suggéraient que la classification actuelle de l'endométriose a une valeur prédictive insuffisante en ce qui concerne les principaux résultats cliniques, y compris la fertilité et le taux de récurrence (14). Dans leur étude, la probabilité cumulée de grossesse à 3 ans de la chirurgie chez 537 femmes infertiles était de 47 %. Ce taux ne différait pas de façon significative en fonction du stade (51 % pour les stades I, 45 % pour les stades II, 46 % pour les stades III et 44 % pour les stades IV ; log-rank test, χ^2 3 = 1,50, p = 0,68).

Nous ne disposons que d'études de faible niveau de preuve pour analyser les relations entre endométriose profonde et fertilité. Les recommandations de ESHRE de 2005, sans utiliser une définition précise de l'endométriose profonde, soulignaient que les données de la littérature étaient insuffisantes pour prouver l'intérêt de la chirurgie sur la fertilité (15). Les recommandations du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) publiées en 2007 soulignaient que le traitement chirurgical de l'endométriose de stades 3 et 4 s'avérait supérieur à l'abstention thérapeutique ou au traitement médical

en termes de fertilité. En effet, les résultats de la chirurgie se situent entre 25 et 35 % d'accouchement après à 12 mois dans les stades 3 et 4 (grade A) (16). Toutefois, ces mêmes recommandations soulignaient que pour les endométrioses profondes, les données étaient insuffisantes pour conclure sur l'intérêt de la chirurgie pour améliorer la fertilité et devait tenir compte d'une morbidité non négligeable.

Endométriose profonde et fertilité à l'exclusion des atteintes digestives

En faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*uterosacral ligament and endometriosis*), seuls 127 articles sont identifiés contrastant avec plus de 16 000 articles consacrés à l'endométriose. Parmi les 127 articles, seules 5 articles sont consacrés à la fertilité après chirurgie des ligaments utéro-sacrés. Ces cinq articles émanent de la même équipe de C. Chapron et J.B. Dubuisson. Le travail publié en 1999 concernait 30 patientes infertiles ayant pour seul facteur d'infertilité une endométriose profonde avec atteinte des ligaments utéro-sacrés (17). Quatorze patientes ont été enceintes spontanément après chirurgie. Le taux cumulé de grossesse à 12 mois était de 48,5 % (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 28,3-68,7). Outre cette donnée, les auteurs soulignaient l'absence de corrélation entre le score révisé de la classification de l'American Fertility Society (rAFS ancienne dénomination du score ASRM) et le taux de grossesse. Les auteurs suggéraient une possible relation entre la présence de lésions de l'endométriose profonde et l'infertilité. À la suite de ce travail, ces mêmes auteurs rapportaient le taux d'adhérences après chirurgie pour résection des lésions endométriosiques des ligaments utéro-sacrés (18). Parmi les 46 patientes ayant eu une coelioscopie de second regard, 15 patientes (32,6 %) ne présentaient pas d'adhérences sur le site opératoire, 24 patientes (52,2 %) présentaient des adhérences vélamenteuses et 7 patientes (15,2 %) avaient des adhérences denses et vascularisées. À l'inverse de la fertilité, les auteurs retrouvaient une relation entre le score rAFS préopératoire et le risque d'adhérences. De même, le risque d'adhérences était plus élevé après résection bilatérale des ligaments utéro-sacrés. Compte tenu du risque élevé d'adhérences postopératoire après résection de ligaments utéro-sacrés, le bénéfice de la chirurgie doit être discuté. La place des produits anti-adhérences dans cette indication n'a pas fait l'objet d'étude. Bien que l'atteinte des ligaments utéro-sacrés soit la plus fréquente des lésions de l'endométriose profonde, on peut s'interroger sur l'absence de données de niveau de preuve suffisant pour recommander l'ablation des ligaments utéro-

sacrés dans le cadre de l'infertilité. Aucune étude n'est disponible permettant d'évaluer les résultats de la procréation médicalement assistée chez les patientes ayant une endométriose profonde avec atteinte isolée des ligaments utéro-sacrés.

En faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*torus uterinum and endometriosis*), il n'existe pas d'étude évaluant l'intérêt de l'ablation des lésions endométriosiques isolées du torus uterinum sur la fertilité. Il est vrai que cette localisation est le plus souvent associée à d'autres lésions profondes et que la définition anatomique du torus reste sujette à controverse. Elle pourrait se définir par l'infiltration endométriosique de la face postérieure de l'utérus à la jonction corps et col, lieu d'insertion des ligaments utéro-sacrés.

En faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*vaginal endometriosis and fertility*), aucune étude ne permet d'évaluer l'intérêt de la chirurgie de l'endométriose vaginal sur la fertilité. Comme pour les lésions du torus uterinum, l'absence de données peut s'expliquer par la rareté de lésions isolées du vagin.

En faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*rectovaginal septum endometriosis, rectovaginal endometriosis and fertility, rectovaginal septum endometriosis and fertility*), 215, 39 et 25 articles ont été respectivement identifiés. Le terme « rectovaginal septum endometriosis » peut correspondre aux lésions de la cloison recto-vaginale des auteurs francophones. Ces lésions englobent le plus souvent l'association des lésions des ligaments utéro-sacrés, du torus uterinum ainsi que celles du vagin. Cependant, il convient de souligner qu'il existe un flou dans la littérature sur la définition des lésions de la cloison recto-vaginale. Si l'on prend une définition anatomique de la cloison recto-vaginale, il ne pourrait s'agir que de lésions sous-péritonéales s'étendant du cul-de-sac de Douglas jusqu'au noyau fibreux central du périnée. Or cette entité est, dans notre expérience, rare et correspond volontiers en l'extension en sous-péritonéal dans la cloison recto-vaginale de lésions ayant pris naissance en intrapéritonéal (19, 20). Donnez et Nisolle suggèrent une fréquence plus importante de lésions de la cloison recto-vaginale qu'ils qualifient d'adénomyose de la cloison recto-vaginale (21, 22). Sans rentrer dans une polémique, nous prendrons en compte les études mentionnant une atteinte de la cloison recto-vaginale en excluant celles concernant des patientes avec atteintes digestives. De ce fait, peu d'études sont disponibles. Abbott *et al.*, dans un essai randomisé comparant une exérèse chirurgicale de l'endométriose profonde *versus* l'expectative, ont montré un avantage de la stratégie chirurgicale en termes d'amélioration des symptômes et de la qualité de vie et bien que le critère principal de jugement

n'était pas la fertilité, il existait un avantage de la chirurgie sur la survenue de grossesse (23). L'étude de Hollett-Caines *et al.* incluait 46 patientes présentant une oblitération du cul-de-sac de Douglas et une infiltration de la cloison recto-vaginal traitées par ablation complète des lésions par coelioscopie sans résection intestinale (24). Ces auteurs rapportaient après chirurgie un taux cumulé de grossesse pour les patientes ayant une infertilité secondaire de 42 % et qui atteignait 62 % pour celles ayant une infertilité primaire. Les conclusions des auteurs étaient d'une part que la chirurgie par coelioscopie offrait la possibilité d'une chirurgie complète avec une amélioration des symptômes et, d'autre part, un taux élevé de grossesse, tout en soulignant que cette chirurgie devait être faite par des opérateurs entraînés et qu'il existait des paramètres individuels non identifiés dans cette étude pouvant influencer sur la fertilité. Ces résultats étaient en accord avec ceux de Redwine et Wright concernant les patientes ayant eu une chirurgie pour une oblitération complète du cul-de-sac de Douglas (11). Cependant, à l'inverse de l'étude de Hollett-Caines *et al.*, il est difficile dans le travail de Redwine et Wright d'analyser les résultats sur la fertilité chez les patientes n'ayant pas eu de résection digestive. De plus, l'impact de l'expérience des opérateurs sur le caractère optimal de la chirurgie et le taux de récurrence a été confirmé par l'étude récente de Carmona *et al.* (25). L'étude prospective de Vercellini *et al.* consistait en l'évaluation de la fertilité dans un groupe de patientes opérées par laparotomie pour des lésions de la cloison recto-vaginale comparé à un groupe ayant refusé la chirurgie basé sur une décision partagée (14). Il ne s'agit pas au sens strict d'une étude randomisée. Les taux de grossesse dans le groupe opéré et non opéré étaient de 44,9 % et 46,8 % (différence non significative). Ces auteurs concluaient que la chirurgie ne semblait pas avoir d'impact sur la fertilité. Cette étude comporte de nombreux biais : l'absence d'un calcul de puissance permettant d'inclure un nombre suffisant de patientes dans chaque groupe pour montrer une différence significative, la proposition d'une chirurgie par laparotomie alors que de nombreux travaux disponibles à l'époque avaient démontré la faisabilité de la chirurgie par coelioscopie, le risque d'adhérences postopératoire plus élevé par laparotomie comparé à la coelioscopie et, enfin, une probable sélection de patientes pour la chirurgie ayant une maladie plus symptomatique donc plus étendue et dont le pronostic sur la fertilité pourrait être plus réservé. Récemment, l'étude de Stepniewska *et al.* évaluant la fertilité après résection d'une endométriose profonde soulignait que 50 % des patientes devenaient spontanément enceintes dans la première année suivant la chirurgie (26). Meuleman *et al.* rapportaient sur une série de 56 patientes ayant une endométriose profonde

traitée par excision au laser que le taux cumulé de grossesse était de 31 % à un an et 70 % à 4 ans (27). Malgré ces résultats encourageants, l'absence d'essai randomisé ayant comme critère principal de jugement la fertilité rend difficile l'établissement de recommandations quant à l'intérêt de la chirurgie de l'endométriose profonde en cas d'infertilité.

En faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*bladder endometriosis and fertility, urinary endometriosis and fertility*), 38 et 65 articles ont été respectivement identifiés mais seulement un article rapportait effectivement des résultats sur la fertilité. Sur une série de 24 patientes, Le Tohic *et al.* observaient chez onze patientes désirant concevoir sept grossesses dont quatre chez des patientes infertiles (28).

Endométriose digestive et fertilité

Bien que la fréquence de l'atteinte digestive de l'endométriose soit relativement faible par rapport notamment aux lésions des ligaments utéro-sacrés, en faisant une interrogation de la base de données MedLine en utilisant les mots clés (*bowel endometriosis and fertility, intestinal endometriosis and fertility, digestive endometriosis and fertility, colorectal endometriosis and fertility*) 93, 64, 42, et 18 articles ont été respectivement identifiés. Dans une revue de la littérature sur la fertilité après résection colorectale, Daraï *et al.* soulignaient que 44,6 % des patientes désirant une grossesse ont pu l'obtenir (29). Toutefois, il est difficile de différencier au sein de ces patientes celles ayant eu une grossesse spontanée de celles ayant eu une grossesse après assistance médicale à la procréation. De même, il est impossible de distinguer les patientes véritablement infertiles de celles désirant une grossesse mais sans facteur identifié d'infertilité. En réactualisant les données sur la fertilité après résection colorectale pour endométriose (tableau I), plus de la moitié des patientes ont pu obtenir une grossesse tout en soulignant une fois de plus les biais potentiels de ce type d'analyse.

Tableau I – Fertilité après résection colorectale pour endométriose.

Auteurs	Patientes désirant une grossesse	Patientes enceintes
Nezhat (39)	8	1
Jerby (10)	7	3
Possover (40)	15	8
Redwine et Wright (11)	28	12
Lyons (41)	3	3
Ferrero (31)	46	22
Ballester (34)	55	24
Total	162	(45 %)

Dans notre expérience initiale (premier article de *Fertil. Steril.*), nous avons constaté que la présence d'une adénomyose détectée à l'IRM préopératoire était un facteur prédictif négatif de fertilité après résection colorectale (30). Ces résultats ont été confirmés par deux études mais qui ne différenciaient pas l'adénomyose interne (adénomyose classique avec infiltration du myomètre de dedans en dehors) de l'adénomyose externe (adénomyose liée à l'infiltration du myomètre de dehors en dedans), cette dernière correspondant à l'infiltration de la séreuse utérine puis du myomètre à partir de lésions intrapéritonéales (31, 32). Cette distinction nous paraît d'autant plus importante que l'on pourrait postuler qu'*a priori* seule l'adénomyose interne serait susceptible d'altérer le taux d'implantation. Quoi qu'il en soit, Ferrero *et al.* incluant des patientes ayant une résection colorectale segmentaire pour endométriose confirmaient que la présence d'une adénomyose était un facteur pronostique négatif de la fertilité (31). Ces données sont en accord avec ceux de Kissler *et al.* montrant qu'il existait une perturbation du transport des spermatozoïdes en rapport avec un hyperpéristaltisme lorsqu'au moins un foyer d'adénomyose était détecté en IRM et qu'il existait également un dyspéristaltisme (perte complète de la capacité de transport des spermatozoïdes) lorsque l'adénomyose concernait toutes les couches du myomètre (33).

Outre l'impact de l'adénomyose, Ferrero *et al.* retrouvaient une relation entre l'âge de la patiente et la durée d'infertilité et la probabilité d'obtenir une grossesse (31). Enfin, ces mêmes auteurs soulignaient que le taux cumulé de grossesse était de 60 % pour les patientes opérées par coelioscopie alors qu'il n'était que de 25 % pour celles opérées par laparotomie. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'incidence faible des adhérences pelviennes après coelioscopie et/ou par la possibilité d'une reprise plus précoce de l'activité sexuelle chez les patientes ayant bénéficié d'une chirurgie endoscopique. Ces données étaient en accord avec ceux de Adamson *et al.*, soulignant que le bénéfice de la chirurgie sur la fertilité était surtout notable pour les patientes traitées par coelioscopie que par laparotomie (RR : 1,87 ; $p = 0,031$) (16). Dans un travail en cours de publication, nous retrouvons un impact positif de la chirurgie par coelioscopie ainsi qu'une relation avec le score ASRM (34). Dans notre essai randomisé comparant la coelioscopie à la laparotomie pour la résection colorectale pour endométriose (35), toutes les grossesses sont survenues dans le groupe coelioscopie avec un taux cumulé dépassant 60 %. De plus, le bénéfice de la chirurgie de l'endométriose sur la fertilité était clairement prouvé dans la sous-population de femme infertile.

Malgré les résultats très favorables de la chirurgie de l'endométriose colorectale sur la fertilité, il convient de souligner que celle-ci ne s'adresse qu'à des femmes particulièrement symptomatiques du fait du risque de complications sévères à type de dysurie *de novo* et de fistule recto-vaginale (36). Lorsque la priorité du couple est avant tout celui de l'obtention d'une grossesse, le moment le plus approprié pour proposer une assistance médicale à la procréation reste un sujet de débats. Il n'existe aucune étude randomisée permettant de déterminer si une AMP devrait précéder la chirurgie ou vice versa. Cependant, l'étude de Stepniewska *et al.* évaluant la fertilité après chirurgie pour endométriose profonde avec atteinte digestive soulignait que les taux de grossesse étaient significativement supérieurs après exérèse des lésions digestives que ce soit pour les grossesses spontanées ou après AMP (26).

Critères du choix thérapeutique chez les patientes infertiles porteuses d'une endométriose profonde

En fait, le problème de l'endométriose profonde est associé à l'infertilité et l'identification des patientes qui pourraient bénéficier d'une chirurgie. La détermination de critères prédictifs de fertilité est donc un objectif majeur afin d'aider les praticiens et les couples dans le choix d'une stratégie thérapeutique.

Au congrès mondial sur l'endométriose à Melbourne en mars 2008, Adamson *et al.*, en utilisant le score rASRM, ont comparé les taux de grossesses obtenus à 2 ans après traitement par coelioscopie ou traitement médical par blocage de la fonction ovarienne (37). Ainsi pour les stades I-II, III et IV, les taux de grossesse à 2 ans après traitement coelioscopique étaient respectivement de 60 %, 50 % et 40 % *versus* 50 %, 40 % et 15 % pour le traitement médical. En termes de fertilité, le bénéfice de la chirurgie apparaissait significatif pour les patientes ayant un stade IV. Ces mêmes auteurs ont évalué l'intérêt en rétrospectif puis en prospectif d'un score permettant d'estimer la probabilité de grossesse à 1 an et 3 ans de patientes porteuses d'une endométriose. Ce score repose sur l'utilisation de différents paramètres pour lesquels un poids statistique a été attribué : âge des patientes (0, 1, 2), durée d'infertilité (0, 2), existence d'un antécédent de grossesse (0, 1), score peropératoire des lésions (0, 2, 3), score rASRM (0, 1), et score total rASRM (0, 1) (tableau II). Cette démarche semble particulièrement pertinente mais ne peut pas s'appliquer aux endométrioses profondes et impose une évaluation préalable par coelioscopie.

Des controverses existent concernant le moment le plus approprié pour proposer une procréation médicalement assistée (PMA) aux patientes présentant une endométriose profonde. Dans une étude comparant la chirurgie conservatrice à l'expectative, Vercellini *et al.* concluaient que l'exérèse chirurgicale ne permettait pas d'augmenter le taux de grossesses (14). En revanche, comme nous l'avons déjà souligné, l'étude de Stepniewska *et al.* a démontré l'effet bénéfique de la chirurgie de l'endométriose profonde sur le taux de grossesse tant en procréation spontanée qu'en AMP (insémination intra-utérine et FIV) (26). Encore faut-il savoir estimer les chances de grossesse en AMP. Younis *et al.* ont récemment évalué un score prédictif de grossesse en FIV chez les patientes infertiles (38) (tableau III). Ce score prend en compte huit paramètres : l'âge des patientes, l'index de masse corporelle, le nombre de cycle de stimulation annulé, la durée d'infertilité, le compte de follicules antraux, le volume moyen des ovaires, le taux de base de FSH, et le rapport FSH/LH. Pour chacun de ces items un score est attribué. Pour un score supérieur à 14, le taux de grossesse était de 11,3 % alors qu'il atteignait 38,6 % pour les patientes ayant un score inférieur ou égal à 14. Cependant, ce score

n'a pas reçu de validation externe et n'a pas été évalué dans la population de patientes infertiles et porteuses d'une endométriose profonde. Malgré ces limites, la médecine prédictive basée sur des modèles mathématiques est une démarche très prometteuse comme cela a déjà été démontré en oncologie.

En conclusion, malgré un faisceau d'arguments suggérant l'efficacité de la chirurgie de l'endométriose profonde sur la fertilité, le niveau de preuve reste insuffisant pour la recommander. Une balance risque/bénéfice doit être évaluée, notamment pour les atteintes colorectales exposant les patientes à des complications majeures, pour permettre une décision partagée avec le couple. La médecine prédictive permettant d'évaluer le bénéfice individuel de la chirurgie devrait être l'outil manquant pour l'établissement d'une stratégie thérapeutique.

Références

1. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ (1991) Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 55: 759-65
2. Ballweg ML (2004) Impact of endometriosis on women's health: comparative historical data show that the earlier the onset, the more severe the disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 201-18
3. Birnbaum LS, Cummings AM (2002) Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis. *Environ Health Perspect* 110: 15-21
4. Bois FY, Eskenazi B (1994) Possible risk of endometriosis for Seveso, Italy, residents: an assessment of exposure to dioxin. *Environ Health Perspect* 102: 476-7
5. Reddy BS, Rozati R, Reddy BV, Raman NV (2006) Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *Bjog* 113: 515-20
6. Jenkins S, Olive DL, Haney AF (1986) Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 67: 335-8
7. Macafee CH, Greer HL (1960) Intestinal endometriosis. A report of 29 cases and a survey of the literature. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 67: 539-55
8. Weed JC, Ray JE (1987) Endometriosis of the bowel. *Obstet Gynecol* 69: 727-30
9. Bailey HR, Ott MT, Hartendorp P (1994) Aggressive surgical management for advanced colorectal endometriosis. *Dis Colon Rectum* 37: 747-53
10. Jerby BL, Kessler H, Falcone T, Milsom JW (1999) Laparoscopic management of colorectal endometriosis. *Surg Endosc* 13: 1125-8
11. Redwine DB, Wright JT (2001) Laparoscopic treatment of complete obliteration of the cul-de-sac associated with endometriosis: long-term follow-up of en bloc resection. *Fertil Steril* 76: 358-65
12. Tran KT, Kuijpers H, Willemsen W, Bulten H (1996) Surgical treatment of symptomatic rectosigmoid endometriosis. *Eur J Surg* 162: 139-41
13. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J (1993) Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 59: 681-4
14. Vercellini P, Pietropaolo G, De Giorgi O, Daguati R (2006) Reproductive performance in infertile women with rec-

Tableau II – Taux de grossesse chez les patientes endométriosiques en fonction du score de Adamson *et al.*

Score	Taux de grossesse à 1 an (%)	Taux de grossesse à 3 ans (%)
0-3	9,9	9,9
4	15,2	27,7
5	22,8	42,2
6	29,5	54,4
7-8	39,1	66,3
9-10	56,4	74,9

Tableau III – Score prédictif de grossesse en FIV selon Younis *et al.*

Item	1	2	3	4	5
Index de masse corporelle (kg/m ²)	≤ 30	> 30			
Nombre de cycle annulé en FIV	1	2			
Durée d'infertilité (années)	≤ 2	2-10	>10		
Volume moyen de l'ovaire (cm ³)	>10	5-10	≤ 5		
Rapport des taux de base FSH/LH	≤ 2	2-4	> 4		
Taux de base de FSH (mIU/mL)	≤ 6	6-8	8-12	12-15	> 15
Nombre de follicules antraux	>12	10-12	7-9	4-6	≤ 3
Âge (années)	≤ 25	26-30	31-35	36-40	> 41

- to vaginal endometriosis: is surgery worthwhile? *Am J Obstet Gynecol* 195: 1303-10
15. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C *et al.* (2005) ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 20: 2698-704
 16. Adamson GD (2005) Laparoscopy, in vitro fertilization, and endometriosis: an enigma. *Fertil Steril* 84: 1582-4
 17. Chapron C, Fritel X, Dubuisson JB (1999) Fertility after laparoscopic management of deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments. *Hum Reprod* 14: 329-32
 18. Chapron C, Guibert J, Fauconnier A, Vieira M (2001) Adhesion formation after laparoscopic resection of uterosacral ligaments in women with endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 8: 368-73
 19. Bazot M, Darai E, Hourani R *et al.* (2004) Deep pelvic endometriosis: MR imaging for diagnosis and prediction of extension of disease. *Radiology* 232: 379-89
 20. Darai E, Thomassin I, Barranger E *et al.* (2005) Feasibility and clinical outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 192: 394-400
 21. Donnez J, Nisolle M, Smoes P *et al.* (1996) Peritoneal endometriosis and "endometriotic" nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril* 66: 362-8
 22. Nisolle M, Donnez J (1997) Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 68: 585-96
 23. Abbott J, Hawe J, Hunter D *et al.* (2004) Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 82: 878-84
 24. Hollett-Caines J, Vilos GA, Penava DA (2003) Laparoscopic mobilization of the rectosigmoid and excision of the obliterated cul-de-sac. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 10: 190-4
 25. Carmona F, Martínez-Zamora A, González X *et al.* (2009) Does the learning curve of conservative laparoscopic surgery in women with rectovaginal endometriosis impair the recurrence rate? *Fertil Steril* 92: 868-75
 26. Stepniewska A, Pomini P, Bruni F *et al.* (2009) Laparoscopic treatment of bowel endometriosis in infertile women. *Hum Reprod* 24: 1619-25
 27. Meuleman C, D'Hoore A, Van Cleynenbreugel B *et al.* (2009) Outcome after multidisciplinary CO₂ laser laparoscopic excision of deep infiltrating colorectal endometriosis. *Reprod Biomed Online* 18: 282-9
 28. Le Tohic A, Chis C, Yazbeck C, Koskas M, Madelenat P, Panel P (2009) Bladder endometriosis: diagnosis and treatment. A series of 24 patients. *Gynecol Obstet Fertil* 37: 216-21
 29. Darai E, Thomassin I, Barranger E *et al.* (2007) Outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19: 308-13
 30. Darai E, Marpeau O, Thomassin I *et al.* (2005) Fertility after laparoscopic colorectal resection for endometriosis: preliminary results. *Fertil Steril* 84: 945-50
 31. Ferrero S, Anserini P, Abbamonte LH *et al.* (2009) Fertility after bowel resection for endometriosis. *Fertil Steril* 92: 41-6
 32. Landi S, Mereu L, Pontrelli G *et al.* (2008) The influence of adenomyosis in patients laparoscopically treated for deep endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 15: 566-70
 33. Kissler S, Zangos S, Wiegatz I *et al.* (2007) Utero-tubal sperm transport and its impairment in endometriosis and adenomyosis. *Ann N Y Acad Sci* 1101: 38-48
 34. Darai E, Dubernard G, Lavoué V, Coutant C, Bazot M, Ballester M (2009) Determinant factors of fertility outcomes after colorectal resection for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (in press)
 35. Darai E, Coutant C, Frey C, Rouzier R, Ballester M (2009) Randomized trial of laparoscopically assisted versus open colorectal resection for endometriosis: morbidity, symptoms, quality of life and fertility. *Ann Surg* (in press)
 36. Vercellini P, Somigliana E, Viganò P *et al.* (2009) Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. *Hum Reprod* 24: 254-69
 37. Adamson D, (2008) Endometriosis Fertility Index (EFI): the new validated endometriosis staging system. *World Congress on Endometriosis (Abstract)*: 58
 38. Younis JS, Jadaon J, Izhaki I *et al.* (2009) A simple multivariate score could predict ovarian reserve, as well as pregnancy rate, in infertile women. *Fertil Steril* (in press)
 39. Nezhat C, Nezhat F, Pennington E (1992) Laparoscopic treatment of infiltrative rectosigmoid colon and rectovaginal septum endometriosis by the technique of videolaparoscopy and the CO₂ laser. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 664-7
 40. Possover M, Diebolder H, Plaul K, Schneider A (2000) Laparoscopically assisted vaginal resection of rectovaginal endometriosis. *Obstet Gynecol* 96: 304-7
 41. Lyons SD, Chew S, Thomson A *et al.* (2006) Clinical and quality-of-life outcomes after fertility-sparing laparoscopic surgery with bowel resection for severe endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 13: 436-41

J.-L. Pouly, F. Brugnon,
S. Matzusaki, M. Canis,
R. Peikrishvili, Z. Bouraoui,
L. Dejou et L. Janny

Endométriose et fécondation *in vitro*

Introduction

Malgré de multiples recherches, ni l'étiologie de l'endométriose, ni sa physiopathologie dans l'infertilité n'ont pu être élucidées hormis les cas d'endométriose sévères où existe un facteur mécanique (1-3).

Les résultats des traitements classiques sont finalement assez décevants que ce soient la chirurgie ou les traitements médicaux. Aussi, il est bien logique que le recours à l'assistance médicale à la procréation (AMP) soit apparu dans ces cas. Ce sujet a toujours suscité des avis très opposés. Sa grande difficulté vient de la variabilité des avis pas toujours clairement étayés et d'une somme impressionnante de publications imparfaites.

Dans les pages qui suivent nous tenterons de répondre à plusieurs questions.

- Quelle AMP proposer ?
- Quand situer l'AMP par rapport au traitement chirurgical ?
- Qu'espérer de ces techniques en termes de résultats ?
- Quelles sont les spécificités des AMP en cas d'endométriose ?
- Existe-t-il des traitements ou protocoles particuliers ?
- Existe-t-il des cas particuliers ?
- Que faire en cas d'endométriose ?

Place de l'AMP dans la stérilité par endométriose

Il est admis par tous que la première ligne de traitement de la stérilité par endométriose est en général la chirurgie. Partant de cette considération, la place de l'AMP se discute sur trois versants.

AMP d'emblée

Il existe des cas où le recours direct à l'AMP se justifie car la chirurgie de l'endométriose n'apporte rien, ou est dangereuse. En pratique cette situation existe dans trois cas.

Association à une autre cause majeure d'infertilité

La situation la plus caricaturale est celle du couple où le mari présente une atteinte très sévère du sperme, telle que seule l'*intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) offre une chance de grossesse et où la femme présente une endométriose clinique et/ou échographiquement évidente. La question se pose alors de « shunter » la chirurgie de l'endométriose pour aller directement vers l'ICSI. D'autres situations analogues peuvent être envisagées comme par exemple l'association de grossesse extra-utérine (GEU) à répétition et d'endométriose.

Le débat porte sur le bénéfice qu'apporte la chirurgie dans le résultat de la FIV/ICSI et les avis divergent. Pour Garcia-Velasco (4) la chirurgie ne présente aucun avantage. Pour Matzusaki et Shakine (5), tout au contraire, la chirurgie d'abord est préférable car elle améliore les performances de la FIV en termes de grossesse. À ce jour, la réponse est inconnue et seule une étude randomisée multicentrique pourrait clarifier cette question.

Endométriose sévère avant la chirurgie

Il est des cas où l'examen clinique et l'imagerie (hystérosalpingographie – HSG, échographie, IRM) laissent présager une atteinte très sévère avec participation adhérentielle et tubaire, telle que le bénéfice de la chirurgie en termes de fertilité naturelle peut être considéré comme nul. La situation est un peu différente de la précédente car dans ces cas-là, la chirurgie présente un risque indéniable de complications immédiates (fistules) ou retardées (insuffisance ovarienne). Aboulgar plaide dans ces cas pour le passage direct en AMP (6).

Renoncement à la chirurgie

La découverte peropératoire de lésions tubaires et adhérentielles qui dépassent les possibilités de la chirurgie réparatrice pose le même problème. La chirurgie expose à des risques de complications principalement digestives ou urinaires pour une chance quasi nulle de fertilité naturelle. Aujourd'hui, l'avis est unanime pour considérer le renoncement chirurgical et le recours à l'AMP

comme la démarche la plus appropriée. Il n'en reste pas moins que le niveau de renoncement est infiniment subjectif et qu'il faut éviter de tomber dans le travers du tout AMP.

Après échec de la chirurgie

Les résultats de la chirurgie de l'endométriose sont traités par ailleurs dans cet ouvrage. Nous ne donnerons ici que notre vision de « FIViste ».

Combien de patientes sont réellement enceintes après la chirurgie ? La littérature regorge de publications peu fiables sur des séries sélectionnées affichant des chiffres souvent de 50 à 60 %, voire plus.

Si l'on se réfère aux publications contrôlées comme celles de Marcoux (7) et de Parazzini (8), la réalité est beaucoup moins glorieuse avec des taux de succès compris entre 20 et 30 %. Dans le registre d'Auvergne, seuls 33 % des patientes ont présenté une grossesse évolutive après chirurgie. Parmi celles restantes, plus de 80 % ont eu recours à l'AMP qui a permis d'obtenir autant de grossesses que la chirurgie. Les résultats de Coccia vont dans le même sens (9).

Cependant, ce rôle majeur de l'AMP n'est pas admis par tous. Somigliana (10) note 44 % de grossesses après chirurgie mais seulement la moitié des patientes en échec ont eu recours à la FIV. Ceci souligne bien un des aspects de cette question, qui est que la place relative de l'AMP ne dépend pas que de facteurs médicaux mais aussi de facteurs économiques dont le principal est la prise en charge des techniques d'AMP par le système de santé.

Les facteurs d'échecs de la chirurgie sont plus ou moins bien connus même si les publications ne sont pas toujours concordantes. L'association à un autre facteur d'infertilité (ovulatoire ou masculine), la présence d'adhérences, une atteinte tubaire, un âge élevé, une durée d'infertilité de plus de cinq ans sont autant d'éléments qui concourent à des taux de succès faibles et souvent inférieurs à 20 %.

Chirurgies de deuxième intention

L'option de deuxième chirurgie a été peu étudiée. À notre connaissance, il n'existe que deux études très modestes. Pagidas (11) a comparé trois fécondations *in vitro* (FIV) avec une réintervention et sa conclusion est très en faveur de l'AMP, malgré un taux de succès de 22 % lors des deuxièmes interventions. Fedele (12), quant à lui, considère comme très intéressante l'option de réintervention en cas d'endométriose. Cependant les résultats de l'AMP sont mélangés avec ceux de la chirurgie et en pratique la chirurgie ne procure que 12 % de gros-

sesse, donc beaucoup moins qu'une seule tentative de FIV.

L'avis global des spécialistes est d'éviter les secondes chirurgies avec pour seule motivation la stérilité. Cette deuxième chirurgie paraît licite dans le cas très particulier des stérilités secondaires après conception obtenue grâce à la chirurgie de l'endométriose.

Moment de l'AMP

Finalement le recours à l'AMP se situe dans des contextes assez différents.

- Parce que l'endométriose est un phénomène surajouté dans un contexte plus général d'infertilité. Dans ce contexte, la chronologie de prise en charge ne se discute pas, ni la technique (FIV ou ICSI).
- Parce qu'il s'agit d'une endométriose très sévère ne relevant pas de la chirurgie dans les conditions que nous avons vues plus haut. Dans ces cas-là, assimilables à de la stérilité mécanique, le recours à la FIV s'impose et la seule discussion est celle d'un traitement médical préalable. Nous reviendrons plus loin sur ce point.
- Soit finalement après un traitement chirurgical correct, l'absence de grossesse oblige à proposer une deuxième ligne de traitement qui logiquement ne peut être que l'AMP. Dans ce cas-là, deux questions se posent. Quel type d'AMP et après quelle durée d'échec ? Toutes les études sur la chirurgie montrent que 60 à 80 % des grossesses espérées sont obtenues dans les 6 à 12 mois. Aussi, il paraît rationnel de proposer un délai de 9 mois modulé en fonction de l'âge. Le choix de la technique est plus controversé avec en particulier le débat entre le recours aux inséminations intra-utérines avec stimulation ovarienne (IIU) et le passage direct en FIV.

IIU et endométriose

Les IIU ont connu un cursus sinueux. Ce fut d'abord la seule technique d'AMP. L'avènement de la FIV les a rejetées en arrière-plan dans les années 1990. Ses vertus de simplicité et leurs bas coûts ont contribué à leur retour sur le devant de la scène depuis 2000.

Logique des inséminations

Le recours aux IIU, en cas d'endométriose, s'inscrit dans une logique physiopathologique. Si la relation causale, infertilité et endométriose, reste impar-

faitement connue, certaines pistes semblent plus probables.

L'endométriose s'accompagne de troubles de la maturation ovocytaire dans la fin de la phase folliculaire du fait de perturbations dans les sécrétions de gonadotrophines et en conséquence la stimulation de l'ovulation par gonadotrophines apparaît comme la thérapeutique de bon sens (13).

Par ailleurs, l'endométriose entraîne un effet anti-spermatozoïdes qui se traduit par leur immobilisation rapide et par une accentuation de leur phagocytose par les macrophages dans les trompes et, en conséquence, l'IIU qui apporte une quantité importante de spermatozoïdes dans les trompes est logique (14, 15).

La plupart des auteurs s'accordent pour des protocoles basés essentiellement sur les gonadotrophines (FSH/HMG) avec déclenchement de l'ovulation par HCG et insémination entre 34 et 36 heures plus tard avec du sperme préparé comme pour une fécondation *in vitro*.

Résultats des inséminations

Les résultats des IIU n'ont pas fait l'objet d'innombrables publications comme la FIV. Les données extraites des grands registres nationaux (Agence de la biomédecine) ou internationaux (Consortium européen) donnent des résultats très en retrait des séries publiées. Malheureusement, ils ne ventilent pas les résultats en fonction de l'indication.

De ce fait, l'interprétation des résultats est assez incertaine et les avis sont fort divergents. Ainsi, Dmowski (16), qui obtient que 11 % de grossesse en IIU contre 47 % en FIV, juge les IIU sans intérêt. Cependant, il note qu'après les échecs des IIU les résultats de la FIV ne sont pas altérés par rapport aux cas traités directement en FIV (44 % contre 47 %). Lodhi (17), qui a comparé IIU et GIFT en fonction du stade de l'endométriose, arrive à une conclusion plus nuancée puisque les résultats sont similaires pour les stades 1 et 2 (GIFT 38,1 %, intra-utérine insemination ou IUI 25,5 %), alors qu'il existe une différence significative pour les stades plus avancés (GIFT 40,9 %, IUI 12,5 %). Hughes (18) dans sa méta-analyse souligne que les IIU donnent des résultats moindres en cas d'endométriose (OR : 0,45 (95 % CI, 0,27, 0,76), mais juge que celle-ci reste une indication tout à fait acceptable compte tenu de la simplicité et du coût. Werbrouck (19) est beaucoup plus favorable aux IIU dans cette indication. Contrairement à Hughes, il ne retrouve pas de différence d'avec les stérilités inexplicables avec respectivement 21 % de grossesse en cas d'endométriose légère, 18,9 % en cas d'endométriose modérée et 20,5 % dans les stérilités inexplicables. Pour notre part, dans des séries rétrospectives,

nous obtenons 17,6 % de grossesses parmi 386 patientes ayant une endométriose et 18,0 % chez 410 patientes avec stérilité inexplicée. Ces chiffres traduisent qu'au-dessus d'un taux de grossesse supérieur à 15 %, les IIU apparaissent comme une technique alternative particulièrement intéressante car peu stressante, peu coûteuse et donc facilement répétable et conduisant couramment à des taux cumulatifs réels de l'ordre de 40 % d'accouchement après trois ou quatre tentatives. Ces chiffres se comparent donc très favorablement à ceux de la FIV.

Indications

Il n'existe pas de preuves concernant la place des IIU dans ce contexte si l'on s'en réfère à la « based on evidence medicine ». Cependant, lors des réunions préparatoires aux Recommandations pour la pratique clinique du CNGOF, un consensus professionnel s'était dégagé pour leur proposer dans un délai de six à neuf mois après échec de la chirurgie, en l'absence d'autres causes d'infertilité sauf ovulatoire, en l'absence d'adhérences importantes, chez les femmes de moins de 38 ans et en l'absence de signes cliniques ou échographiques évocateurs d'une récurrence. Dans tous les autres cas d'échecs, le recours direct à la FIV était prôné (20).

FIV et endométriose

Sous le vocable FIV nous entendrons fécondation *in vitro* sans ou avec micro-injection (ICSI) car il n'existe pas de différence fondamentale entre ces deux méthodes en termes de caractéristique biologique ou clinique en cas d'endométriose.

Logique de la FIV

La logique de l'utilisation de la FIV dans les cas d'endométriose reprend bien sûr les deux points que nous avons développés précédemment dans le chapitre sur les IIU. Mais elle est aussi basée sur deux autres concepts :

- celui d'un meilleur développement embryonnaire en soustrayant les embryons à un environnement biologique défavorable ;
- et celui d'éviter les troubles du transit tubaire qui pourraient exister en cas d'endométriose.

Force est de constater que ces deux éléments sont loin d'être démontrés dans les cas des endométrioses légères et modérées. On peut même en contester totalement leur pertinence quand on constate les bons résultats qui étaient et sont encore

obtenus en GIFT (17). Finalement cette technique n'a été abandonnée que du fait de sa lourdeur pour les patientes, mais comme elle ne contournait pas ces deux problèmes, on peut sincèrement avoir des doutes sur les hypothèses émises.

Aussi finalement, la logique la plus pertinente du recours à la FIV est l'obtention d'un taux de grossesse satisfaisant comme nous le verrons plus loin.

Résultats biologiques en cas de FIV

Dès lors que l'on parle de FIV (ou d'ICSI), il est habituel de s'intéresser aux différentes étapes que sont la stimulation, le nombre d'ovocytes recueillis, le taux de fécondation, le taux d'implantation. Pour aussi intéressantes que soient ces variables, le taux de grossesses et surtout le taux d'accouchements restent les critères principaux à prendre en compte.

Néanmoins, ces étapes intermédiaires donnent-elles un éclairage sur des explications possibles à la physiopathologie de l'endométriose ? La difficulté de ce chapitre tient surtout à trois aspects.

- D'une part, les séries rapportées portent souvent sur de petits groupes ou des groupes sélectionnés selon le type d'endométriose.
- D'autre part, il existe de très nombreuses séries aux résultats souvent contradictoires. Soulignons d'emblée qu'il existe à ce sujet une seule méta-analyse, celle de Barnhart à laquelle nous ne nous référons pas, tant elle est de qualité médiocre voire contenant des erreurs.
- Enfin, se pose comme toujours la question du choix du groupe de référence qui logiquement devrait varier selon l'étape.

Quantité de FSH pour la stimulation

C'est un point de consensus quasi unanime : une quantité plus importante de FSH est nécessaire pour stimuler les patientes et la durée de la stimulation est en règle générale plus longue d'un ou deux jours.

Nombre d'ovocytes recueillis

Les avis sont plus partagés. Quelques publications ne trouvent pas de différence, aucune ne trouve un recueil meilleur en cas d'endométriose par comparaison aux patientes sans pathologie et prise en charge en ICSI pour infertilité masculine. Finalement, la plupart des séries concluent à un recueil moindre par comparaison aux patientes précédentes mais également par comparaison au cas de stérilité tubaire. Globalement, le nombre d'ovocytes recueillis est inférieur d'un par rapport aux stérilités tubaires et de deux par rapport au cas d'infertilité masculine.

Taux de fécondation

La valeur de cet indice peut être discutée, mais dès lors que l'on se place dans des cas où le sperme est normal, il est couramment admis qu'il est représentatif de la qualité ovocytaire. La situation est globalement la même que dans le paragraphe précédent. Si l'on prend comme groupe de référence les stérilités tubaires, certaines publications ne trouvent pas de différence, mais la plupart rapportent une baisse légère de 3 à 7 % dont l'impact dans le résultat final est très limité.

Nombre d'embryons obtenus

La conjonction des deux éléments précédents fait que, dans l'immense majorité des séries, le nombre moyen d'embryons obtenus est plus faible en cas d'endométriose qu'il ne l'est dans les stérilités tubaires, qui sont prises alors comme référence. Cette différence est en moyenne d'un embryon.

Nombre d'embryons transférés

Cependant la baisse est suffisamment faible pour ne pas avoir de répercussion sur le nombre d'embryons transférés, surtout à l'époque actuelle où l'évolution se fait de plus en plus vers le transfert d'un seul embryon ou éventuellement de deux embryons dans les bons cas.

Qualité embryonnaire

La qualité embryonnaire est toujours un sujet délicat tant les moyens d'appréciation sont discutés. Cependant, il existe des arguments forts en faveur d'une diminution moyenne de la qualité embryonnaire. Durruty avait montré qu'en coculture le taux de blastocystes était plus faible en cas d'endométriose par comparaison avec toute autre indication. Simon (21) a montré que les embryons à j3 issus de patientes avec endométriose ont en moyenne moins de blastomères que dans les autres indications. Pellicer (22) a montré que les embryons obtenus en don d'ovocytes procurent moins de grossesse s'ils proviennent d'une donneuse ayant de l'endométriose. La plupart des publications vont dans le même sens.

La qualité embryonnaire, si le sperme est normal, est considérée comme un témoin de la qualité ovocytaire. On peut donc conclure que la qualité ovocytaire est plus faible en cas d'endométriose et que ceci se traduit par un taux de fécondation légèrement abaissé et par une qualité embryonnaire également altérée. Néanmoins ces différences sont faibles.

À notre connaissance, il n'existe pas de publication qui se soit intéressée à la qualité des embryons transférés qui, en toute logique, ne devrait pas être sensiblement altérée compte tenu de la sélection qui est faite.

Taux d'implantation

Si quelques publications retrouvent des taux de grossesse débutante par transfert plus bas que dans les autres indications, la majorité des auteurs s'accordent pour ne pas noter de différence sensible. Il en est de même lorsque le taux d'implantation est analysé en enfant (ou sac gestationnel) par embryon transféré.

Taux de fausses couches

En dehors de Yanupolski (23) qui retrouve une augmentation du taux de fausses couches en cas d'endométriose, tous les autres auteurs s'accordent pour l'absence d'incidence de l'endométriose à ce niveau.

Notre expérience

Notre expérience rejoint celle de la littérature. Le tableau I rapporte cette expérience qui prend en compte les premières tentatives pour les patientes de moins de 35 ans en comparant les indications pour endométriose avec les indications tubaires, les indications masculines, les stérilités idiopathiques et les autres cas (stérilités ovulatoire ou multifactorielle). L'étude porte sur une période continue de sept ans.

Elle montre essentiellement une diminution du recueil ovocytaire de l'ordre de 1,5 ovocytes par ponction, un nombre d'embryon également un peu diminué. Le taux de transfert est un peu plus bas que dans les stérilités tubaires ou masculines pures et le nombre de cycle avec congélation parmi les cycles avec obtention d'embryons est un peu abaissé. Au final, le taux d'accouchement

par stimulation est à peine inférieur aux autres indications sauf dans les indications masculines pures où il est sensiblement plus élevé. Enfin, il est intéressant de voir l'extraordinaire similitude du taux implantatoire (enfant par embryon transféré) selon l'indication hormis pour les stérilités masculines pures où le résultat est très sensiblement supérieur.

Résultats globaux de la FIV

Généralement, les études comparatives prospectives randomisées sont considérées comme le *ne plus ultra* de l'analyse scientifique médicale. Et il est assez facile de trouver des publications comparant des séries de FIV avec endométriose et sans endométriose. Un nombre important conclut à un résultat plus faible en termes d'accouchements, alors que quelques-unes concluent à une équivalence. Outre que la plupart de ces séries sont rétrospectives, il est bien difficile d'envisager des séries prospectives randomisées. En revanche, l'AMP présente deux caractéristiques intéressantes :

- le résultat est rapidement connu, à l'inverse de la chirurgie, et le taux de perte de vue est négligeable ;
- il existe des registres nationaux énormes quasi prospectifs comme le SART aux États-Unis, ou comme le fut longtemps FIVNAT en France (fig. 1).

Dans ces deux registres, il apparaît que l'AMP pour endométriose procure de façon générale des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus dans les autres indications. Ceci est à notre sens une

Tableau I – Résultats comparatifs de la FIV/ICSI selon l'indication pour les premières tentatives chez les femmes de moins de 37 ans en première indication (données du CHU de Clermont-Ferrand 2002-2007).

	Endométriose	Tubaire	Masculine	Idiopathique	Divers	Total
Nombre de stimulations	320	320	853	117	312	1922
Déprogrammation	3,8 %	3,8 %	2,7 %	0,9 %	7,1 %	3,6 %
Ponction blanche	3,1 %	4,4 %	2,2 %	0 %	5,8 %	3,2 %
Ovocytes	6,6 ± 4,7	8,5 ± 5,7	7,9 ± 4,8	8,6 ± 5,3	12,00 ± 5,9	8,1 ± 5,3
Embryons	4,05	4,93	4,82	4,76	3,96	4,57
Taux de fécondation	58,7 %	56,3 %	59,9 %	53,9 %	30,7 %	52,1 %
Taux de transfert	87,9 %	93,2 %	92,1 %	87,1 %	85,3 %	90,2 %
Embryons transférés	1,57	1,57	1,53	1,49	1,54	1,54
Taux de congélation	41,2 %	43,1 %	56,0 %	46,5 %	42,7 %	48,9 %
% embryons congelés	33,4 %	32,8 %	44,2 %	34,8 %	34,3 %	38,7 %
Grossesse/stimulation	25,63 %	28,13 %	33,88 %	29,91 %	25,32 %	29,92 %
Grossesse/transfert	31,3%	32,8 %	38,7 %	34,7 %	34,1 %	35,6 %
Accouchement	69	79	243	25	66	482
Accouchement/stimulation	21,6 %	24,7 %	28,5%	21,4 %	21,2 %	25,1 %
Enfants	82	87	277	30	71	547
Enfant/embryon transféré	20,0 %	20,2 %	24,2 %	20,0 %	19,9 %	21,9 %

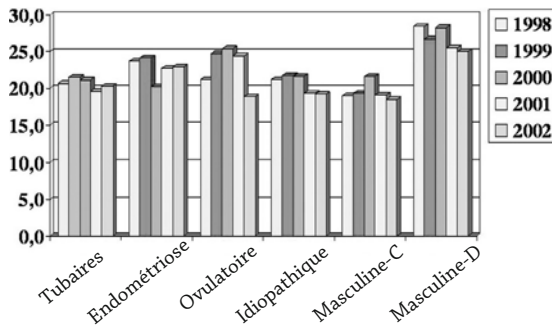


Fig. 1 – Taux d'accouchement en FIV en fonction de l'indication (avec l'autorisation de FIVNAT) (masculine-C : avec sperme du conjoint - masculine-D : avec sperme de donneur).

preuve scientifique bien plus fiable qu'une petite série comparative, fût-elle prospective portant sur une centaine de cas.

Par ailleurs, certaines études se sont intéressées au taux cumulatifs d'accouchement après plusieurs cycles. Elles ne notent pas de différence entre endométriose et autres indications et tout au plus un taux cumulatif un peu plus bas en cas d'endométriose stade 3 ou 4, par rapport aux stades 1 et 2 (24, 25).

Spécificités en cas d'endométriose

Par-delà ces considérations plutôt rassurantes sur l'utilisation de la FIV en cas d'endométriose, se pose la question de savoir s'il y a certaines spécificités dans la prise en charge. Quatre sujets nous paraissent devoir être abordés.

Évaluation de la réserve ovarienne

Elle est considérée aujourd'hui comme un outil primordial pour adapter au mieux le niveau des traitements par gonadotrophine. Elle est basée sur trois critères principaux qui sont le taux de base de FSH au 3^e jour du cycle, le taux d'AMH (hormone antimüllérienne) et le comptage des follicules en début de cycle. Nous n'entrerons pas dans les discussions sur les valeurs respectives et combinées de ces trois tests. En revanche, il semble qu'ils soient particulièrement peu fiables en cas d'endométriose (26). L'endométriose pouvant posséder une activité aromatisation, le taux de FSH peut être abaissé par une sécrétion parasite d'œstradiol. Le comptage des follicules peut être « parasité » par des microkystes d'endométriose présents dans l'ovaire. D'ailleurs toutes les séries confirment la nécessité de dose de FSH/HMG plus élevée pour les stimulations.

Influence du stade sur les résultats

L'influence du stade sur le résultat de la FIV est un sujet largement débattu. Les publications vont

dans des directions fort différentes bien que la plupart ne trouvent pas de différence importante (27). Nous pensons que ceci a fort peu d'intérêt pour les raisons suivantes :

- le stade d'une endométriose est donné par la classification AFS qui cumule des points en fonction des lésions et de ses conséquences. Le même stade peut être obtenu pour des lésions très différentes puisque par exemple une obturation complète du cul-de-sac de Douglas procure autant de points que deux volumineux endométriomes. D'ailleurs, beaucoup d'auteurs ont simplifié la présentation en prenant d'un côté les endométrioses minimales et légères (*a priori* sans volumineux endométriomes ni adhérences importantes) et les endométrioses modérées ou sévères dans lesquelles l'une et/ou l'autre de ces lésions existent ;
- en second lieu, cette classification est faite en préopératoire et donc à distance d'une FIV. Ainsi pourquoi considérer comme un stade 3 une patiente opérée pour un stade 3 avec endométriome et qui ne présente aucun signe de récurrence à un an, alors qu'une autre patiente opérée au stade 2 peut se retrouver avec une récurrence majeure (endométriomes bilatéraux) à distance de la chirurgie. Sur ces exemples, on voit bien que l'évolutivité imprévisible de l'endométriose ne permet pas une classification fiable quand elle est appliquée à distance de la chirurgie ;
- enfin, le stade de départ n'a pas une influence particulière sur les modalités de prise en charge.

Traitement chirurgical et FIV

Une des questions qui reste posée est celle de l'intérêt de traiter chirurgicalement l'endométriose avant la prise en charge en FIV. Les avis sur la question sont divergents, mais rarement très argumentés, ce qui ne permet pas de donner un avis étayé (5, 28). Notre avis est le suivant :

- s'il n'existe pas une cause permanente de recours à la FIV, il est toujours intéressant de commencer par la chirurgie qui peut à elle seule procurer un nombre de grossesses non négligeable ;
- si le recours à l'AMP est indispensable de toute façon, l'option de l'abstention chirurgicale est logique au profit d'un traitement médical (cf. infra) ;
- en cas de récurrence, ou en cas d'abstention initiale, le recours à la chirurgie doit être envisagé dans les cas de mauvaises réponses.

Quant à la question du délai entre chirurgie et FIV, des arguments assez faibles plaident pour une réduction de ce délai (29).

Traitement médical avant FIV

La méta-analyse de Yap (30) montre l'intérêt de traiter médicalement l'endométriose juste

avant une tentative en utilisant les protocoles dits « hyperlongs » qui consistent en l'administration d'agonistes du GnRH pendant trois mois et de profiter de cette désensibilisation pour réaliser la FIV. Si les données sont éloquentes, il faut quand même considérer que, parmi les séries prises en compte, une seule, souvent contestée, apporte l'essentiel des cas. D'ailleurs, Ma (31) a publié une série laissant penser qu'un traitement de seulement deux mois est plus efficace qu'un traitement plus étendu. Aussi, on peut se demander s'il est aussi efficace d'appliquer cette stratégie dans tous les cas et en particulier s'il y a eu préalablement un traitement chirurgical complet pour une endométriose minime ou légère et en cas de cycles itératifs de FIV. Lors des réunions pour les RPC du CNGOF, un avis d'expert avait été donné, qui n'a pas lieu d'être modifié par des publications récentes. Les préconisations d'usage des protocoles hyperlongs étaient les suivantes :

- en cas d'absence de chirurgie du fait d'une indication permanente d'AMP ;
- en cas d'absence de chirurgie du fait d'une endométriose « inopérable » sans risque majeur ;
- en cas de chirurgie incomplète ;
- en cas de récurrence après chirurgie complète.

Dans le même ordre des choses, en cas de douleurs et/ou dans les cas où les chances de grossesses spontanées sont faibles ou inexistantes, la mise sous traitement bloquant les menstruations entre les tentatives est légitime. Il faut préférer les progestatifs ou les œstroprogestatifs pour réduire les effets secondaires (20).

Type de stimulation

Peu de publications se sont intéressées aux résultats de l'AMP en fonction du type de stimulation, mais il existe un consensus assez général pour l'utilisation des protocoles longs (voire ultralongs) avec agonistes du GnRH. Ce sont ces protocoles qui permettent d'obtenir le plus d'ovocytes de façon générale. Il est donc logique de les préférer chez des patientes dont le recrutement ovocytaire est en général abaissé. De plus, le temps préalable de blocage ovarien permet un hypothétique traitement médical de l'endométriose. Pabuccu a comparé protocoles agonistes et antagonistes. Il en ressort une supériorité non significative des protocoles longs. Cependant, la série était beaucoup trop courte pour permettre de démontrer une différence (32).

Quelques essais de stimulation combinant anti-aromatases et protocoles longs ont été rapportés (4, 33) qui paraissaient plus efficaces. Les doutes sur un possible risque tératogène et l'absence d'AMM rendent leur usage confidentiel.

Cas particuliers

Endométrioses

C'est un sujet qui inquiète bon nombre de gynécologues, alors qu'il s'agit d'un des contextes finalement les mieux connus. Ce sujet a suscité un nombre tout à fait incroyable de publications dans les cinq dernières années. Les principales questions qui se posent sont souvent intriquées et nous allons essayer d'y répondre au vu des données de la littérature.

Découverte d'un endométriose lors d'une stimulation pour FIV

Est-ce que la présence d'un endométriose lors d'une stimulation de FIV en détériore les résultats ? Cette question a suscité de très nombreuses publications souvent difficilement exploitables. En effet, la difficulté vient de la définition du groupe contrôle qui est variablement des cas d'endométrioses sans endométriose, des stérilités sans endométriose, des cas d'endométriose opéré non récidivé. Les avis sont un peu divergents mais un consensus semble se dégager pour les conclusions suivantes : la présence d'endométriose oblige à des doses de gonadotrophines plus élevées, à une stimulation plus longue, entraîne un recueil ovocytaire moindre mais n'a pas d'impact sur le résultat en termes de grossesse (23, 34-36), sauf pour Somigliana sur une série rétrospective d'endométriose bilatéraux (37).

Par ailleurs, Khamsi a montré que la contamination des ovocytes lors de la ponction par du liquide endométriosique n'affecte pas leur capacité à donner un embryon ni la qualité de cet embryon.

Faut-il opérer ou réopérer les endométrioses avant FIV ?

Minguez (38) dans une étude rétrospective ne retrouvait que quelques différences marginales entre les cas opérés et les cas non opérés. En particulier, il ne trouvait pas de différence dans le nombre d'ovocytes recueillis ni dans le taux de grossesse. Seule la dose de traitement était supérieure dans ce groupe opéré. Il conseille donc de ne pas opérer.

Demirel (39) a randomisé des patientes ayant un endométriose pour être opérée ou non avant ICSI (49 opérées contre 50 non opérées). Après intervention, la stimulation était plus longue, la dose de FSH administrée plus forte, le nombre d'ovocytes recueillis un peu plus faible (7,8 *versus* 8,6 ; $p = 0,032$), mais elle ne trouve pas de différence en taux de fécondation (86 *versus* 88 %) en taux

implantatoire (16,5 *versus* 18,5 %) ni en taux de grossesse (34 *versus* 38 %). Cette étude plaide en faveur de la non-intervention.

Faut-il drainer sous échographie les endométrioses avant FIV ?

Plusieurs publications japonaises sont en faveur de cette méthode en y ajoutant une sclérothérapie par éthanolisation. Schick a proposé le drainage avec sclérothérapie par tétracycline avec une amélioration des résultats trop spectaculaires pour paraître crédible.

L'étude la plus documentée est celle de Pabuccu (40). Il a randomisé des cas d'endométriose avant FIV, soit en abstention, soit en drainage échographique, et il a pris en outre deux groupes contrôles : un de patientes déjà opérées d'endométriose mais qui n'avait pas récidivé et un groupe de stérilité tubaire. Dans le groupe où une aspiration a été pratiquée, le nombre d'ovocytes a été un peu plus élevé par rapport au groupe où l'aspiration n'a pas été pratiquée et à celui des femmes déjà opérées d'endométriose. Mais dans tous les cas d'endométriose, le nombre de follicules est diminué. Au final, le taux de grossesse a été similaire dans tous les cas. L'auteur en conclut que l'aspiration des endométrioses n'est pas nécessaire avant FIV au moins pour les endométrioses de moins de 6 cm. D'autres études ont été réalisées qui sont plus favorables au drainage (41), mais pour la plupart, elles prennent la patiente pour son propre témoin, ce qui est fort discutable. Il n'existe pas de données sur le drainage dans les endométrioses au-delà de 6 cm.

La chirurgie des endométrioses et son type ont-ils une influence sur le déroulement de la FIV ?

À notre connaissance, en dehors de la série de Demirel (39), il n'existe pas d'autre série qui a comparé FIV sans traitement de l'endométriose et FIV après chirurgie de l'endométriose. Il n'existe pas non plus de série ayant comparé les résultats de la FIV après traitement par kystectomie (KIP) (école de Clermont) et après destruction de la paroi interne (technique de Bruxelles). Cependant, la revue de la littérature retrouve un nombre important d'articles qui rapportent de très faibles réponses ovariennes après chirurgie et, en particulier, après kystectomie (42), ce qui est en désaccord avec la première publication de l'équipe clermontoise (43) et la série comparative de Donnez (44). Il nous semble que cette discordance est possiblement due à des différences de techniques opératoires et doit inciter à la plus grande rigueur dans ce type de chirurgie après laquelle plusieurs cas de ménopause précoce ont été rapportés. Pour Bussaca (42), ce risque est de l'ordre de 2,4 % (IC95

0,5 à 6,8 %) après KIP bilatérale. Entre KIP et destruction, rappelons que les études de Beretta (45) et de Saleh (46) concluent à un risque moindre de récurrence et à des taux de grossesse plus élevés après KIP.

La revue de ces études portant sur chirurgie, endométriose et FIV laisse penser que la diminution de la réserve ou de la réponse ovarienne est le fait de la survenue d'un endométriose mais peut aussi être aggravée par une technique chirurgicale incertaine.

Risques d'abcès de l'ovaire

Le risque d'abcès de l'ovaire après FIV n'existe pratiquement que dans les cas d'endométrioses (47). L'incidence de cette complication reste faible mais la complication est majeure et nécessite souvent de recourir à une ovariectomie car la plupart des drainages se soldent par une récurrence.

Synthèse

Finalement, le problème des endométrioses se pose de plusieurs façons :

- si un endométriose est découvert lors d'une stimulation au cours d'une AMP dont l'indication n'est pas formelle (stérilité inexpliquée par exemple), il est logique de poursuivre, mais en cas d'échec la chirurgie s'impose car elle peut offrir une chance de grossesse naturelle ;
- dans tous les autres cas, il convient de continuer et le recours de la chirurgie en cas d'échec ne se conçoit que si l'endométriose occasionne des douleurs, du fait de sa taille ou éventuellement en cas de réponse ovarienne catastrophique, tout en sachant que la chirurgie peut encore altérer plus la réponse ovarienne.

Nodules recto-vaginaux

Les nodules recto-vaginaux (NRV) ne présentent pas de caractéristique particulière en cas de FIV. Cependant il existe un doute sur un possible effet délétère de leur présence sur les chances de grossesse, ce qui justifierait leur ablation dans tous les cas de prise en charge en FIV. Il est bien évident que la découverte d'un NRV dans un bilan de stérilité ne peut correspondre à elle seule à une indication d'AMP, compte tenu des résultats assez satisfaisants de cette chirurgie pourtant difficile.

Don d'ovocytes et endométriose

L'absence de réponse ou une très mauvaise réponse à la stimulation ovarienne en cas d'endométriose

peuvent être considérées comme des indications au don d'ovocytes. Les travaux de Pellicer (22) ont montré qu'il n'existe pas de différence de résultats dans cette indication par comparaison aux autres cas d'insuffisance ovarienne.

Grossesses AMP en cas d'endométriose

Contrairement à une idée très répandue, l'endométriose n'est pas associée à une augmentation ni des fausses couches ni des grossesses extra-utérines. Une seule et courte publication a retrouvée une corrélation (23) mais elle est contredite par les grandes séries de FIVNAT ou du SART.

La présence d'endométriome ne pose en général pas de problème spécifique pendant la grossesse et en particulier le risque de torsion est très faible car ils sont volontiers adhérents. La rupture d'endométriome en cours de grossesse semble tout à fait exceptionnelle d'autant que les endométriomes tendent à régresser au cours de la grossesse.

Une seule complication spécifique de la grossesse existe en cas de nodules profonds en particulier rectaux ou sigmoïdiens. La décidualisation de l'endomètre ectopique peut entraîner soit des hémopéritoïnes soit des perforations spontanées qui requièrent une chirurgie abdominale difficile chez une femme enceinte.

Impact de la FIV sur l'évolution de l'endométriose

Beaucoup craignent que l'hyperœstrogénie induite par la stimulation de l'ovulation ne soit un facteur aggravant de l'endométriose.

L'effet bénéfique d'une grossesse sur l'évolution de l'endométriose est connue depuis longtemps même si les chiffres de Bussacca (48) montrent une différence finalement assez faible. Le taux de récurrences à quatre ans parmi les patientes qui ont conçu était de 16,7 %, 14,8 %, 19,1 % et 17,1 % selon que l'endométriose était ovarienne, péritonéale, profonde ou ovarienne + péritonéal. Chez les femmes non enceintes ces chiffres étaient respectivement de 28,3 %, 21,1 %, 34,1 % et 26,3 % ($p < 0,01$).

La question se pose donc chez les patientes en échec de FIV avec en particulier la crainte de faire « flamber les lésions » et de déboucher sur des complications. Outre que ces évolutions aiguës se rencontrent à n'importe quel moment de la vie d'une endométriose, les constatations

de D'Hooghe (49) ne sont pas en faveur de cette hypothèse. Il note que, 21 mois après le début des stimulations, le taux global de récurrence est de 7 % chez les patientes traitées uniquement par FIV contre 43 % chez celle ayant IIU puis FIV et 70 % chez celle qui n'ont eu que des IIU, ce qui laisserait penser à un effet plutôt protecteur des fortes stimulations. Malheureusement, dans cet article il n'est pas rapporté de groupe contrôle sans stimulation. Cependant, un taux de 7 % est particulièrement bas et sensiblement inférieur à celui que rapporte la plupart des séries et qui se situe plutôt à 30 % (48). Dans une étude ancienne, Sachdev (50) a rapporté des coéloscopies pour pratiquer des GIFT ou des ZIFT chez des patientes préalablement opérées d'endométriose puis soumises à des stimulations de l'ovulation. Il retrouve une augmentation du stade AFS chez 33 %, une stagnation chez 42 % et une régression dans 25 %. Ces deux séries et l'expérience générale laissent penser que ce risque de poussée de l'endométriose est minime s'il existe.

Temps de l'AMP et temps de la chirurgie

Il n'existe pas une opposition entre AMP et chirurgie mais bien une complémentarité. Dans le registre d'Auvergne de l'endométriose, il apparaît que 30 % des patientes accouchent après chirurgie, que 60 % recourent à l'AMP qui permettra à la moitié d'entre elles de concevoir. De telle sorte que 60 % des patientes finissent par accoucher et sensiblement à part égale après chirurgie et après AMP.

La figure 2 rapporte une stratégie logique qui associe la chirurgie et à l'AMP.

Conclusion

Les techniques d'AMP (IIU, FIV, ICSI) ont une place importante dans le traitement de la stérilité par endométriose. Elles sont plus généralement une deuxième, voire une troisième ligne de traitement. L'endométriose représente une bonne indication d'AMP avec quelques spécificités biologiques tenant à une réserve ovarienne souvent altérée et une qualité ovocytaire moindre. Mais au final les taux de succès sont similaires à ceux des autres indications. Les types d'endométriose ne présentent pas en soit de spécificité et ne doivent pas avoir d'impact sur la stratégie globale qui intègre la chirurgie et les différents types d'AMP.

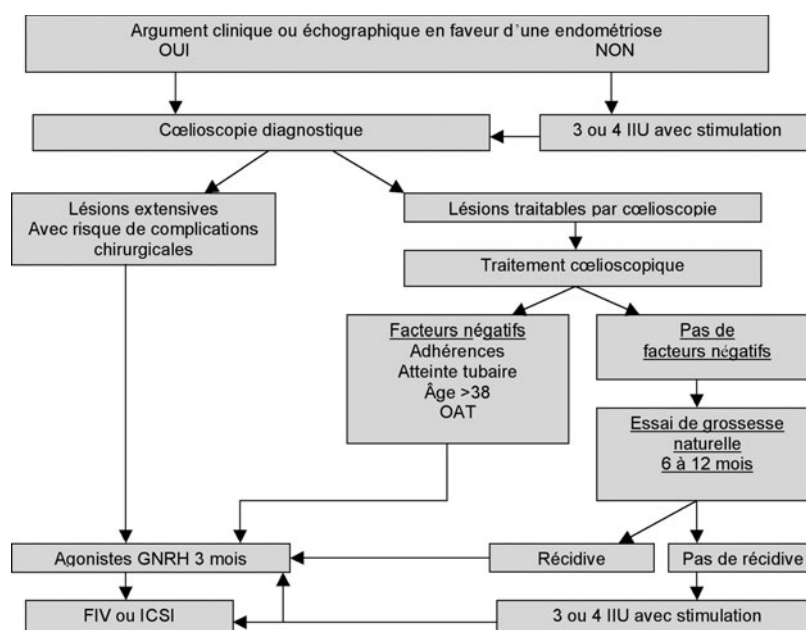


Fig. 2 – Diagramme de synthèse des recommandations cliniques concernant l'infertilité par endométriose.

Références

- Burns WN, Schenken RS (1999) Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol* 42: 586-610
- Mahutte NG, Arici A (2002) New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J Reprod Immunol* 55: 73-83
- Hock DL, Sharafi K, Dagostino L *et al.* (2001) Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 46: 7-10
- Garcia-Velasco JA, Mahutte NG, Corona J *et al.* (2004) Removal of endometriomas before in vitro fertilization does not improve fertility outcomes: a matched, case-control study. *Fertil Steril* 81: 1194-7
- Shahine LK, Burney RO, Behr B *et al.* (2009) Embryo quality before and after surgical treatment of endometriosis in infertile patients. *J Assist Reprod Genet* 26: 69-73
- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI *et al.* (2003) The outcome of in vitro fertilization in advanced endometriosis with previous surgery: a case-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 188: 371-5
- Marcoux S, Maheux R, Berube S (1997) Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med* 337: 217-22
- Parazzini F (1999) Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod* 14: 1332-4
- Coccia ME, Rizzello F, Cammelli F *et al.* (2008) Endometriosis and infertility Surgery and ART: an integrated approach for successful management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138: 54-9
- Somigliana E, Daguati R, Vercellini P *et al.* (2009) The use and effectiveness of in vitro fertilization in women with endometriosis: the surgeon's perspective. *Fertil Steril* 91: 1775-9
- Pagidas K, Falcone T, Hemmings R, Miron P (1996) Comparison of reoperation for moderate (stage III) and severe (stage IV) endometriosis-related infertility with in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 65: 791-5
- Fedele L, Bianchi S, Zanconato G *et al.* (2006) Laparoscopic excision of recurrent endometriomas: long-term outcome and comparison with primary surgery. *Fertil Steril* 85: 694-9
- Cahill DJ, Hull MG (2000) Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update* 6: 56-66
- Sharma RK, Wang Y, Falcone T *et al.* (1999) Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on sperm motion characteristics and acrosome reaction. *Int J Fertil Womens Med* 44: 31-37.
- Toya M, Saito H, Ohta N *et al.* (2000) Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 73: 344-350
- Dmowski WP, Pry M, Ding J, Rana N (2002) Cycle-specific and cumulative fecundity in patients with endometriosis who are undergoing controlled ovarian hyperstimulation-intrauterine insemination or in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 78: 750-6
- Lodhi S, Abdel Fattah A, Abozaid T *et al.* (2004) Gamete intra-fallopian transfer or intrauterine insemination after controlled ovarian hyperstimulation for treatment of infertility due to endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 19: 152-9
- Hughes EG (1997) The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod* 12: 1865-72
- Werbrouck E, Spiessens C, Meuleman C, D'Hooghe T (2006) No difference in cycle pregnancy rate and in cumulative live-birth rate between women with surgically treated minimal to mild endometriosis and women with unexplained infertility after controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril* 86: 566-71
- Pouly JL, Canis M, Velemlir L *et al.* (2007) La stérilité par endométriose. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 36: 151-61
- Simón C, Gutiérrez A, Vidal A *et al.* (1994) Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 9: 725-9
- Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A *et al.* (1995) Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an

- analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod Suppl* 2: 91-97
23. Yanushpolsky EH, Best CL, Jackson KV *et al.* (1998) Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J Assist Reprod Genet* 15: 193-7
 24. Kuivasaari P, Hippeläinen M, Anttila M, Heinonen S (2005) Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates. *Hum Reprod* 20: 3130-5
 25. Witsenbourg Dieben S, Van der Westerlaken L, Verburg H, Naaktgeboren N (2005) Cumulative live birth rates in cohorts of patients treated with in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 84: 99-107
 26. Falconer H, Sundqvist J, Gemzell-Danielsson K *et al.* (2009) IVF outcome in women with endometriosis in relation to tumour necrosis factor and anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online* 18: 582-8
 27. Yazbeck C, Madelenat P, Sifer C *et al.* (2006) Effect of laparoscopic cystectomy on ovarian response in IVF-ET cycles. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 808-12
 28. Bianchi PH, Pereira RM, Zanatta A *et al.* (2009) Extensive Excision of Deep Infiltrative Endometriosis before In Vitro Fertilization Significantly Improves Pregnancy Rates. *J Minim Invasive Gynecol* 16: 174-80
 29. Bedaiwy MA, Falcone T, Katz E *et al.* (2008) Association between time from endometriosis surgery and outcome of in vitro fertilization cycles. *J Reprod Med* 53: 161-5
 30. Yap C, Furness S, Farquhar C (2004) Pre and post operative medical therapy for endometriosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD003678
 31. Ma C, Qiao J, Liu P, Chen G (2008) Ovarian suppression treatment prior to in-vitro fertilization and embryo transfer in Chinese women with stage III or IV endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 100: 167-70
 32. Pabuccu R, Onalan G, Kaya C (2007) GnRH agonist and antagonist protocols for stage I-II endometriosis and endometrioma in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 88: 832-9
 33. Lossl K, Loft A, Freiesleben NL, Bangsbo S *et al.* (2009) Combined down-regulation by aromatase inhibitor and GnRH-agonist in IVF patients with endometriomas-A pilot study *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144: 48-53
 34. Isaacs JD, Hines RS, Soper VM, Cowan BD (1997) Ovarian endometriomas do not adversely affect pregnancy success following treatment with in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 14: 551-3
 35. Suzuki T, Izumi S, Matsubayashi H *et al.* (2005) Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in vitro fertilization. *Fertil Steril* 83: 908-13
 36. Tinkanen H, Kujansuu E. (2000) In vitro fertilization in patients with ovarian endometriomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79: 119-22
 37. Somigliana E, Arnoldi M, Benaglia L *et al.* (2008) IVF-ICSI outcome in women operated on for bilateral endometriomas. *Hum Reprod* 23: 1526-30
 38. Minguez Y., Rubio C., Bernal A *et al.* (1997) The impact of endometriosis in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection because of male infertility. *Hum Reprod* 12: 2282-5
 39. Demirel A, Guven S, Baykal C, Gurgan T (2006) Effect of endometrioma cystectomy on IVF outcome: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 12: 639-43
 40. Pabuccu R, Onalan G, Goktolga U *et al.* (2004) Aspiration of ovarian endometriomas before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 82: 705-11
 41. Wong BC, Gillman NC, Oehninger S *et al.* (2004) Results of in vitro fertilization in patients with endometriomas: is surgical removal beneficial? *Am J Obstet Gynecol* 191: 597-606
 42. Busacca M, Riparini J, Somigliana E *et al.* (2006) Postsurgical ovarian failure after laparoscopic excision of bilateral endometriomas. *Am J Obstet Gynecol* 195: 421-5
 43. Canis M, Pouly JL, Tamburro S *et al.* (2001) Ovarian response during IVF-embryo transfer cycles after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts of >3 cm in diameter. *Hum Reprod* 16: 2583-6
 44. Wynn C, Donnez J (2003) Laser vaporization of ovarian endometriomas: the impact on the response to gonadotrophin stimulation. *Gynecol Obstet Fertil* 31: 337-42
 45. Beretta P, Franchi M, Ghezzi F *et al.* Randomized clinical trial of two laparoscopic treatments of endometriomas: cystectomy versus drainage and coagulation. (1998) *Fertil Steril* 70: 1176-80
 46. Saleh A, Tulandi T (1999) Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by excision and by fenestration. *Fertil Steril* 72: 322-4
 47. Kubota T, Ishi K, Takeuchi H. (1997) A study of tubo-ovarian and ovarian abscesses, with a focus on cases with endometrioma. *J Obstet Gynaecol Res* 23: 421-6
 48. Busacca M, Chiaffarino F, Candiani M *et al.* (2006) Determinants of long-term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 195: 426-32
 49. D'Hooghe TM, Denys B, Spiessens C *et al.* (2006) Is the endometriosis recurrence rate increased after ovarian hyperstimulation? *Fertil Steril* 86: 283-90
 50. Sachdev R, Bohrer M, Kemmann E (1997) Superovulation therapy does not cause rapid progression of endometriosis. *Fertil Steril* 68 (Suppl 1): S23

T. F. Kruger and D. Rossouw
Franken

The evaluation of semen and its use in ART

Introduction

It is estimated that in 40–50% of infertile couples, the male is infertile, which, in the general population, equals about 5–10% of all married men. However, infertility should not be viewed as solely male- or female-related, but as a question of varying degrees of fertility potential in both partners. Marginal male fertility can often be offset by excellent female fertility and vice versa.

Fertility/subfertility thresholds for sperm morphology using Tygerberg strict criteria, sperm concentration, and sperm motility/progressive motility

In an effort to establish fertility/sub-fertility thresholds for the above-mentioned parameters, we identified four articles in the published literature. It is our opinion that these articles constitute a representative sample of studies published on the predictive value of sperm morphology, sperm concentration, and motility/progressive motility for *in vivo* fertility/sub-fertility. These articles compared the different semen parameters of a fertile and a sub-fertile group. They used either the classification and regression tree (CART) analysis or the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to estimate thresholds for the different semen parameters. The ROC curve was also used to assess the diagnostic accuracy of the different parameters and their ability to classify subjects into fertile and sub-fertile groups.

Using ROC curve analysis, Ombelet *et al.* (1) calculated the following thresholds: proportion normal morphology 10%, proportion normal motility 45%, and normal sperm concentration $34 \times 10^6/\text{mL}$. The sperm morphology was shown to be the best parameter with the highest prediction power (area under curve or AUC 78%). Much lower thresholds were

calculated using the 10th percentile of the fertile population, these thresholds being 5% for normal morphology, 28% for motility, and $14.3 \times 10^6/\text{mL}$ for sperm concentration (1).

Günalp *et al.* (2) also calculated thresholds using ROC curve analysis. The thresholds were normal morphology 10%, normal motility 52%, progressive motility 42%, and sperm concentration $34 \times 10^6/\text{mL}$. The two parameters that performed best were progressive motility (AUC 70.7%) and morphology (AUC 69.7%). Assuming 50% prevalence of sub-fertility in the population, the authors used the positive predictive value as indicator to calculate a lower threshold for each parameter. Values of 5% for proportion with normal morphology, 30% for proportion with normal motility, 14% for proportion with progressive motility, and $9 \times 10^6/\text{mL}$ for sperm concentration were calculated (2).

In the most recent article of the four, Menkveld *et al.* (3) found much lower thresholds than the others. Using ROC curve analysis, the following thresholds were calculated: 4% for normal morphology and 45% for normal motility. The morphology again showed a good predictive value with an AUC of 78.2%. Although a threshold for sperm concentration was not calculated (a sperm concentration smaller than $20 \times 10^6/\text{mL}$ was used as inclusion criterion), the authors proposed that the cut-off value of $20 \times 10^6/\text{mL}$ could be used with confidence, based on the resultant lower 10th percentile of the fertile population. Adjusted cut-off points calculated on the assumption of 50% prevalence of male sub-fertility were as follows: 3% for proportion with normal morphology and 20% for proportion with normal motility (3).

In the fourth article by Guzick *et al.* (4), the authors used the CART analysis and calculated two thresholds for each semen parameter, which allowed for designation in three groups, namely normal (fertile),

borderline, and abnormal (sub-fertile). The normal (fertile) group had values greater than 12% for morphology, greater than 63% for motility, and higher than $48 \times 10^6/\text{mL}$ for sperm concentration. The abnormal (sub-fertile) group had values lower than 9% for morphology, lower than 32% for motility, and lower than $13.5 \times 10^6/\text{mL}$ for sperm concentration.

In these four articles, the predictive power of the different parameters was calculated as its AUC using the ROC curve. The AUC for sperm morphology ranged from 66 to 78.2%, confirming the high predictive power of sperm morphology. In fact, it had the best performance of the different semen parameters in two articles (1, 4). The thresholds calculated in these two articles were 10% and 9%, respectively, whereas Günlalp *et al.* (2) calculated a threshold of 12% using sensitivity and specificity to analyze their data and the fourth study calculated a 4% predictive cut-off point value. Although sensitivity and specificity for the values are relatively high, the positive predictive values are not. This will result in classifying fertile males as sub-fertile, therefore probably leading to a degree of anxiety and unnecessary and costly infertility treatment. A second and much lower threshold was calculated in three of the four articles. Ombelet *et al.* (1) calculated their second and much lower threshold by using the 10th percentile of the fertile population, whereas Günlalp *et al.* (2) screened the population with the positive predictive value as indicator and Menkveld *et al.* (3) assumed a 50% prevalence of sub-fertility in their study population. The lower threshold ranged from 3 to 5%. These lower thresholds have a much higher positive predictive value than the higher thresholds with the negative predictive value not much lower.

We suggest that the lower threshold should be used to identify males with the lowest potential for a pregnancy under *in vivo* conditions. Values above the lower threshold should be regarded as normal. These findings are in keeping with previous publications by Coetzee *et al.* (5) (*in vitro* fertilization (IVF) data) and Van Waart *et al.* (6) (intrauterine insemination (IUI) data), which showed a significantly lower chance of successful pregnancies in males with normal morphology below their calculated thresholds.

The higher threshold values for percentage motile sperm as calculated in the four articles (using ROC curve or CART analysis) ranged from 32 to 52% whereas the lower threshold values ranged from 20 to 30%. Motility also had a high predictive power with an AUC of between 59% and 79.1%. Günlalp *et al.* (2) calculated thresholds for progressive motility: a higher threshold of 42%, using the ROC curve, and a lower threshold of 14% with a positive predictive value as indicator. In this study, pro-

gressive motility proved to be a marginally better predictor of sub-fertility than sperm morphology with AUC values of 70.7% and 69.7%, respectively (2). Montanaro Gauci *et al.* (7) found percentage motility a significant predictor of IUI outcome. The pregnancy rate was almost three times higher in the group with motility more than 50% as compared with the group with motility less than 50%.

The higher threshold values for sperm concentrations calculated by Ombelet *et al.* (1), Günlalp *et al.* (2), and Guzick *et al.* (4) ranged from $13.5 \times 10^6/\text{mL}$ to $34 \times 10^6/\text{mL}$ whereas the lower threshold values ranged from $9 \times 10^6/\text{mL}$ to $14.3 \times 10^6/\text{mL}$. An AUC value of between 55.5% and 69.4% served as confirmation of the predictive power of this parameter. Although Menkveld *et al.* (3) did not calculate a threshold value for sperm concentration (because values of less than $20 \times 10^6/\text{mL}$ served as inclusion criteria in their study), they suggested a threshold value of $20 \times 10^6/\text{mL}$ to be used with confidence because it did not influence the results from their fertile population. The clinical value of motility and sperm concentration serve as confirmation of findings reported in numerous other publications (8–14).

Although the different parameters had good predictive power, independent of each other, the clinical value of semen analysis increased when the parameters were used in combination. Ombelet *et al.* (1) found that the differences between the fertile and sub-fertile populations only became significant when two or all three semen parameters were combined. Bartoov *et al.* (15) concluded that the fertility potential is dependent on a combination of different semen characteristics. Eggert-Kruse *et al.* (12) found a significant correlation between the three parameters reviewed in their study. Although the different semen parameters show good individual predictive power, the clinical value of semen analysis increases when the parameters are used in combination. We therefore suggest that no parameter should be used in isolation when assessing male fertility potential. The lower thresholds as discussed in this chapter have a much higher positive predictive value and a high negative predictive value. Therefore, we suggest that these lower thresholds should be used in identifying the sub-fertile male.

Each group should develop their own thresholds based on the population they are working in. It seems as if the sperm morphology threshold of 0–4% normal forms indicates a higher risk group for sub-fertility and fits the IVF and IUI data calculated previously (5, 6). The four articles discussed in the latter half of this chapter (1–4) showed the

same trends and can serve as guidelines to distinguish fertile from sub-fertile males.

As far as concentration and motility are concerned, the thresholds are not clear, but a concentration lower than $10 \times 10^6/\text{mL}$ and a motility lower than 30% seem to fit the general data (1–4). However, more, preferably multicenter, studies are needed to set definitive thresholds (16).

Semen profile of the general population: Partners of women with chronic anovulation

In general, there is quite a poor level of understanding and evidence regarding the profile of the semen analysis of the general population. Many male populations have been proposed to be the mirror image of the semen analysis of the general population. Using donors of a semen donation program for normality is certainly not the best option because this population is positively biased for fertility. Army recruits are biased by age. Husbands of patients with tubal factor infertility can be biased by a positive history of infection (tubal factor infertility as a result of pelvic infection) or a good fertility history (women with tubal sterilization). Therefore, we believe that possibly the best reference group to study the semen profile in a general population is the semen of partners of women who have been diagnosed to have chronic anovulation/PCOS. This group should reflect a wide variety of semen parameters (16).

We have studied 134 male patients of women with chronic anovulation. Based on the suggested threshold of 10 million per mL, 30% motility and 5% normal forms, 13.2% of these patients presented with severe male factor (azoospermia and triple or double semen defects) (Table 1). On the other hand, 52.2% of these men had normal semen parameters. The most common defect was that of teratozoospermia (26.8%) (Table 1)

Diagnostic andrology testing

In cases of mild or severe male factor patients, diagnostic andrology testing will provide clinical guidelines as far as the therapeutic modality is concerned. The results obtained with sperm-zona binding assays (17, 18) as well as zona induced acrosome reactions (19, 20) indicated the use of either intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or IVF. Diagnostic andrology testing provides information as far as fertilization success or failure is concerned.

Table 1 – Study of partners of women presenting with chronic anovulation (>35 days) at Tygerberg Fertility Clinic.

	Patients (n = 134)	% of patients
Normozoospermia	70	52.2
<i>Sperm abnormality</i>		
Single parameter defect		
Oligozoospermia (O)	4	2.9
Asthenozoospermia (A)	–	0
Teratozoospermia (T)	36	26.8
Polyzoospermia (P)	5	3.7
Immunological factor (I)	1	0.7
Double parameter defect		
OA	–	0
OT	5	3.7
AT	–	0
TP	4	2.9
TI	2	1.5
Triple parameter defect		
OAT	3	2.2
Azoospermia	4	2.9
Threshold values used:		
Concentration/mL = $<10 \times 10^6/\text{mL}$		
Motility = $<30\%$		
Morphology = $<4\%$ normal forms		

Should ICSI be carried out for all IVF patients?

In 1992, ICSI was reported as a treatment method for male factor infertility (21). To date, the use of this method for severe male factor infertility is widely supported (22). As with any new treatment modality there is always the pendulum effect regarding its real place in the assisted reproduction arena. There are authors suggesting ICSI to be used for all cases and indications of assisted reproduction even when clinical trials indicate that ICSI is no more effective than IVF (23).

Severe male factor infertility

Indications for ICSI are *ejaculated sperm* (oligozoospermia, asthenozoospermia, teratozoospermia ($<4\%$ normal) (24), anti-sperm antibodies (MAR $>60\%$), frozen sperm from cancer patients, ejaculatory disorders, e.g. retrograde ejaculation), *azoospermia* (absence of the vas deferens, failed vasovasostomy, obstruction of both ejaculatory ducts), and *testicular spermatozoa* (all indications for failed epididymal spermatozoa, azoospermia caused by testicular failure (maturation arrest, germ cell aplasia), necrozoospermia) (22).

ICSI is the first-choice treatment for severe male factor infertility to achieve pregnancy rates similar to IVF rates for non-male factor infertility (25). Although no randomized controlled trials exist, retrospective analysis indicated that live birth rates using ICSI for severe male factor infertility are far better than those for conventional IVF (when used as treatment for severe male factor infertility), IUI, and subzonal sperm injection for the same indication (26).

Non-male factor infertility

In a prospective randomized multicenter trial, IVF was compared with ICSI: 219 cycles in the IVF group and 206 in the ICSI group (23). Their results showed that the use of ICSI in couples suitable for IVF treatment does not offer any clinical benefits. They found a significant difference in implantation rates in favor of IVF, but the pregnancy rates did not differ significantly. They also reported that the proportions of multiple pregnancies were similar.

In a small (60 patients) prospective randomized trial of conventional IVF versus ICSI in unexplained infertility, Foong *et al.* (27) reported no differences in clinical outcomes associated with IVF versus ICSI in a treatment of unexplained infertility. In a recent Cochrane review (28), it was concluded that in the single identified study (19), no difference in pregnancy rates were reported (Odds ratio 1.4, 95% confidence interval, 0.95–2.2).

One could thus argue in favor of IVF in the light of simplicity and time involved in the laboratory as well as more and longer-term data available on children born from the IVF technique.

Male subfertility (mild male factor)

Tournaye *et al.* (29) reported on randomized controlled trials dealing with 'borderline semen parameters'. In these studies ($n = 9$), more oocytes were fertilized after ICSI (1264/2015 – 62.7%) than after conventional IVF (549/1688 – 32.5%). The relative ratio in all randomized controlled trials was in favor of ICSI. Complete fertilization failure occurred in 37.4% of the IVF cycles versus 2.5% of ICSI cycles. However, Tournaye *et al.* (29) advocated the use of high insemination concentration (HIC) to counteract fertilization failure, and in a prospective randomized trial, they showed that there was no significant difference in fertiliza-

tion between ICSI and HIC IVF. This concept must be taken into consideration in handling patients with borderline semen parameters, but more randomized controlled trials are necessary to test this concept.

We are in agreement with Tournaye *et al.* (29), stating that each IVF laboratory should try to improve their IVF procedure to the greatest extent and optimize the insemination procedures so as to cope with the specific demands of the couples involved. Corrective measures to promote IVF may have an important role to play, even in the era of ICSI (29). More randomized controlled trials comparing ICSI with optimized IVF procedures are certainly needed. In the meantime, at least a split IVF/ICSI approach may be chosen as a first choice in couples with moderate male subfertility (29).

Fertilization failure

Total fertilization failure occurs in 1–2 % of all IVF cycles (30). According to the Capri Workshop Group (22), no recent randomized studies considered ICSI for secondary prevention of failed fertilization in couples with a history of failed or poor fertilization (22). It is, however, common practice that most units will offer ICSI as the preferred method in such cases. It was suggested by the Capri Group that a trial should be performed with patients as the unit of randomization and live birth as the outcome (22).

To conclude, it is our opinion based on the evidence available, that IVF is the treatment method of choice in cases with non-male factor infertility. On the other hand, ICSI is the preferred treatment modality in cases with severe male factor infertility and fertilization failure. In patients with male subfertility, HIC can be considered with at least a split IVF/ICSI approach. To make these decisions, it is of utmost importance to develop clinical thresholds on the semen analysis to divide patients into severe male factor infertility, subfertility, and normozoospermia.

References

1. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, *et al.* (1997) Semen parameters in a fertile versus sub-fertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 12:987–993
2. Günel S, Onculoglu C, Gürkan T, *et al.* (2001) A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum Reprod* 16:110–114

3. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, *et al.* (2001) Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and infertile population: an effort towards standardization of *in vivo* thresholds. *Hum Reprod* 16:1165–1171
4. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, *et al.* (2001) Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345:1388–1393
5. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ (1998) Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 4:73–82
6. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, *et al.* (2001) Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 7:495–500
7. Montanaro Gauci M, Kruger TF, Coetzee K, *et al.* (2001) Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. *Andrologia* 33:135–141
8. Barratt CL, Naceeni M, Clements S, *et al.* (1995) Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Hum Reprod* 10:587–593
9. Ayala C, Steinberger E, Smith DP (1996) The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. *J Androl* 17:718–725
10. Chia SE, Lim ST, Tay SK, *et al.* (2000) Factors associated with male fertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. *BJOG* 107:55–61
11. Holland-Moritz H, Krause W (1992) Semen analysis and fertility prognosis in andrological patients. *Int J Androl* 15:473–484
12. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, *et al.* (1996) Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod* 11:139–146
13. Dunphy BC, Neal LM, Cooke ID (1989) The clinical value of conventional semen analysis. *Fertil Steril* 51:324–329
14. Cohlen BJ, te Velde ER, van Kooij RJ, *et al.* (1998) Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male subfertility: a controlled study. *Hum Reprod* 13:1153–1158
15. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, *et al.* (1993) Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod* 8:65–70
16. Siebert TI, Van der Merwe FH, Kruger TF, Ombelet W (2007) How do we define male subfertility and what is the prevalence in the general population? In: Kruger TF, Oehninger SC (eds) *Male fertility: diagnosis and treatment*. Informa Healthcare, London, pp 269–276
17. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, *et al.* (1998) The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49:688–697
18. Liu DY, Baken HWG (1994) Tests for human sperm zona pellucida binding and penetration. In: Tesarik J (ed) *Male factor in human infertility*, Ares Serono Symposium, Rome. *Front Endocrinol* 8:169–185
19. Liu DY, Baker HW (2003) Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 79:74–80
20. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Van Rooyen LH (2002) Clinical importance of zona pellucida induced acrosome reaction (SIAR test) in cases of failed human fertilization. *Hum Reprod* 16:138–144
21. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17–18
22. The ESHRE Capri Workshop Group (2007) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution. *Hum Reprod Update* 13:515–526
23. Bhattacharya S, Hamilton MPR, Shaaban M, *et al.* (2001) Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomized controlled trial. *Lancet* 357:2075–2079
24. Van der Merwe FH, Kruger TF (2005) The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest* 59:86
25. Van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM, Blake DA (2000) Intra-cytoplasmic sperm injection versus partial zona dissection, subzonal insemination and conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001301
26. Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10:19–28
27. Foong SC, Fleetham JA, O'Keane JA, *et al.* (2006) A prospective randomized trial of conventional *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 23:137–140
28. Van Rumste M, Evers JLH, Farquhar C (2003) Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilization in patients with non-male subfertility (Review). *Cochrane Database Syst Rev Issue* 2:CD001301
29. Tournaye H, Verheyen G, Albano C, *et al.* (2002) Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril* 78:1030–1037
30. Ola B, Afnan M, Sharif K, *et al.* (2001) Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception. *Hum Reprod* 16:2485–2490

F. Boitrelle, P. Marchetti,
V. Mitchell, B. Leroy-Martin
et C. Marchetti

Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP

Introduction

La fécondation humaine implique une succession d'étapes paliales aboutissant à l'activation de l'ovocyte et à l'initiation de l'embryogenèse. Le chemin jusqu'à l'ovocyte est long et semé d'embûches et il s'impose donc aux spermatozoïdes, d'être mobiles et féconds. Au terme d'un parcours de près de 3 000 fois leur taille, les spermatozoïdes, ayant franchi le col et « escaladé » les voies génitales féminines, atteignent finalement le sommet des trompes de Fallope et gagnent l'ampoule tubaire. Le spermatozoïde, alors capable, doit pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire, reconnaître et se lier à la zone pellucide de l'ovocyte, réaliser sa réaction acrosomique et forer la zone pellucide. Parvenu dans l'espace périvitellin, il s'arrimera à la membrane plasmique ovocytaire. Les membranes spermatique et ovocytaire fusionneront et le contenu du spermatozoïde s'intégrera alors au cytoplasme ovocytaire. L'ADN très condensé contenu dans la tête spermatique devra être décondensé pour former le pronucleus mâle. Ainsi, le spermatozoïde élu aura franchi de nombreux obstacles pour apporter au but, ce qu'il aura jusqu'alors protégé, la moitié du patrimoine génétique du futur zygote.

On peut estimer qu'à l'heure actuelle, un facteur causal masculin est impliqué chez la moitié des couples souffrant d'infertilité, et que cela concerne environ un homme sur 20. Pour évaluer les capacités migratoires et fécondantes du spermatozoïde, le biologiste dispose du spermogramme, auquel peuvent s'ajouter des tests dits fonctionnels qui explorent une à une chacune des étapes de la préparation du spermatozoïde à la fécondation, ainsi que ses qualités intrinsèques. Ces tests évaluent donc en partie le pouvoir fécondant du sperme, mais il convient dès à présent de préciser qu'aucun test ne permet à lui seul, de différencier avec certitude un sperme fécondant d'un sperme non fécondant. De plus, avec l'avènement de l'ICSI (*intra cytoplasmic sperm injection*), certains de

ces tests sont tombés dans l'oubli, ou sont peu utilisés en routine. En effet, l'ICSI permet de contourner les premières étapes de la fécondation. Il serait alors tentant de s'affranchir de ces tests fonctionnels et de proposer l'ICSI en première intention. Mais cette démarche court-circuite les schémas de réflexion qui tentent d'apprécier les capacités fécondantes des spermatozoïdes en vue d'adapter la prise en charge en AMP. En tant que professionnels de l'AMP, il faut s'imposer une réflexion adaptée et tenir compte des capacités des spermatozoïdes à se déplacer, à féconder à initier le développement d'un embryon capable de s'implanter et de se développer. Comprendre, connaître le spermatozoïde et évaluer ses fonctions devrait permettre de choisir la technique d'AMP la plus adéquate, d'éviter les échecs de la première tentative, de limiter les indications de l'ICSI aux seuls cas nécessaires, et éventuellement d'orienter certains patients vers d'autres alternatives que l'AMP. Seront décrits ici les principaux tests fonctionnels du sperme, anciens et récents, ce qu'ils explorent, leur technique de réalisation, leur intérêt dans la démarche diagnostique de l'infertilité masculine et dans le choix de la technique d'assistance médicale à la procréation. La figure 1 schématise la place de ces différents tests fonctionnels dans le diagnostic des capacités migratoires et fécondantes du spermatozoïde.

Mobilité spermatique et interaction sperme-glaire

Le mucus cervical est un maillage fait de longues chaînes glycoprotéiques réunies par des ponts disulfures. En phase préovulatoire, ces chaînes s'orientent parallèlement à l'axe du canal cervical, formant un filet à mailles larges permettant de « guider » les spermatozoïdes. Une glaire cervicale (endocol) de bonne qualité représente aussi un excellent milieu de survie pour les spermatozoïdes

permettant le relargage régulier de spermatozoïdes vers le corps utérin.

In vitro, la qualité de la glaire et le comportement des spermatozoïdes dans la glaire cervicale s'apprécient par le test de Hühner et le test de pénétration croisée.

Décrit par Sims en 1866, puis par Hühner en 1913, le test de Hühner ou test post-coïtal (TPC) est un test simple qui évalue les caractéristiques du col et celles du mucus cervical prélevé en période pré-ovulatoire après un rapport sexuel. Ceci permet, dans un premier temps, d'établir le score d'Insler et de déterminer le pH de la glaire. Pour les spermatozoïdes, la qualité de leur pénétration dans le mucus et leur survie dans cet environnement sont appréciées (fig. 1). En période préovulatoire, 2 à 12 heures après un rapport sexuel, le prélèvement de glaire est réalisé au laboratoire. Le prélèvement intéresse l'endocol, l'exocol et le cul-de-sac vaginal postérieur. À la lecture en microscopie optique d'au moins une dizaine de champs, au grossissement $\times 400$, le nombre moyen de spermatozoïdes mobiles par champ et la qualité de leur mouvement (progressif rapide, progressif lent ou sur place) sont déterminés. Le test est positif si on observe en moyenne la présence d'au moins dix spermatozoïdes mobiles par champ sur le prélèvement intéressant l'endocol. Confronté au spermogramme, ce résultat positif incite à éliminer une pathologie du mouvement flagellaire (dyskinésie flagellaire) et incite à poursuivre les inductions simples de l'ovulation avec rapports sexuels programmés. Si le test de Hühner est négatif (absence de spermatozoïdes) ou déficient (présence de peu nombreux spermatozoïdes, immobiles ou non progressifs), il doit être contrôlé sur un second prélèvement. En présence de spermatozoïdes au spermogramme, d'une glaire de qualité, et après avoir éliminé un problème

ballistique (non-compréhension des consignes, absence de rapport sexuel, absence d'éjaculation, dysfonctionnement sexuel), l'exploration d'un test de Hühner négatif, par des tests de pénétration croisée, se justifie.

Le test de Hühner est critiqué pour son manque de standardisation, et dans les années 1990, la méta-analyse anglo-saxonne de Griffith *et al.* (1) avait mis à l'écart ce test, en raison de sa faible valeur prédictive des chances de grossesse. Toutefois, le test de Hühner est un test simple qui mérite de (ré) intégrer le bilan de première intention de l'infécondité du couple, parce qu'il évalue la qualité du mouvement des spermatozoïdes, leur aptitude migratoire dans la glaire et leur survie (2). Il permet d'objectiver l'efficacité de l'éjaculation, d'éliminer le diagnostic de dyskinésie flagellaire et de poser l'indication du recours à l'insémination intra-utérine *versus* induction simple de l'ovulation. Il tient donc sa place dans le bilan de base de l'infertilité du couple.

Dans le test de pénétration croisée *in vitro*, on teste le mucus cervical de la patiente avec un sperme témoin et le sperme du patient avec une glaire témoin de bonne qualité. L'extrémité d'un capillaire rempli de mucus est placée au contact du sperme liquéfié. Ce test de pénétration croisée évalue la mobilité des spermatozoïdes et leurs capacités de migration dans la colonne de mucus. La réalisation de ce test nécessite une glaire cervicale préovulatoire de bonne qualité, une abstinence sexuelle de 3 jours, pour se placer dans les conditions qui permettent de diagnostiquer un déficit fonctionnel des spermatozoïdes ou une anomalie de la glaire cervicale non détectée au test de Hühner. Si le test de pénétration croisée est négatif (absence de progression des spermatozoïdes dans le mucus témoin) pour le sperme étudié avec la glaire de la patiente et la glaire témoin

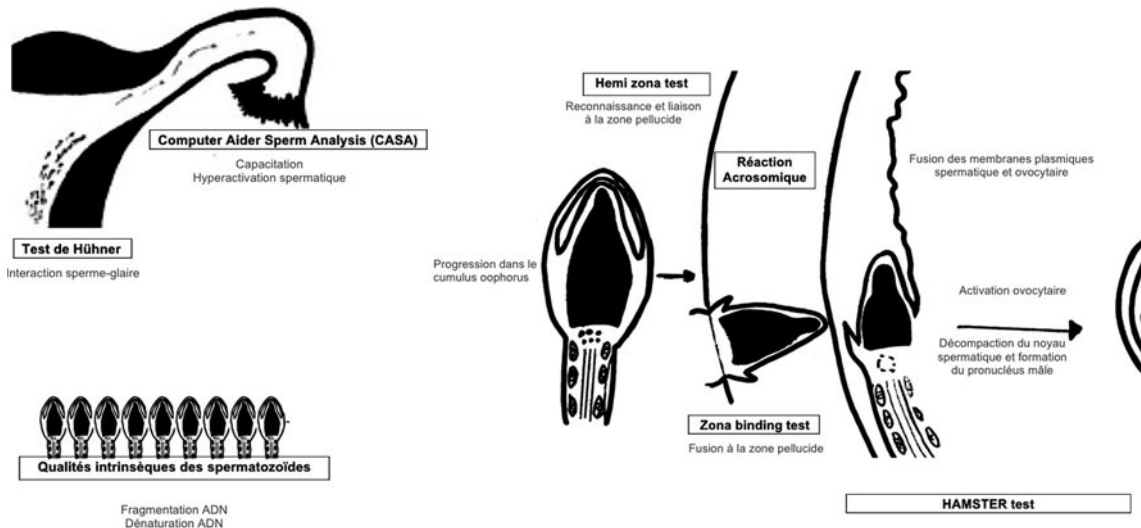


Fig. 1 – Principales explorations fonctionnelles des spermatozoïdes.

et qu'un sperme témoin donne un test positif avec la glaire de la patiente, on peut conclure à un déficit fonctionnel des spermatozoïdes du patient. Une recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le sperme est alors recommandée car la présence de ces anticorps influence la pénétration, la migration et la survie des spermatozoïdes dans le mucus cervical (3).

Une pathologie du mouvement flagellaire (dyskinésie flagellaire) est aussi à rechercher.

Capacitation

Les spermatozoïdes éjaculés sont mobiles, fécondants mais décapacités par des facteurs épидимaires et ne peuvent donc pas exprimer leur fécondance. Pour devenir fécondant, le spermatozoïde doit donc se « désinhiber ». En 1952, Chang et Austin découvrent ce phénomène de désinhibition réversible, et le nomme capacitation. *In vivo*, cette inhibition sera levée dans les voies génitales féminines après élimination du liquide séminal, qui est décapacitant. *In vitro*, la capacitation peut être réalisée artificiellement grâce à des milieux capacitants. La technique la plus simple est la séparation des spermatozoïdes du liquide séminal, soit par lavage-centrifugation douce ou à l'aide d'un gradient discontinu de densité de type Pure-sperm® (Nidacon International, Göteborg, Suède). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette capacitation sont, en résumé, des phénomènes de modifications des lipides membranaires (réorganisation des phospholipides membranaires, redistribution du cholestérol et efflux de cholestérol) induisant une augmentation de la fluidité membranaire et une déstabilisation membranaire. Ceci entraîne une mobilisation des protéines membranaires. Il s'ensuit une externalisation de récepteurs spermatiques qui permettront la fixation à la zone pellucide ovocytaire. Des zones membranaires fusiogènes apparaissent et une modification de l'activité des canaux ioniques entraîne une augmentation de la perméabilité aux ions calcium. Ces deux derniers événements préparent le spermatozoïde à la prochaine étape qu'est la réaction acrosomique. Dans le spermatozoïde qui se capacite, l'influx massif de calcium intracellulaire a pour effet d'augmenter l'activité adénylate-cyclase et de diminuer l'activité des phosphodiesterases, d'où une élévation du taux d'AMP cyclique (AMPc) dans le spermatozoïde, ce qui augmente sa mobilité. L'AMPc active en effet des protéines-kinases permettant la phosphorylation de nombreuses protéines spermatiques notamment flagellaires. Le témoin de la capacitation est l'acquisition par le spermatozoïde d'un mouvement dit hyperactif. La particularité de ce mouvement

est une grande vélocité, associée à des mouvements céphaliques latéraux de grande amplitude, et à des mouvements flagellaires importants et asymétriques. Cette mobilité hyperactive semble faciliter le détachement des spermatozoïdes de l'épithélium tubaire et la pénétration ultérieure de la zone pellucide. Notons que seuls les spermatozoïdes capables pourront pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire en conservant un acrosome intact.

Des systèmes d'analyse vidéomicrographique (système CASA pour *computer sperm analysis*) permettent une mesure automatisée, rapide, fine et objective de cette mobilité spermatique (fig. 1). Le champ microscopique est relié à une caméra, elle-même reliée à un ordinateur. Un logiciel permet de retracer la trajectoire suivie par la tête des spermatozoïdes. Les cinq paramètres permettant l'évaluation du mouvement sont la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse linéaire (VSL), l'index de linéarité (LIN), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) et la fréquence de rotation de la tête (BCF). Les spermatozoïdes hyperactivés sont ceux répondant aux critères suivants : $ALH > 5 \mu m$, $VCL > 100 \mu m/s$ et $LIN (VSL/VCL) < 60 \%$ (4). Pour qu'un spermatozoïde ait la force propulsive suffisante pour franchir les différentes barrières le séparant de l'ovocyte, on estime que l'ALH ne doit pas être inférieure à $2 \mu m$ et que la VSL ne doit pas être inférieure à $25 \mu m/s$ (5). Toutefois, la généralisation de l'utilisation de tels systèmes de lecture devra passer par la réduction de la variabilité inter-opérateurs des résultats. De plus, l'évaluation de la mobilité par le système CASA n'aurait qu'un faible pouvoir prédictif des taux de fécondation en FIV (6).

Reconnaissance et liaison à la zone pellucide ovocytaire

Parvenus en nombre restreint jusqu'au contact de l'ovocyte, les spermatozoïdes entrent à nouveau en concurrence pour reconnaître et se lier à la zone pellucide ovocytaire. La liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide est un processus spécifique d'espèce. Pour évaluer la reconnaissance, l'attachement et la fixation à la zone pellucide, le laboratoire doit donc disposer de zones pellucides d'ovocytes humains. Elles peuvent être obtenues à partir d'ovocytes issus d'échec de FIV, ou à partir d'ovocytes immatures. Ceci représente d'ores et déjà un biais car à la question : la zone pellucide des ovocytes immatures reflète-t-elle structurellement et fonctionnellement celle des ovocytes matures ?, il n'y a pas de réponse univoque.

Un *hemi-zona assay* est utilisé pour comparer la capacité de fixation de la population spermatique étudiée à une population de spermatozoïdes

témoins ayant prouvé leur fécondance (fig. 1). Plusieurs zones pellucides doivent être microscopiquement disséquées en deux. Un pool est mis en présence des spermatozoïdes à étudier, l'autre avec des spermatozoïdes témoins. Après incubation et lavage, le nombre de spermatozoïdes fixés sur chaque hémizone est compté. L'hémizona-ratio est calculé en divisant le nombre de spermatozoïdes testés fixés par le nombre de spermatozoïdes témoins fixés. Un ratio inférieur à 0,3 ou 0,4 est considéré comme pathologique (7).

Liu *et al.* (8) ont décrit une autre technique reposant sur la mise en compétition d'un sperme de donneur fertile avec le sperme testé, sur le même groupe d'ovocytes. Deux fluorochromes différents sont utilisés (fluorescéine et tétra-méthylrhodamine B par exemple), pour marquer chacun des spermatozoïdes. Après incubation et lavage, le nombre de spermatozoïdes « témoin » et « à tester », est compté et le ratio est calculé. Cette technique diffère de celle de l'*hemi-zona assay* mais l'interprétation de ce test est identique.

Ces tests fonctionnels permettraient d'identifier les patients pour qui la FIV conventionnelle risque d'être un échec, et seraient même les plus pertinents pour prédire les taux de fécondation en FIV, avec d'excellentes valeurs prédictives positive ($\geq 80\%$) et négative ($\geq 70\%$), et un taux faible de faux négatif (2 à 25 %) (6). Dans une étude plus récente, Arslan *et al.* (7), en 2006, montrent que l'*hemi-zona assay* est prédictif du taux de grossesse en insémination intra-utérine chez les couples pour lesquels une cause masculine a été identifiée. Ceci n'est pas vrai dans les infertilités inexplicables, compte tenu de la présence possible, dans ce cas, d'autres facteurs d'infertilité. Ces tests, bien que très séduisants, sont difficilement applicables dans les laboratoires d'analyse ne disposant pas d'un laboratoire de FIV à proximité.

Réaction acrosomique

Physiologiquement, la fixation à la zone pellucide induit la réaction acrosomique du spermatozoïde. L'acrosome est une vésicule qui coiffe les deux tiers antérieurs de la tête spermatique. La réaction acrosomique est la fusion des membranes plasmique et acrosomique externe du spermatozoïde conduisant à la formation de vésicules se dispersant progressivement avec libération concomitante du contenu acrosomial. Cette réaction se caractérise par un influx d'ions calcium et un efflux de protons à travers la membrane plasmique périacrosomique. Dans les conditions physiologiques, seuls les spermatozoïdes capables peuvent faire leur réaction acrosomique. Une fois la réaction acrosomique achevée, le spermatozoïde n'est alors recouvert en avant que par la membrane acrosomique interne qui peut ainsi être

exposée à l'ovocyte. La microscopie électronique est la seule méthode directe permettant de visualiser ou non de manière certaine l'acrosome, mais n'est pas utilisable en routine. Plusieurs tests ont été développés utilisant des marqueurs fluorescents différents (fig. 1). Il est possible d'évaluer le statut acrosomique des spermatozoïdes en utilisant des lectines ou des anticorps conjugués à des fluorochromes. Plusieurs lectines de spécificité différente, existent. Ainsi, les lectines d'*Arachis hypogaea* (AHA) *agglutinin* (9) et les lectines de *Pisum sativum* (*Pisum sativum agglutinin* ou PSA) mettent en évidence la perte du contenu acrosomique (10). Les spermatozoïdes ayant réalisé leur réaction acrosomique perdent leur fluorescence. La membrane acrosomique interne peut, elle, être visualisée par l'utilisation de la concanavaline A ou par un anticorps monoclonal comme le CD46, marqués à la fluorescéine. La réaction acrosomique se traduit, ici, par l'acquisition d'une fluorescence et non par sa perte comme pour les techniques précédentes. En pratique, la réaction acrosomique spontanée et la réaction acrosomique induite sont mesurées. Normalement, le taux de réaction acrosomique spontanée au moment de l'éjaculation est faible et inférieur à 10 % et les taux de réaction acrosomique spontanée sont peu discriminants entre les patients fertiles et asthénospermiques (11). Des tests reposant sur la détection de la réaction acrosomique après induction ont été mis au point. Les inducteurs potentiels sont les ionophores calciques tels que l'ionomycine et A23187, la progestérone, la zone pellucide, le fluide folliculaire humain, les activateurs de la protéine kinase C ou les analogues de l'AMPc. L'induction par le calcium ionophore est la technique la plus employée (pour revue (6)). Un pourcentage de réaction acrosomique spontanée trop élevé et/ou un faible taux de réaction acrosomique inductible sont de mauvais pronostic pour l'activité fécondante du sperme. Ces deux types d'anomalies sont retrouvés chez les patients infertiles. La réaction acrosomique prématurée est définie par la présence de plus de 20 % de spermatozoïdes acrosome-réagis dans l'éjaculat (12) et la réaction acrosomique insuffisante par le fait que la réaction acrosomique est difficilement inductible. La détermination du taux de réaction acrosomique spontanée et du taux de réaction acrosomique induite par le calcium ionophore A23187 permet de calculer un score, le score ARIC, pour *acrosome reaction following ionophore challenge*, qui est la différence des pourcentages de spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique, avant et après induction. Les valeurs normales du score ARIC sont comprises entre 20 et 98 %. Chez l'homme infertile, ce score est inférieur à 15 % et traduit des capacités fécondantes diminuées du sperme (12). Pour ce qui est de l'intérêt de l'évaluation de la réaction acrosomique avant la tentative d'AMP, dans la méta-analyse

d'Oehninger *et al.* (6), le pourcentage de réaction acrosomique induite est le paramètre qui a le plus fort pouvoir prédictif des chances de fécondation en FIV classique, avec les tests de fixation à la zone pellucide. Ainsi, si le score ARIC est inférieur à 10 %, l'ICSI est à privilégier (13).

« Hamster-test »

Une fois la réaction acrosomique achevée, le spermatozoïde n'est alors recouvert en avant que par la membrane acrosomique interne qui peut ainsi être exposée à l'ovocyte. Elle s'impliquera alors dans les phénomènes de reconnaissance de la membrane ovocytaire. La fusion entre les deux gamètes implique à la fois le segment équatorial et la cape post-acrosomique de la tête spermatique. Intégré dans le cytoplasme ovocytaire, le spermatozoïde subit de nombreuses modifications. Au niveau de la tête du spermatozoïde, l'ADN jusqu'alors particulièrement condensé, se décondense avant la formation *in fine* du pronucleus mâle.

En 1976, Yanagimachi *et al.* (14) ont montré que les spermatozoïdes humains capables pouvaient se lier et pénétrer des ovocytes dépellucidés de hamster puis décondenser leur chromatine et former des pronuclei mâles. Ceci a conduit au développement d'un test fonctionnel : le *hamster-test* ou SPA pour *sperm penetration assay* (fig. 1). En pratique, dénudés de leur zone pellucide, les ovocytes de hamster peuvent être fécondés par des spermatozoïdes humains, à condition que ceux-ci aient effectué toutes les étapes précédentes (capacitation, réaction acrosomique).

Le *hamster-test* permet donc d'évaluer les capacités fusiogènes des spermatozoïdes humains. Son interprétation repose sur le nombre moyen de spermatozoïdes fixés par ovocyte, sur le pourcentage d'ovocytes ayant au moins une tête spermatique décondensée, et sur le nombre moyen de têtes décondensées par ovocyte. Un test est considéré comme négatif si aucune tête spermatique décondensée n'est retrouvée. Un *hamster-test* positif associé à des échecs de FIV peut traduire une anomalie au niveau de la fixation et/ou de la pénétration de la zone pellucide puisque ce test ne fournit pas d'indication sur cette étape.

Ce test présente l'avantage de ne pas nécessiter d'ovocytes humains. Mais il est tout de même difficilement réalisable en routine car il nécessite un opérateur entraîné, un nombre élevé d'ovocytes de hamster, des spermatozoïdes témoins et des conditions standardisées pour capaciter les spermatozoïdes. D'après les méta-analyses de Mol *et al.* (15) et d'Oehninger *et al.* (6), la sensibilité de ce test est bonne mais sa spécificité mauvaise. Si le « hams-

ter-test » est anormal, les taux de fécondation peuvent être bons. Ce test n'offre donc que peu d'aide à la décision du choix de la technique d'AMP à utiliser. Parce que contraignant et peu informatif, le « hamster-test » est un test historique non utilisé en routine de nos jours.

Étude des fonctions nucléaires

Quelques-uns des nouveaux tests prometteurs, dans le but de prédire les chances de succès des techniques d'AMP en cas d'infertilité masculine, ou encore d'étudier l'action de divers stress, chimiques, physiques, iatrogènes ou non, reposent sur l'évaluation de la qualité de la chromatine et de l'ADN spermatiques.

L'ADN des spermatozoïdes matures a une structure très compactée, condensée. Plus de 85 % des histones initialement associées à l'ADN des spermatozoïdes ronds sont remplacées par des protamines de type 1 et 2 au cours de la spermiogenèse. Les protamines sont riches en groupements thiols, qui permettent l'établissement de nombreux ponts disulfures, condensant par 6, l'ADN des spermatozoïdes. Ainsi, sous cette forme condensée, l'ADN des spermatozoïdes est protégé d'éventuels dommages lors du transport dans le tractus génital mâle puis femelle. Si des dommages de l'ADN apparaissent, alors une des conséquences possibles est une diminution de la fertilité masculine.

L'étude de la condensation de la chromatine spermatique peut être réalisée par la coloration d'un frottis de sperme lavé au bleu d'aniline acétifié. Le bleu d'aniline colore en bleu foncé les zones de persistance des histones (riches en lysine) dans les noyaux spermatiques. Un sperme normal contient moins de 20 % de spermatozoïdes dont la chromatine est non condensée (15). Ce test est indiqué dans les échecs de fécondation ou en cas d'échecs répétés d'implantation embryonnaire en FIV/ICSI.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer une fragmentation excessive de l'ADN des spermatozoïdes. Une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes existe physiologiquement lors du remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse. Il existe alors des mécanismes de réparation spécifiques faisant intervenir une topo-isomérase II. Une activité excessive des topo-isomérases II ou une déficience en inhibiteurs de topo-isomérase peut induire une susceptibilité accrue de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés à la dénaturation, et une fragmentation de cet ADN (16). De plus, un défaut qualitatif ou quantitatif du contenu en protamines peut être responsable d'une fragilisation de l'ADN spermatique, due à une compaction insuffisante de la chromatine,

par défaut de pont disulfure (17). Une exposition à des doses supraphysiologiques de substances réactives de l'oxygène (ROS) est impliquée dans l'infertilité masculine et le stress oxydatif semble être une des causes majeures des dommages de l'ADN dans les cellules germinales mâles (18, 19). Ainsi, en cas d'infection ou d'inflammation, la genèse de ROS s'accompagne d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN. Indépendamment de processus infectieux ou inflammatoire, et en cas de fragmentation élevée de l'ADN des spermatozoïdes de certains patients infertiles, il a été constaté une diminution de cette fragmentation grâce à l'utilisation d'antioxydants. Enfin, bien que pendant longtemps controversé, de multiples observations plaident en faveur d'un phénomène apoptotique à l'origine des dommages de l'ADN observés dans les spermatozoïdes humains, avec la mise en évidence d'autres stigmates apoptotiques, comme la chute du potentiel de membrane mitochondriale, l'externalisation des phosphatidylsérines, la présence de caspases activées (20, 21), ou encore l'expression du récepteur de mort Fas à la surface des spermatozoïdes.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont été adaptées pour permettre d'évaluer la qualité de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes. Les techniques les plus utilisées à l'heure actuelle sont la technique TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*), et le SCSA (*sperm chromatin structure assay*) (pour revue (22)). Le TUNEL et le SCSA ont la particularité de permettre une analyse par cytométrie de flux. Cela permet d'obtenir des résultats avec une grande reproductibilité, une bonne fiabilité, et peu de variations inter-essais (22, 23), mais ces techniques de cytométrie de flux nécessitent une concentration spermatique supérieure à 1 million/mL. En l'absence d'un cytomètre de flux ou si la concentration spermatique est trop faible, ces deux techniques peuvent être évaluées également par microscopie à fluorescence *in situ*.

Le SCSA mesure la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes en milieu acide, en présence d'acridine orange (fig. 1). Celle-ci émet une fluorescence verte en cas de liaison avec de l'ADN intact double brin, rouge en cas de liaison avec de l'ADN simple brin (23). Les proportions d'ADN natif et dénaturé peuvent être mesurées par cytométrie de flux. On peut ainsi déterminer un index de fragmentation (DFI pour *DNA fragmentation index*) correspondant au rapport de fluorescence rouge sur la fluorescence totale. La technique TUNEL, également très utilisée, repose sur la fixation, aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN, de complexes biotine-désoxyuridine (dUTP) liés à un fluorochrome, grâce à une terminal-désoxynucleotidyl transférase (fig. 1). Le pourcentage de cellules ayant un ADN fragmenté

peut alors être détecté soit par microscopie à fluorescence *in situ*, soit par cytométrie de flux.

Ainsi, de nombreuses études montrent que l'ADN des spermatozoïdes de patients oligospermiques est plus altéré que celui de patients infertiles normospermiques, mais également que dans cette population, on trouve une fragmentation ou un DFI plus important que chez les hommes fertiles (pour revue (22)). Bien qu'une corrélation inverse soit significativement retrouvée entre le degré d'altérations de l'ADN spermatique et les paramètres classiques du spermogramme, cette corrélation reste faible (20). En revanche, indépendamment des caractéristiques du sperme, il semble que la fragmentation de l'ADN permette d'évaluer les capacités fécondantes des spermatozoïdes, et de prédire les chances de grossesse évolutives, en AMP, qu'il s'agisse d'inséminations intra-utérines, de FIV conventionnelle ou avec micromanipulation (pour revue (22)). Effectivement, en cas de fécondation d'un ovocyte avec un spermatozoïde ayant un niveau élevé d'ADN fragmenté qui dépasserait les capacités de réparation ovocytaire (24), on a pu observer des altérations du développement embryonnaire avec un taux de blastocystes plus faible, un taux de grossesse diminué, et un taux de fausses couches augmenté.

Tout le problème réside actuellement dans la détermination d'une valeur seuil pour ces deux techniques. Les équipes qui utilisent déjà ces tests ont établi leur propre valeur seuil. Mais pour un développement à plus grande échelle, et pour pouvoir intégrer ce test à l'activité de routine des laboratoires de spermologie, il sera nécessaire de passer par une standardisation des protocoles, afin d'en extraire une valeur seuil. Effectivement, en fonction des études et des populations étudiées, on observe un cut-off qui varie de 2,5 % à 38,5 % pour le TUNEL, de 8,9 % à 40 % pour le SCSA (22). La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes pourrait alors s'intégrer dans le bilan spermologique comme facteur pronostique de la fertilité masculine, mais aiderait également le clinicien dans son choix thérapeutique. Outre son intérêt en clinique, l'étude de l'intégrité de l'ADN spermatique est largement utilisée en toxicologie depuis de nombreuses années pour déterminer l'impact de certains toxiques environnementaux sur l'intégrité de l'ADN spermatique.

Étude de la fonctionnalité des mitochondries des spermatozoïdes

Depuis quelques années, les fonctions mitochondriales des spermatozoïdes ont été de plus en plus étudiées afin d'évaluer la qualité des spermatozoïdes

(20, 25-27). La gaine mitochondriale située dans la pièce intermédiaire et enveloppant la partie initiale de l'axonème génère l'énergie nécessaire à la mobilité des spermatozoïdes.

Un test permettant l'étude aisée de la fonctionnalité des mitochondries en routine est celui du potentiel de membrane mitochondriale interne des spermatozoïdes (fig. 1). Ce potentiel de membrane mitochondriale est un indicateur sensible de l'état énergétique de la mitochondrie, et donc de la cellule, et peut également être utilisé pour évaluer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, les systèmes de transport d'électrons, et l'activation de la transition de perméabilité mitochondriale. L'étude du potentiel de membrane mitochondriale est largement utilisée dans de nombreux modèles cellulaires, pour caractériser le métabolisme cellulaire, la viabilité et l'apoptose. Ce test repose sur l'utilisation de fluorochromes cationiques lipophiles, qui ont la particularité de s'incorporer à la membrane mitochondriale interne, et de s'y accumuler, en fonction du potentiel de membrane mitochondriale, selon la loi de Nernst. Ainsi, la fluorescence totale détectée est fonction du potentiel de membrane mitochondriale. Cette détection est aisément applicable à la cytométrie en flux. Plusieurs fluorochromes sont actuellement utilisés pour cette détection, dérivant de la rosamine, de la rhodamine ou de carbocyanine : le chlorométhyl-X-rosamine (CMX-ROS), le tétraméthylrhodamine ester (TMRE), le 3,3'-dihexyloxa-carbocyanine (DiOC6 (3)), le 5,5', 6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1), etc.

Dans les éjaculats, une corrélation existe entre une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes dont les mitochondries sont fonctionnellement altérées (baisse du potentiel de membrane mitochondriale), et des altérations d'un ou plusieurs paramètres de l'analyse conventionnelle du sperme (20, 25, 28, 29) ou des capacités de fécondations diminuées en FIV (27). Les spermatozoïdes ayant un fort potentiel de membrane mitochondriale ont une mobilité significativement augmentée, une morphologie meilleure (20) et *a priori* des capacités fécondantes supérieures (réaction acrosomique spontanée faible, mais élevée après induction par le calcium ionophore) à celle des spermatozoïdes ayant un potentiel de membrane mitochondriale abaissé (réaction acrosomique spontanée élevée, mais peu inducible par le calcium ionophore) (30). Ainsi, ce test très simple, peu coûteux en réactif, automatisable en cytométrie de flux et reproductible, ne nécessitant que peu de cellules (100 000 spermatozoïdes minimum), permet une mesure objective de la fonctionnalité des mitochondries des spermatozoïdes, et donc de leur qualité tant en termes de mobilité que de capacité

fécondante. Ce test peut également être utile pour déterminer l'impact des techniques de préparation de sperme (31), de la cryoconservation (32), ou encore de certains toxiques sur la qualité des gamètes mâles. Mais tout comme les tests évaluant l'intégrité de l'ADN spermatique, ce test nécessiterait une standardisation avec la détermination d'une valeur seuil, permettant d'une part de contribuer au diagnostic d'infertilité, et d'autre part de prédire les chances de grossesse en AMP.

Étude de la fonctionnalité des membranes des spermatozoïdes et externalisation de phosphatidylsérines

Au cours des remaniements de la membrane plasmique spermatique, on peut observer une externalisation des phosphatidylsérines (PS) (33). Ces PS peuvent alors être reconnues par l'annexine V, protéine fixant spécifiquement les phospholipides, ayant une haute affinité pour la phosphatidylsérine, mais ne pouvant franchir la membrane plasmique intacte (34). Ainsi, toute liaison entre l'annexine V et les PS de la membrane plasmique externe des spermatozoïdes, indique une perte de l'intégrité membranaire des spermatozoïdes (fig. 1). Cette liaison spécifique peut être mise en évidence si on couple l'annexine V à un fluorochrome, la fluorescence proportionnelle à l'externalisation des PS pouvant être détectée par cytométrie de flux (35). La signification de cette translocation et donc de sa détection reste controversée. Elle peut s'intégrer notamment dans un processus apoptotique précoce de la phase de dégradation de la cellule. Ainsi, après tri des spermatozoïdes sur microbilles d'annexine, les spermatozoïdes PS négatifs présentent moins de stigmates apoptotiques que les spermatozoïdes PS positifs, avec peu de caspases activées, un potentiel de membrane mitochondriale élevé et une fragmentation de l'ADN faible (31). Cette externalisation de PS est également mise en évidence lors de la capacitation et/ou de la réaction acrosomique (36, 37), ou encore lors d'une perméabilisation massive de la membrane plasmique si la cellule est nécrotique. C'est pourquoi, afin de différencier les spermatozoïdes viables avec des altérations membranaires, des spermatozoïdes nécrotiques, on couple systématiquement l'analyse de la fixation de l'annexine V aux spermatozoïdes, avec un marquage par un marqueur de viabilité tel que l'iodure de propidium (35). Ainsi, la proportion de spermatozoïdes viables avec une externalisation des PS est significativement plus élevée dans une population d'hommes infertiles que chez des donneurs. Cette fixation de l'annexine V aux PS externalisées a également été utilisée comme technique

de préparation de sperme, pour sélectionner les spermatozoïdes ayant une membrane intègre. De l'annexine V est fixée sur des microbilles colloïdales magnétiques, et les spermatozoïdes PS positifs sont ainsi retenus sur les microbilles, tandis que les spermatozoïdes PS négatifs ayant une membrane plasmique intègre, sont élués. Cette population de spermatozoïdes PS négatifs est enrichie en spermatozoïdes non apoptotiques, ces spermatozoïdes PS⁻ ont de meilleurs paramètres spermatiques conventionnels (mobilité, viabilité, morphologie) (38, 39), sont plus résistants à la cryoconservation (38), ont un pouvoir fécondant plus élevé, que les spermatozoïdes PS positifs (40). Ainsi, l'utilisation de cette étape de tri des spermatozoïdes PS négatifs après une première étape d'optimisation sur un gradient de densité pourrait être proposée dans un avenir proche, pour améliorer les techniques de préparation du sperme en vue d'AMP, qu'il s'agisse d'insémination intra-utérine, de FIV conventionnelle ou d'ICSI (31, 40).

Étude des substances réactives de l'oxygène

Les ROS, qui comprennent les radicaux libres, les peroxydes, et les ions oxygène, sont normalement produits par les mitochondries au cours de la phosphorylation oxydative. Dans l'éjaculat, l'origine des ROS est double, à la fois intrinsèque (produits par les spermatozoïdes eux-mêmes) et extrinsèque (produits par les leucocytes, et principalement par les polynucléaires neutrophiles) (41). Ces ROS sont nécessaires à l'acquisition de certaines fonctions des spermatozoïdes, incluant l'hyperactivation, la capacitation et la réaction acrosomique (pour revue (42)). Toutefois, de forts taux de ces composés peuvent être délétères et causer des dommages oxydatifs à différents niveaux (membranaire, protéique, ARN et ADN). En raison de la richesse de leur membrane plasmique en acides gras polyinsaturés, les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif, ce qui peut alors se traduire par une perte de l'intégrité membranaire (41). Les ROS peuvent aussi endommager directement l'ADN des spermatozoïdes, d'autant plus que les hommes infertiles ont plus fréquemment un défaut de protamination de la chromatine spermatique, la rendant plus vulnérable au stress oxydatif (43). C'est en réalité bien plus un déséquilibre entre les ROS et les capacités antioxydantes spermatiques (enzymatiques ou non) qui est responsable du stress oxydatif (pour revue (44)).

Les origines de ce stress oxydatif sont multiples. On peut observer un stress oxydatif testiculaire en cas de varicocèle (45), tout comme lors d'exposition à des polluants environnementaux (pestici-

des ou métaux lourds par exemple). De plus en cas d'intoxication tabagique, il a été mis en évidence une augmentation de 48 % de la leucospermie, et de 107 % du taux de ROS (46), avec en parallèle une baisse des capacités antioxydantes du plasma séminal. Les infections génito-urinaires aiguës ou chroniques sont également génératrices de stress oxydatif par la présence entre autres d'un afflux ou d'une colonisation leucocytaire.

De nombreuses études ont à présent mis en exergue un lien entre infertilité masculine et stress oxydatif. L'augmentation de la production de ROS est corrélée négativement aux données du spermogramme (47). Les éjaculats de patients tératospermiques, riches en spermatozoïdes immatures, produisent plus de ROS, en raison de la présence des résidus cytoplasmiques, riches en glucose-6 phosphate déshydrogénase, qui intervient indirectement dans la génération de ROS *via* la NADPH (48). Des niveaux élevés de ROS ont été détectés dans les éjaculats de 25 à 40 % d'hommes infertiles.

La méthode la plus couramment utilisée pour mesurer les ROS produits par les spermatozoïdes repose sur le principe de chimiluminescence, avec essentiellement deux réactifs, le luminol et la lucigénine. Le luminol permet de quantifier les ROS intra- et extracellulaire, grâce à un luminomètre, et les résultats sont exprimés en millions de photons par minute, pour 20 millions de spermatozoïdes. Les capacités antioxydantes du plasma séminal (TAC pour *total antioxidant capacity*) peuvent être évaluées en chimiluminescence, en évaluant la capacité du plasma séminal à tarir la chimiluminescence induite par une source constante de ROS. La détermination de ces deux paramètres, ROS et TAC, permet d'établir un score évaluant le stress oxydatif (49), résultat d'un déséquilibre entre les niveaux de ROS et les capacités antioxydantes du plasma séminal, à un moment donné (fig. 1). Ainsi, le score ROS-TAC est significativement supérieur dans la population des hommes fertiles par rapport à une population infertile (50 ± 10 vs $35,8 \pm 15$), avec une probabilité de grossesse inférieure à 10 % en cas de score inférieur à 30 (49).

Malgré les nombreuses études faisant état du rôle du stress oxydatif comme étiologie d'infertilité masculine, peu de laboratoires de spermologie réalisent ces tests du fait des difficultés de standardisation (temps d'incubation, contamination par des leucocytes notamment) (50).

Conclusion

Évaluer la fécondance d'un sperme est difficile. Le spermogramme de base permet d'orienter la démarche diagnostique de l'infertilité vers d'éven-

tuels tests fonctionnels. Mais actuellement aucun examen n'est, à lui seul, totalement prédictif de la fécondance du sperme. De plus, parce que contraignants pour certains, sans seuil pathologique défini pour d'autres, ces tests sont peu utilisés et leur intérêt dans la démarche diagnostique de l'infertilité est nettement sous-estimé de nos jours. Une des raisons pour lesquelles les tests fonctionnels spermatozoïques peinent à faire partie du bilan spermologique est principalement l'arrivée et le succès de l'ICSI, avec certaines études montrant que les résultats (taux de fécondation, de développement embryonnaire, d'implantation) étaient indépendants des paramètres d'analyse conventionnelle, même en cas d'altérations majeures du spermogramme. De plus, les taux de « take-home baby » (retour à la maison avec un enfant né et bien portant) étant similaires voire meilleurs à ceux de la FIV conventionnelle, pourquoi alors essayer d'aller plus loin dans l'exploration de l'infertilité masculine ? L'ICSI permet en effet de pallier, le plus souvent, les déficits fonctionnels du spermatozoïde. Toutefois, l'ICSI ne résout pas toutes les infertilités masculines, et les résultats des taux de grossesse depuis une dizaine d'années stagnent. De nombreuses équipes tentent donc de mettre en place de nouveaux tests, reflétant les qualités intrinsèques des spermatozoïdes. Ces tests semblent prometteurs dans l'exploration de l'infertilité masculine, mais nécessitent une meilleure standardisation pour s'intégrer dans l'analyse spermologique standard.

Et pour conclure, on peut espérer que demain ces tests seront réalisés de façon non invasive sur des spermatozoïdes ultérieurement injectables et pourquoi pas être reliés ou corrélés à la morphologie spermatozoïde... Si tel était le cas, le pari du choix possible du top spermatozoïde serait gagné...

Références

- Griffith CS, Grimes DA (1990) The validity of the postcoital test. *Am J Obstet Gynecol* 162: 615-20
- Zorn JR (2006) Current place of the Huhner test in the work-up of couple infertility. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 142-46
- De AM, Zouari R, Jouannet P, Feneux D (1991) In-vitro effects of anti-sperm antibodies on human sperm movement. *Hum Reprod* 6: 405-10
- Mortimer ST, Mortimer D (1990) Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 11: 195-203
- ESHRE Andrology Special Interest Group. European Society for Human Reproduction and Embryology (1998) Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod* 13: 142-45
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E *et al.* (2000) Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reproduction Update* 6: 160-8
- Arsilan M, Morshedi M, Arslan EO *et al.* (2006) Predictive value of the hemizona assay for pregnancy outcome in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Fertil Steril* 85: 1697-707
- Liu DY, Lopata A, Johnston WI, Baker HW (1988) A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertil Steril* 50: 782-88
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A (2007) Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hyposmotic swelling test. *Int Braz J Urol* 33: 364-74
- Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Rooyen LH (2001) Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. *Hum Reprod* 16: 138-44
- Pilikian S, Guerin JF, Adeleine P *et al.* (1992) Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in asthenozoospermic infertile semen. *Hum Reprod* 7: 991-93
- Makkar G, Ng EH, Yeung WS, Ho PC (2003) The significance of the ionophore-challenged acrosome reaction in the prediction of successful outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination. *Hum Reprod* 18: 534-39
- Sigman M, Zini A (2009) Semen analysis and sperm function assays: what do they mean?" *Semin Reprod Med* 27: 115-23
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15: 471-6
- Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP (1990) Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 13: 452-62
- Morse-Gaudio M, Risley MS (1994) Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* 107: 2887-98
- Carrell DT, Liu L (2001) Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22: 604-10
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA *et al.* (2003) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 79 Suppl 3: 1597-605
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D (2003) Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 7: 65-70
- Marchetti C, Obert G, Deffoese A *et al.* (2002) Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17: 1257-65
- Marchetti C, Gallego MA, Defossez A *et al.* (2004) Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum.Reprod* 19: 1127-34
- Sergerie M, Bleau G, Teule R *et al.* (2005) Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 33: 89-101
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23: 25-43

24. Shwood-Smith MJ, Edwards RG (1996) DNA repair by oocytes. *Mol.Hum Reprod* 2: 46-51
25. Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B *et al.* (2004) Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum. Reprod* 19: 2267-76
26. Piasecka M, Kawiak J (2003) Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia HistochemCytobiol* 41: 125-39
27. Wang X, Sharma RK, Gupta A *et al.* (2003) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80 Suppl 2: 844-50
28. Espinoza JA, Schulz MA, Sanchez R, Villegas JV (2009) Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrologia* 41: 51-4
29. Troiano L, Granata AR, Cossarizza A *et al.* (2000) Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 241: 384-93
30. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P (2006) The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril* 86: 1526-30
31. Said T, Agarwal A, Grunewald S *et al.* (2006) Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 74: 530-37
32. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK *et al.* (2004) Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 71: 1828-37
33. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E *et al.* (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 74: 245-50
34. van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP (1995) The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost* 73: 172-9
35. Glander HJ, Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 5: 109-15
36. Kotwicka M, Jendraszak M, Warchol JB (2002) Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 40: 111-2
37. de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68: 2122-34
38. Said TM, Grunewald S, Paasch U *et al.* (2005) Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril* 83: 1442-6
39. Said TM, Agarwal A, Grunewald S *et al.* (2006) Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 13: 336-9
40. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V *et al.* (2008) Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 92: 572-7
41. Aitken RJ (1994) A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6: 19-23
42. de Lamirande E, O'Flaherty C (2008) Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 1784: 106-15
43. Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 12: 417-35
44. Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59: 2-11
45. Smith R, Kaune H, Parodi D *et al.* (2006) Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 21: 986-93
46. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK *et al.* (2002) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 78: 491-9
47. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR (1994) Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 152: 107-10
48. Said TM, Agarwal A, Sharma RK *et al.* (2005) Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 83: 95-103
49. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR *et al.* (1999) The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 14: 2801-7
50. Aitken RJ, Baker MA, O'Bryan M (2004) Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *J Androl* 25: 455-65

F. Vialard, M. Albert,
D. Molina Gomes,
P. Clément, F. Ferfour,
M. Bailly et J. Selva

Génétique et infertilité masculine

Introduction

L'infertilité peut être considérée comme une maladie multifactorielle qui touche aujourd'hui plus de 15 % des couples. Dans un tiers des cas, une cause purement féminine est retrouvée, dans 21 % des cas une cause uniquement masculine, et une cause à la fois féminine et masculine est objectivée dans 39 % des cas. Enfin, dans 7 % des cas, aucune cause n'est trouvée (infertilité inexpliquée dite idiopathique) (1).

De plus en plus souvent, des causes génétiques sont identifiées, plaçant cette étiologie parmi les causes principales et plusieurs arguments plaident dans ce sens :

- L'augmentation de la fréquence des réarrangements chromosomiques chez des hommes infertiles par rapport à la population générale. Ces réarrangements pourraient être responsables d'une anomalie mécanique de la méiose mais aussi de l'inactivation d'un gène crucial pour la spermatogenèse. À côté des réarrangements chromosomiques, il ne faut pas oublier le syndrome de Klinefelter, première cause génétique d'infertilité masculine.
- La fréquence des individus infertiles ayant des parents consanguins, et les nombreux cas familiaux de stérilité, avec plusieurs membres d'une fratrie atteints, ou plusieurs individus infertiles de la même famille sur plusieurs générations. Ceci a renforcé l'hypothèse d'une transmission récessive de gènes mutés impliqués dans la spermatogenèse.

L'objectif de cette revue n'est pas d'envisager toutes les étiologies. De plus, on estime encore que 90 % des causes génétiques d'infertilité chez l'homme ne sont toujours pas élucidées. Enfin, depuis la mise en évidence d'une détérioration progressive des caractéristiques spermatiques au cours du siècle, l'hypothèse d'un rôle de l'environnement et la susceptibilité génétique à l'action de tel ou tel toxique semble être majeure.

Au total, le terme cause génétique d'infertilité regroupe différents axes de recherche :

- cytogénétique : par l'étude des remaniements chromosomiques ;
- étude de gènes candidats découverts dans les modèles murins ;
- les études de familles (ou des cas familiaux) ;
- les études de polymorphismes génétiques ;
- la susceptibilité génétique et l'impact de l'environnement sur la spermatogenèse.

Enfin, les avancées technologiques permettent d'envisager, à l'instar de toutes les maladies multifactorielles, une étude de tout le génome par séquençage haut débit ou l'utilisation de puces génomiques. Le développement de cartes de prédispositions aux maladies multifactorielles est donc envisageable. Ceci pourrait donc avoir un impact sur la protection de la spermatogenèse et permettrait peut-être une prise en charge précoce des altérations potentielles de celle-ci.

Anomalies cytogénétiques

La réalisation du caryotype des individus présentant un trouble de la fertilité est une pratique aujourd'hui courante. Les premières études du caryotype de populations d'hommes infertiles ont montré que la fréquence des anomalies chromosomiques était beaucoup plus importante dans ces populations que dans la population des enfants nouveau-nés (2). Cette fréquence varie entre 2 et 20 % selon la population infertile étudiée (3-5), et elle augmente avec la sévérité de l'atteinte spermatique, la numération étant le paramètre le plus prédictif d'un risque d'anomalie chromosomique. En effet, on les retrouve dans 14 % des azoospermies, avec des anomalies touchant préférentiellement les gonosomes (chromosomes sexuels) et dans 5 % des oligospermies avec des anomalies touchant préférentiellement les autosomes (6).

On distingue deux grandes catégories d'anomalies chromosomiques, celles affectant le nombre des

chromosomes (aneuploïdies) et celles touchant leur structure. Si certaines d'entre elles sont associées à un syndrome clinique particulier, d'autres peuvent se révéler uniquement par un phénotype d'infertilité. Pour schématiser, il semble que les anomalies équilibrées affectant les gonosomes entraînent le plus souvent des azoospermies, les anomalies équilibrées concernant les autosomes plutôt des oligospermies. Ces anomalies peuvent survenir *de novo* ou être héritées. Mais si les translocations peuvent être compatibles avec une fertilité, puisqu'elles peuvent être héritées, elles constituent néanmoins un facteur de risque d'altération de la gamétogenèse et le mécanisme exact par lequel l'anomalie chromosomique équilibrée peut induire un échec de gamétogenèse n'est pas clairement élucidé. Ces remaniements sont souvent de découverte fortuite lors du bilan de couple avant une injection spermatique intracytoplasmique (ICSI).

Grâce aux progrès de la cytogénétique moléculaire et à l'analyse directe des gamètes par la technique d'hybridation moléculaire *in situ*, de nombreuses avancées ont été possibles pour tenter d'expliquer l'impact des remaniements chromosomiques sur la gamétogenèse.

Syndrome de Klinefelter et autres aneuploïdies

Le syndrome de Klinefelter a été décrit pour la première fois en 1942 (7). C'est l'un des syndromes génétiques les plus connus et sa fréquence a été estimée à 1/500 à 1/1 000 garçons (8). En cas d'infertilité, la fréquence augmente jusqu'à plus de 3 % parmi les patients azoospermes (9). Le syndrome de Klinefelter (47, XXY) est donc probablement la cause chromosomique, voire génétique, d'infertilité masculine la plus fréquente dans la population générale.

Ce syndrome est caractérisé par une altération majeure de la spermatogenèse allant le plus souvent jusqu'à l'azoospermie. Les altérations pourraient être dues à :

- une anomalie de la méiose, la vésicule sexuelle, formée par l'appariement de l'X et de l'Y, pourrait être perturbée par la présence d'un chromosome X surnuméraire ;
- la surexpression de gènes de la spermatogenèse sur l'X comme *USP26*, ou du gène du récepteur aux androgènes (AR), le gène *FMR1* impliqué dans le syndrome de l'X fragile, etc.

Néanmoins, il existe des cas de syndrome de Klinefelter où l'on retrouve des spermatozoïdes lors d'une biopsie testiculaire ou même dans l'éjaculat, deux cas de grossesses spontanées ont même été décrits (10, 11).

La plupart des syndromes de Klinefelter sont considérés comme étant homogènes avec la totalité des cellules 47, XXY dans le sang. Dans 10 % des cas, il

existe une mosaïque associant des cellules 46, XY à des cellules 47, XXY (12). C'est d'ailleurs le plus souvent dans ces cas de mosaïques que des spermatozoïdes sont retrouvés dans l'éjaculat, les individus non mosaïques étant très généralement azoospermes.

Dans certains cas, quelques foyers de spermatogenèse persistent, et l'obtention de spermatozoïdes prélevés chirurgicalement, lors de biopsie testiculaire, permet de réaliser une ICSI (6, 13). Cependant, ces spermatozoïdes présentent une augmentation du risque d'aneuploïdie (14, 15).

Pour expliquer l'augmentation de la fréquence des aneuploïdies spermatiques, deux hypothèses ont été proposées : la première est que les spermatogonies 47, XXY entrant en méiose induisent une augmentation de l'incidence des hyperploïdies (14, 15), la seconde est que seules les spermatogonies normales 46, XY sont capables d'achever la spermatogenèse, mais dans un environnement testiculaire très défavorable (16, 17), induisant des anomalies méiotiques. L'hypothèse la plus probable, vérifiée sur des modèles murins, est que seules des cellules 46, XY sont capables d'achever leur différenciation chez des sujets qui ont en fait une mosaïque germinale, mais la spermatogenèse s'effectue dans un environnement testiculaire défavorable, qui augmenterait de quelques pourcents les erreurs de ségrégation en première et en deuxième division méiotique.

Ce risque peut affecter aussi bien les gonosomes (chromosomes X et Y) que les autosomes comme le 21*. Ceci conduit à proposer dans ces situations, dans certains pays un diagnostic préimplantatoire (DPI) (18, 19).

Afin d'écarter ou de confirmer les différentes hypothèses chez l'homme, nous avons commencé une étude des taux d'aneuploïdies spermatiques dans quatre groupes de patients : les patients Klinefelter, les patients ayant une azoospermie d'origine sécrétoire à caryotype normal, les patients ayant une azoospermie d'origine excrétoire et une population témoin de patients ayant des caractéristiques spermatiques normales selon les critères de l'OMS et une descendance. Les résultats préliminaires montrent que les anomalies observées concernent la paire XY et les autosomes des patients Klinefelter mais aussi les patients ayant une azoospermie sécrétoire (16). En cas d'azoospermie excrétoire inflammatoire ou infectieuse, il n'y a pas d'augmentation du taux d'aneuploïdie ni du taux de non-appariement des chromosomes X et Y par rapport à des patients témoins à sperme normal. De plus, aucun pachytène aneuploïde n'a été observé pour l'ensemble des groupes. La fréquence élevée de spermatozoïdes aneuploïdes serait donc liée à des anomalies méiotiques survenues après le stade pachytène, donc probablement la conséquence d'une anomalie

* Résultats personnels non publiés.

méiotique des gonies initialement normales. Ces anomalies pourraient être liées soit à un environnement testiculaire délétère (à déterminer) provoquant de nombreuses malségrégations chromosomiques, soit à une prédisposition génétique, soit à une interaction entre les deux phénomènes.

D'autres aneuploïdies peuvent toucher avec une plus grande fréquence les populations d'hommes infertiles, comme les doubles Y ou les petits marqueurs surnuméraires. La nature hétérochromatique de ces marqueurs fait qu'ils pourraient s'associer préférentiellement au bivalent XY et gêner la formation de la vésicule sexuelle, mais des études restent à faire dans ce domaine.

Anomalies de structure des chromosomes

Parmi les anomalies de structure des chromosomes, les translocations robertsoniennes (fusions centriques) ou réciproques (deux points de cassures sur deux chromosomes différents) ou les inversions (deux points de cassures sur le même chromosome) peuvent être également responsables d'infertilité. Étant donné le caractère apparemment aléatoire des points de cassures chromosomiques observés, il paraît peu vraisemblable que l'atteinte de la gamétogenèse soit due à la cassure d'un gène d'intérêt impliqué dans la formation des cellules germinales. Ceci a été confirmé récemment par l'étude des points de cassures récurrents sur le chromosome 1, chromosome surreprésenté dans les anomalies retrouvées chez les patients infertiles (20).

En revanche, le risque de malségrégation chromosomique dans les gamètes augmente la probabilité de voir naître un enfant porteur d'un syndrome malformatif avec retard mental mais également celui de fausses couches spontanées plus ou moins précoces. Une étude de la ségrégation des chromosomes impliqués dans la translocation, réalisée sur les spermatozoïdes, permet d'évaluer l'incidence des déséquilibres chromosomiques et ainsi, en fonction de l'estimation de la viabilité du conceptus, d'évaluer les risques d'échec d'implantation, de fausse couche précoce ou de naissance d'un enfant présentant un déséquilibre chromosomique lorsqu'un embryon est obtenu dans le cadre de l'AMP. L'intérêt pratique de ce bilan nous conduit à proposer cette étude systématiquement aux patients infertiles avant toute prise en charge.

L'analyse chromosomique des spermatozoïdes a été réalisée pour une centaine de translocations réciproques (21) ou robertsoniennes (22), et une trentaine d'inversions (23, 24). Ces études ont fourni des données essentielles sur la diversité des taux de déséquilibres chromosomiques dans les gamètes, ainsi que sur la distribution de ces déséquilibres à l'issue de la méiose. Elles consti-

tuent donc un outil pronostique important pour le conseil génétique apporté aux patients porteurs de remaniements chromosomiques.

Translocations réciproques entre autosomes

L'étude de la ségrégation sur spermatozoïdes humains est désormais réalisée par hybridation *in situ* fluorescente sur spermatozoïdes ou sperm-FISH, à l'aide de trois sondes : une ou deux sondes centromériques et une ou deux sondes télomériques (fig. 1 et 2).

D'après ces études, le taux de déséquilibres varie selon les translocations entre 18,6 % et 93,4 %. En moyenne, le taux est proche de 50 %, voire légèrement inférieur.

L'hypothèse d'un effet interchromosomique associé à la présence d'une translocation réciproque a été évoquée par plusieurs auteurs depuis la découverte d'une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques chez les parents d'enfants présentant une trisomie 21 libre (25). Ce phénomène, qui correspond à la non-disjonction méiotique de chromosomes non impliqués dans le remaniement, se traduit par l'observation de trisomies libres et homogènes dans la descendance des patients porteurs d'une translocation. Les études menées sur les spermatozoïdes de patients porteurs de translocations réciproques, en vue de mettre directement en évidence ce phénomène, ont montré des résultats très contradictoires (26, 27). En effet, les patients étudiés étant pour la plupart oligospermes, l'augmentation de la fréquence des malségrégations des chromosomes non impliqués dans la translocation pourrait être due, non pas à l'anomalie chromosomique, mais à l'altération de la spermatogenèse. Des études complémentaires restent nécessaires pour pouvoir conclure.

Translocations réciproques autosomes-gonosomes

Ces translocations sont décrites comme étant très défavorables pour la spermatogenèse car souvent retrouvées chez des individus azoospermes (6). Néanmoins, quelques cas ont été rapportés de patients ayant une altération plus ou moins sévère de la spermatogenèse, mais avec suffisamment de spermatozoïdes pour réaliser une analyse cytogénétique de la translocation (28, 29). Le risque de déséquilibre semble être comparable à celui trouvé dans les translocations réciproques, mais les effectifs sont restreints et d'autres cas doivent être rapportés. Il semble que la taille des fragments transloqués influe sur la concentration spermatique. Des fragments de petite taille pourraient être moins préjudiciables à la conservation de la spermatogenèse, en ne favorisant pas l'appariement des gonosomes en quadrivalents (28). Ceci permettrait d'expliquer la sur-représentation des

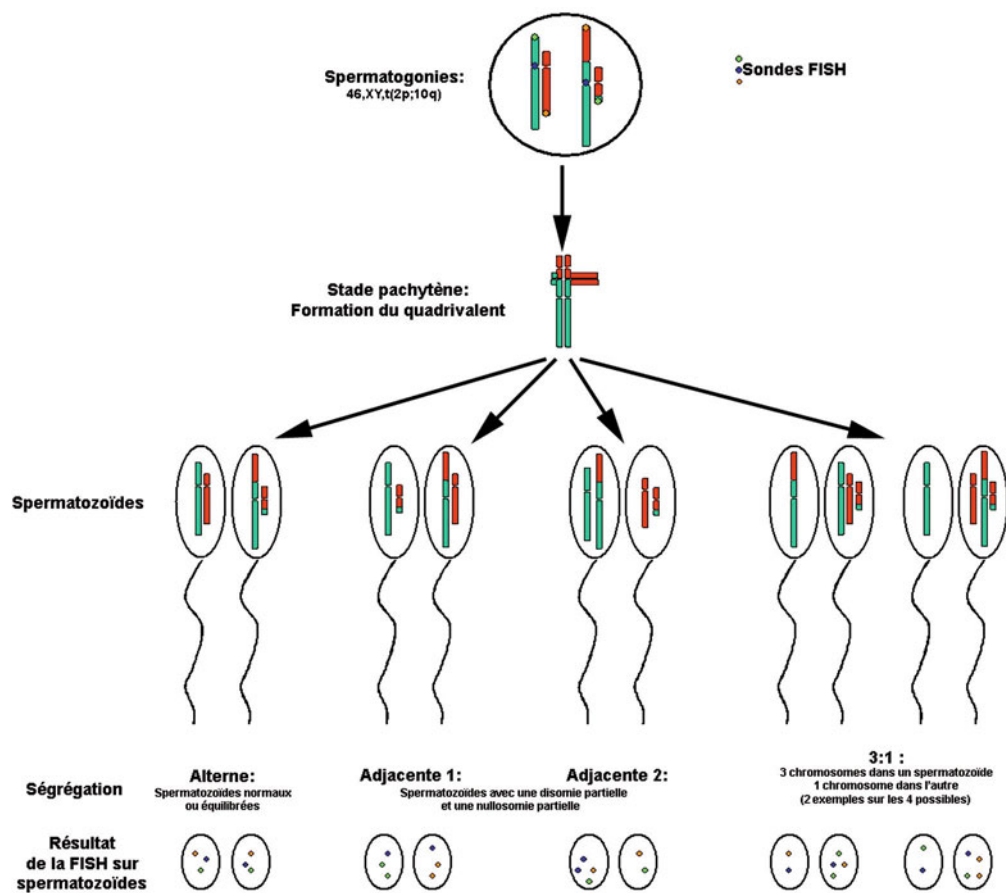


Fig. 1 – Étude de la ségrégation d’une translocation réciproque par spermFISH.

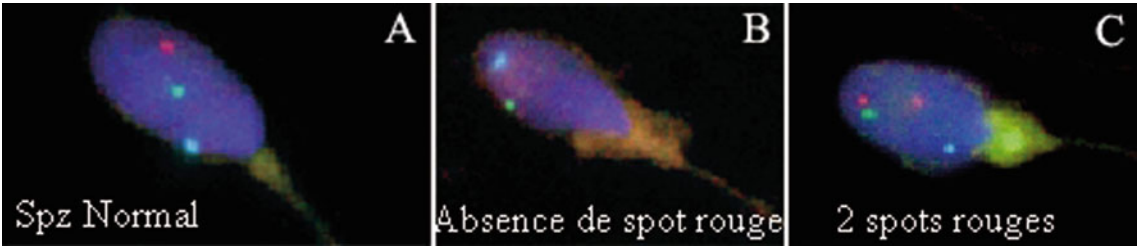


Fig. 2 – Analyse par FISH de la ségrégation chromosomique dans les spermatozoïdes d’un patient porteur d’une translocation entre le bras long d’un chromosome 9 et le bras court d’un chromosome 10. Le centromère du chromosome 9 est coloré en vert, le télomère du bras long du chromosome 9 en rouge et le centromère du chromosome 10 est marqué en bleu. A : spermatozoïde normal ; B : spermatozoïde anormal avec une disomie 10 partielle et une nullosomie 9 partielle ; C : spermatozoïde anormal avec une disomie 9 partielle et une nullosomie 10 partielle.

ségrégations alterne et adjacente 1. Parallèlement, ceci serait associé à une forte augmentation du risque d’avoir un enfant porteur d’un retard mental, plus ou moins sévère.

Translocations robertsoniennes

Étant donné que ces translocations intéressent uniquement les chromosomes acrocentriques : 13, 14, 15, 21, 22, et que leur formation repose essentiellement sur un processus de fusion centromérique, les résultats d’analyse gamétique

sont plus homogènes, avec quelques grandes lignes directrices, même si une étude au cas par cas doit toujours être réalisée. L’essentiel de ces études a porté sur les deux translocations les plus fréquemment observées, à savoir la translocation t (13 ; 14) et la translocation t (14 ; 21) qui, à elles seules, représentent plus de 85 % des translocations robertsoniennes. Les fréquences de déséquilibres dans les spermatozoïdes des patients porteurs de ces remaniements se situent entre 10 et 15 % (22) (fig. 3).

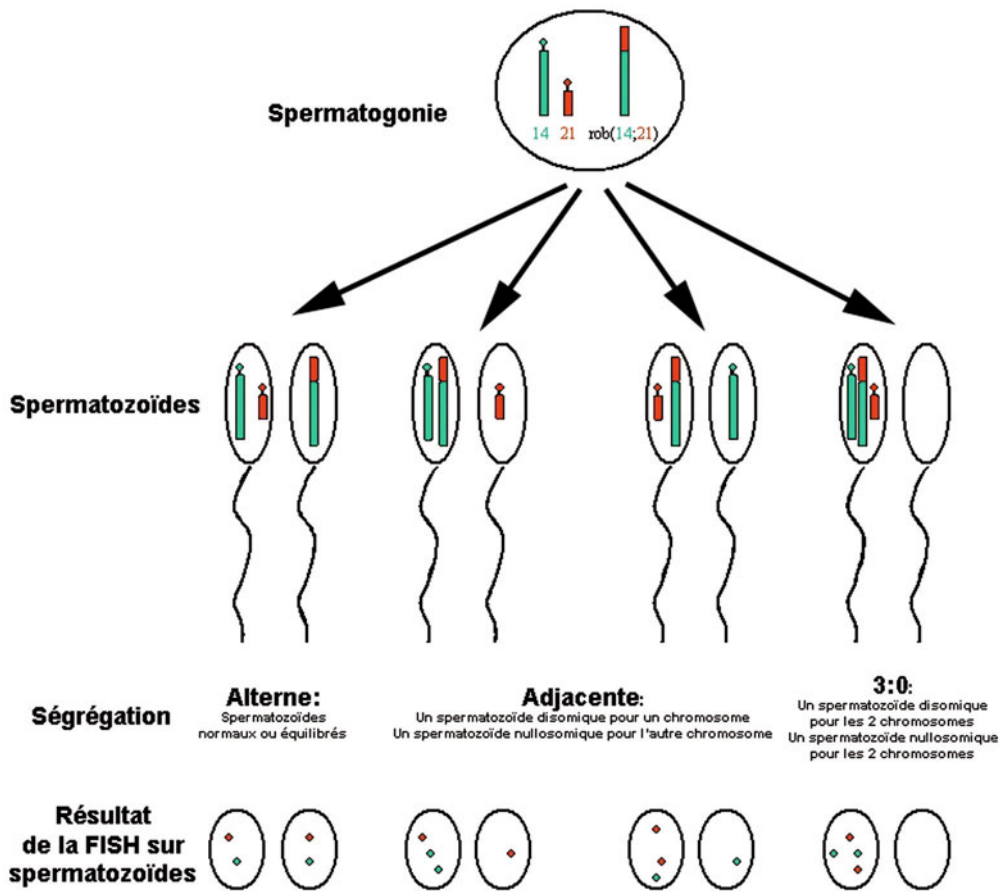


Fig. 3 – Étude de la ségrégation d'une translocation robertsonienne par spermFISH.

Il est intéressant de noter que, malgré cette relative homogénéité des taux de déséquilibres dans ces populations, il existe des fluctuations importantes de la qualité du sperme chez ces patients. Ces observations laissent à penser qu'il existe des variantes dans les mécanismes moléculaires de formation des translocations robertsoniennes. Une seule étude a analysé les autres translocations robertsoniennes, dites rares, et a montré que les taux de malségrégations étaient plus élevés, proches de 20 % (30).

Inversions

Moins fréquentes que les translocations, les inversions peuvent donner un phénotype d'infertilité en raison des figures méiotiques caractéristiques en boucle qu'elles produisent. Des asynapsis locaux pourraient aussi être à l'origine d'un dysfonctionnement génique. De plus, en cas de crossing-over à l'intérieur de ces boucles, l'aneusomie de recombinaison qui s'ensuit aboutit à un chromosome déséquilibré qui peut donner une fausse couche. Dans les inversions paracentriques, ce chromosome est, de plus, dicentrique, ce qui entraîne un

blocage mécanique de la ségrégation et la mort de la cellule.

Inversions péricentriques

Les études réalisées sur le sperme de patients porteurs d'inversions péricentriques font apparaître une grande hétérogénéité dans les pourcentages de déséquilibres méiotiques (de 0 à 37 %) (31). Il semblerait que le taux de spermatozoïdes déséquilibrés soit lié à la taille du segment inversé et à sa proportion par rapport à la taille du chromosome entier. Ainsi, le risque devient important si le segment représente plus de 50 % de la taille du chromosome et/ou s'il fait plus de 100 Mb (23, 31).

Récemment, nous avons confirmé, par l'étude d'une cohorte de sept patients porteurs de l'INV (2) (p11q13), la faible proportion de spermatozoïdes aneuploïdes (taux moyen d'anomalies de 0,3 %) mais aussi la faible variation interindividuelle. Ceci nous permet donc de proposer une adaptation du conseil génétique pour les couples dont le conjoint est porteur de l'INV (2) (p11q13) en raison de l'absence de risque surajouté de FCS par rapport à la population générale (32).

Inversions paracentriques

Très peu de cas ont été rapportés dans la littérature, mais tous montrent un risque de malségrégation faible, inférieur à 1 % (24), à l'exception des inversions du chromosome 9, 14 et 18 (33). Ces résultats semblent confirmer le caractère anodin de ces remaniements qui pourraient être assimilés à des variants chromosomiques, à l'exception de ceux affectant les chromosomes 9, 18 et 14 pour lesquels des chromosomes dicentriques issus d'inversions paracentriques ont été observés chez des nouveau-nés à terme (34).

Anomalies cytogénétiques chez les patients ayant une altération de la spermatogenèse et un caryotype normal

En dehors des patients dont l'azoospermie est d'origine sécrétoire, d'autres patients rencontrés dans le cadre du bilan de leur infertilité présentent un risque accru d'aneuploïdie spermatique dû à une malségrégation méiotique (35, 36). Ainsi, il a été observé une augmentation de la prévalence des aneuploïdies chez les fœtus conçus après ICSI (37), qui concerne plus particulièrement les anomalies des gonosomes (38). Certaines anomalies morphologiques spermatiques comme la macrocéphalie sont reconnues comme étant à risque très augmenté d'anomalies chromosomiques, et pourraient justifier un diagnostic préimplantatoire (DPI) (19). D'autres anomalies morphologiques semblent liées à un taux élevé d'anomalies chromosomiques comme certains cas d'anomalies flagellaires (39). Les tératospermies majeures sont d'ailleurs, pour certaines, des indications au DPI (40).

Une autre catégorie de patients semble également intéressante, ceux dont le couple a des fausses couches à répétition. Une étude est actuellement en cours dans le cadre du GEMA (Groupe d'étude de la maladie abortive), et les premiers résultats semblent montrer un taux moyen d'aneuploïdie spermatique légèrement au-dessus de la normale par rapport à celui d'une population témoin, mais surtout qu'il existe bien dans cette population des patients chez qui le taux d'aneuploïdie spermatique est important*.

Cas particulier des microdélétions moléculaires du chromosome Y

Depuis la description de patients azoospermes présentant des délétions ou d'autres anomalies cytogénétiques touchant le bras long du chromosome Y, il a été permis d'assigner à la région Yq11, située

au-dessus de la portion hétérochromatique, un rôle majeur dans le maintien de la spermatogenèse. Des microdélétions ont pu être ultérieurement décrites dans cette région du chromosome Y chez des patients infertiles. Trois régions ont été identifiées comme pouvant être à l'origine d'azoospermie ou d'oligospermie en cas de délétion, les régions AZFa, AZFb et AZFc (41). L'incidence de ces microdélétions du chromosome Y dans les populations d'hommes infertiles varie entre 3 % et 28 % (42) et la probabilité de trouver une délétion de l'Y est plus importante chez les patients azoospermiques que chez les oligozoospermiques et ceci d'autant plus que l'infertilité est idiopathique.

Au total, si les délétions moléculaires de la région Yq11 sont fréquemment associées à une infertilité masculine, la gravité de l'atteinte testiculaire peut varier selon les cas. Il a été montré qu'en général les délétions d'AZFa s'accompagnent d'une azoospermie par absence totale de cellules germinales dans les tubes séminifères (syndrome SCO : *Sertoli cell only*) alors que celles d'AZFb sont plutôt associées à un arrêt de maturation de ces dernières à un niveau variable de la spermatogenèse. Il est admis aujourd'hui qu'il est inutile de proposer une biopsie testiculaire aux patients dont la délétion emporte AZFa ou b, dans la mesure où aucun spermatozoïde ne sera retrouvé (43).

Les microdélétions du locus AZFc sont rencontrées à la fois chez des patients présentant des azoospermies et des oligozoospermies. De plus, chez ces derniers, l'histologie testiculaire peut montrer d'importantes variations d'un tube séminifère à un autre avec un aspect de SCO sur certaines sections et une spermatogenèse plus ou moins conservée sur d'autres.

La description (44) d'une famille dans laquelle un père a pu transmettre une délétion d'AZFc à quatre fils tous infertiles soulève la question du rapport entre l'existence d'une délétion sur l'Y et le génome particulier d'un individu, les antécédents cliniques ou certains facteurs environnementaux pouvant en effet moduler l'impact de l'anomalie génétique sur la spermatogenèse.

La mise en évidence de délétions chez des patients infertiles a conduit à rechercher les gènes candidats pour faire partie du facteur AZF, c'est-à-dire ceux dont la perte peut être responsable d'une atteinte sévère de la spermatogenèse. On distingue deux groupes, ceux qui s'expriment de façon ubiquitaire dans l'organisme (gènes de ménage), en général en copie unique sur l'Y mais possédant souvent un homologue sur l'X qui échappe à l'inactivation, et ceux dont l'expression est limitée au testicule, généralement présents en multiples copies sur l'Y et sans homologue sur l'X. L'intérêt de ces gènes vient évidemment de leurs fonctions respectives mais aussi de leur implication dans le phénotype de stérilité. Ainsi, le gène DFFRY, qui code pour une protéine

* Résultats personnels non publiés.

de désuubiquitination, joue probablement un rôle important dans la gamétogenèse comme le suggèrent les mutations décrites chez la drosophile. L'analyse du nombre de copies des gènes DAZ, en multiples copies sur le chromosome Y, a montré aussi qu'il fallait un nombre minimal de copies de ce gène pour avoir une spermatogenèse conservée (45).

Modèles murins d'inactivation génique

L'intérêt des modèles murins, dont l'inactivation génique conduit à un phénotype limité à la lignée germinale mâle, est double puisqu'ils mettent l'accent sur tel ou tel gène impliqué dans la stérilité et qu'ils permettent de localiser le niveau de l'atteinte dans la gamétogenèse par l'étude histologique de la gonade. Il est ainsi possible de différencier des gènes agissant sur la migration et la multiplication des cellules germinales primordiales, la méiose et les mécanismes de réparation de l'ADN, la maturation des spermatides et des spermatozoïdes chez la souris.

Cette approche très souvent utilisée dans la littérature s'avère souvent longue, coûteuse et à l'origine de l'identification de peu d'anomalies géniques, comme par exemple pour les gènes de méiose.

Chez la souris, les invalidations de ces gènes très conservés dans l'évolution comme *Spo11*, *DMC1*, *ATM*, *MSH4* ou *MSH5* entraînent une infertilité dans les deux sexes. Si l'identification de variants à l'état hétérozygote des gènes *SPO11*, *MSH4*, *MSH5*, *DMC1* a été faite dans certains cas de ménopauses précoces chez la femme (46), il est probable que l'on identifiera les mêmes ou d'autres variants dans des cas d'altérations spermatiques.

Étude des cas familiaux d'infertilité masculine

L'approche mendélienne est évidemment l'approche de choix, en étudiant les cas familiaux d'infertilité. La forte prévalence de consanguinité dans certaines populations a d'ailleurs permis récemment l'identification d'anomalies géniques.

Génétique et mobilité flagellaire

Historiquement, les asthénospermies ont été parmi les premières anomalies bien documentées en microscopie électronique. L'absence des deux bras de dynéine, des bras externes de dynéine, de la nexine, ou de la gaine interne a été décrite depuis longtemps. Depuis, des mutations sur les gènes *DNAI1* (47), *DNAI2* (48), *DNAH11* (49) et *DNAH5* (50) ont été identifiées. Il a également

été décrit une délétion d'environ 100 kb, à l'état homozygote chez des patients ayant une asthénospermie associée à une surdité (51, 52) en 15q15.1. Il s'agit d'un syndrome dit de gènes contigus, la délétion du gène *STRC*, codant pour la stéréociline, étant responsable de surdité, celle du gène *CATSPER2*, qui code pour un canal ionique exprimé au niveau du flagelle, de l'asthénospermie.

Génétique et biogenèse de l'acrosome

L'étude d'une famille présentant trois hommes atteints de globozoospermie et trois sujets fertiles ont permis de mettre en évidence une mutation dans un gène spécifique de la spermatogenèse : *SPATA16* (53). À l'état homozygote, cette mutation est responsable de l'anomalie dans la famille étudiée. La protéine *SPATA16* n'est exprimée que dans le testicule. Cela a permis aux auteurs :

- de déterminer pour les patients étudiés, la cause exacte de leur infertilité, de les informer des risques pour leur descendance ;
- de déterminer le mode de transmission de l'affection dans la famille ;
- d'améliorer la connaissance fondamentale de la biogenèse de l'acrosome.

Syndrome des spermatozoïdes macrocéphales

La macrocéphalie spermatique est reconnue comme étant à haut risque d'anomalies chromosomiques. Si les spermatozoïdes macrocéphales sont tous polyploïdes (54), les spermatozoïdes de taille apparemment normale de ces patients portent aussi un risque élevé d'anomalies chromosomiques (55). Des patients d'origine maghrébine ont été identifiés comme étant porteurs d'une mutation homozygote pour le gène de l'aurora kinase C (*AURKC*) (56), impliqué dans les mécanismes de ségrégation chromosomique. Dans un deuxième temps, cette même équipe (57), avec la collaboration de différentes équipes françaises et maghrébines, il a pu être démontré que cette mutation avait une fréquence supérieure à 2 % dans la population générale d'origine maghrébine, et que si elle était importante pour la spermatogenèse elle n'avait aucun effet sur l'ovogenèse. Au total, dans cette population, un individu masculin sur 10 000 était théoriquement homozygote pour cette mutation sans tenir compte de l'augmentation du risque liée à la consanguinité. Ceci fait de ce syndrome l'un des plus fréquents dans la population maghrébine, que celle-ci soit nord-africaine ou française.

Maladies syndromiques et infertilité

Il existe aussi de nombreux gènes principalement autosomiques responsables d'un syndrome avec infertilité masculine. Dans leur majorité, ils jouent un rôle dans le développement des gonades et des conduits génitaux. Ainsi, tous les syndromes associés à une ambiguïté sexuelle sont potentiellement intéressants pour la compréhension des mécanismes de l'infertilité. Très récemment, des mutations du gène *NR5A1* ont été identifiées, avec une même mutation pouvant être responsable soit d'une insuffisance ovarienne prématurée, soit des troubles de développement sexuel à type d'hypoadénos chez l'homme (58).

CFTR et agénésie des canaux déférents

Dans le cas d'azoospermie, l'exemple le plus connu d'anomalie génique est constitué par les mutations du gène *CFTR* (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ou *ABCC7* (pour *Atp-Binding Cassette subfamily C member 7*).

L'association de deux mutations majeures entraîne la mucoviscidose, l'association d'une mutation majeure et d'une mutation mineure ou du polymorphisme d'épissage 5T entraîne un phénotype atténué, comme la présence isolée chez un individu masculin d'une atrésie bilatérale des canaux déférents. Cette recherche de mutation doit être faite de façon systématique chez tous les patients atteints d'azoospermie ou d'oligospermie extrême d'origine excrétoire, d'autant que leur fréquence à l'état hétérozygote varie de 1/25 à 1/40. Dans 22 % des cas, la mutation $\Delta F508$ est retrouvée (59), et la même analyse chez la conjointe doit alors être réalisée pour évaluer le risque de survenue d'un enfant atteint par la mucoviscidose. Dès lors qu'un patient est hétérozygote pour une mutation du gène *CFTR*, la probabilité, sans connaître le génotype de sa conjointe, d'avoir un enfant atteint est de 1/50 à 1/80.

Enfin, dans ce cas bien particulier, où la présence d'une mutation type $\Delta F508$ peut être à l'origine, à l'état isolé ou non, d'une agénésie bilatérale des canaux déférents, un conseil génétique avant ICSI doit être fait afin de prévenir les couples de la possible récurrence de ce syndrome dès lors que l'enfant sera un garçon.

Prédisposition génétique à l'infertilité

La fréquence élevée des infertilités de l'ordre de 15 % suggère que l'infertilité n'est probablement pas une pathologie monofactorielle, mais bien multifactorielle, comme le montrent les nom-

breux gènes précédemment cités. Comme les autres maladies multifactorielles, il existe aussi des mécanismes de prédisposition. Il y a probablement donc une prédisposition génétique aux infertilités, et ceci repose sur l'analyse de polymorphismes génétiques.

Des études de type cas/témoin comparant une population d'hommes infertiles par déficit de la spermatogenèse (oligospermes et azospermes d'origine sécrétoire) à une population témoin de patients à spermatogenèse normale ont déjà été entreprises et les résultats de ces études préliminaires réalisées sur certains gènes impliqués dans la spermatogenèse, comme *USP26* (60), les gènes de la protamine (*PRM1* et 2) (61, 62), des protéines de transition *TNP1* et 2 (63), *spo11* (64) sont encourageants.

Récemment, le rôle du polymorphisme d'un gène ubiquitaire a été démontré chez des hommes infertiles (65). Il s'agit de l'allèle variant du polymorphisme en -308 du gène du *TNF α* , cytokine ayant des actions multiples au niveau de l'organisme. Cette variation de séquence mononucléotidique (SNP), qui correspond à la substitution d'une guanine (G, définissant l'allèle commun *TNF308.1*) par une adénine (A, pour l'allèle variant *TNF308.2*) à la position -308 dans la région du promoteur du gène du *TNF α* , entraîne une surexpression du *TNF α* .

L'analyse de la distribution génotypique du polymorphisme en -308 du gène du *TNF α* chez 684 hommes affectés par des infertilités d'origine variée a retrouvé une plus grande fréquence de l'allèle *TNF308.2* chez les patients présentant une numération spermatique diminuée d'origine sécrétoire (nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat inférieur à 40 millions en accord avec les normes de l'Organisation mondiale de la santé) et chez les patients à numération spermatique normale mais présentant un défaut de mobilité des spermatozoïdes. Chez les patients à numération spermatique abaissée, porteurs de l'allèle variant *TNF308.2*, comparé à ceux porteurs de l'allèle commun *TNF308.1*, on observe un déséquilibre de la balance hormonale avec des taux d'inhibine B accrus et des taux plasmatiques de FSH réduits.

Ceci laisse entrevoir un possible essai thérapeutique pour les patients ayant une altération de la mobilité spermatique et/ou de la spermatogenèse, par des traitements anti-TNF pour tenter de restaurer la spermatogenèse ou du moins l'améliorer en diminuant le taux de *TNF α* .

De la même façon, l'étude d'autres cytokines ubiquitaires ayant un rôle important au niveau de la gamétogenèse et présentant également des polymorphismes d'expression comme l'interleukine 1 β (*IL1 β*) ou l'interféron γ (*IFN γ*) pourrait être intéressante.

Génétique, infertilité et environnement

Depuis l'observation d'une diminution de la qualité spermatique chez les patients donneurs de sperme (66), l'altération de la spermatogenèse liée à des mécanismes environnementaux ne fait plus de doute. Des travaux effectués sur le rat ont montré de façon très explicite que, lors de certaines expositions médicamenteuses de la femelle gestante, l'hypospermatogenèse de la descendance mâle à l'âge adulte était due à une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (ou mort cellulaire programmée) lors de l'embryogenèse (67). Le mécanisme serait une induction par les médicaments d'une modification épigénétique des gènes impliqués dans l'apoptose.

En effet, le génome est soumis à des mécanismes qui permettent de réguler l'expression des gènes sans en modifier la séquence. Un des mécanismes est la méthylation des doublets cytosine/guanine. La méthylation d'un gène provoque, en règle générale, son inactivation. Les perturbations de l'épigénétique sont encore peu connues, mais semblent être à l'origine de très nombreuses pathologies humaines dont le cancer (68) et pourraient être impliquées dans certains cas d'hypospermatogenèse. Tous les phénomènes perturbant la méthylation de l'ADN sont donc potentiellement à l'origine de pathologies et les cellules les plus sensibles sont celles qui ont un haut taux répliatif comme les cellules germinales. On peut émettre l'hypothèse que des facteurs environnementaux pourraient modifier cette méthylation dans les cellules germinales et donc modifier l'expression des gènes dans ces tissus.

Conclusion

- Si dans la majorité des cas, la cause de l'infertilité est inconnue, les progrès des techniques de l'assistance médicale à la procréation ont permis à de nombreux couples de procréer. Nous nous trouvons ainsi dans une situation inverse de celle de « l'eugénisme » avec le risque de transmettre une anomalie génétique à la descendance.
- La découverte d'une cause génétique est d'une grande importance dans l'aide au diagnostic, au conseil génétique, afin d'expliquer les risques pour la descendance. Ceci permet aussi pour un accroissement de nos connaissances fondamentales en biologie de la reproduction.
- Maintenant un grand nombre de cas d'azoospermies sont associés à des données histologiques testiculaires. Cependant, ces résultats observés au stade adulte de la gonade ne reflètent pas les événements primaires qui ont eu lieu lors du développement embryonnaire testiculaire et

principalement durant la vie fœtale, ni les causes environnementales qui auraient un impact sur la spermatogenèse à l'âge adulte. Les études futures permettront de comprendre les mécanismes impliqués dans cette dégradation de la spermatogenèse avec l'espoir derrière de pouvoir protéger la spermatogenèse, voire de corriger les altérations.

- Si la grande majorité des infertilités sont cliniquement isolées, certaines plus rares, sont associées à une pathologie, on parlera alors d'infertilité syndromique. Dans ce cadre, les mutations du gène *CFTR* sont les plus fréquemment recherchées.
- Enfin, avec le développement des nouvelles technologies et la possibilité de séquencer tout le génome, cela nous permettra d'identifier de nombreuses modifications de séquence. L'étape de validation de ces anomalies sera donc fondamentale et devra se faire par des études fonctionnelles afin de faire la distinction entre un simple polymorphisme génétique et une mutation délétère.

Références

1. Thonneau P, Marchand S, Tallec A *et al.* (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 6: 811-6
2. Koulischer L, Schoysman R (1975) Studies of the mitotic and meiotic chromosomes in infertile males. *J Genet Hum* 23 Suppl: 58-70
3. Bourrouillou G, Mansat A, Calvas P *et al.* (1987) Chromosome anomalies and male infertility. A study of 1,444 subjects. *Bull Assoc Anat* 71: 29-31
4. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R *et al.* (1984) Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 66: 162-4
5. Hens L, Bonduelle M, Liebaers I *et al.* (1988) Chromosome aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum Reprod* 3: 451-7
6. Staessen C, Coonen E, Van Assche E *et al.* (1996) Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11: 1650-3
7. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F (1942) Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without Leydigism, increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 2: 615-27
8. Nielsen J, Wohler M (1991) Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 87: 81-3
9. Guichaoua MR, Delafontaine D, Noel B, Luciani JM (1993) Male infertility of chromosomal origin. *Contracept Fertil Sex* 21: 113-21
10. Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A (1982) Paternity in Klinefelter's syndrome--a case report. *Arch Androl* 8: 149-51
11. Terzoli G, Lalatta F, Lobbiani A *et al.* (1992) Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril* 58: 821-2
12. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E (2004) Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364: 273-83.

13. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I *et al.* (1996) Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11: 1644-9
14. Tilgen N, Guttenbach M, Schmid M (2001) Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1--Y, 9--Y, and 16--Y in human spermatozoa. *Exp Cell Res* 265: 283-7
15. Estop AM, Munne S, Ciepły KM *et al.* (1998) Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 13: 124-7
16. Bergere M, Wainer R, Nataf V *et al.* (2002) Biopsied testis cells of four 47,XXY patients : fluorescence in-situ hybridization and ICSI results. *Hum Reprod* 17: 32-7
17. Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14: 1151-6
18. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E *et al.* (2003) PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update* 9: 319-30
19. Kahraman S, Sertyel S, Findikli N *et al.* (2004) Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 9: 79-85
20. Bache I, Assche EV, Cingoz S *et al.* (2004) An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur J Hum Genet* 12: 993-1000
21. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P *et al.* (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111: 281-90
22. Roux C, Tripogney C, Morel F *et al.* (2005) Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 111: 291-6
23. Morel F, Laudier B, Guerif F *et al.* (2007) Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22: 136-41
24. Vialard F, Delanete A, Clement P *et al.* (2007) Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87: 418-25
25. Lindenbaum RH, Hulten M, McDermott A, Seabright M (1985) The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? *J Med Genet* 22: 24-8
26. Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V *et al.* (2005) Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 28: 372-9
27. Machev N, Gosset P, Warter S *et al.* (2005) Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 84: 365-73
28. Vialard F, Molina Gomes D, Roume J *et al.* (2009) Meiotic segregation in spermatozoa of a 46,X,t(Y;10)(q11.2;p15.2) fertile translocation carrier. *Reprod Biomed Online* 18: 549-54
29. Vialard F, Guthauser B, Bailly M, *et al.* (2005) Le risque chromosomique pour un patient porteur d'une translocation t(X;2) concerne non seulement la translocation mais aussi la ségrégation XY. *Andrologie* 15: 328-333
30. Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S *et al.* (2006) Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* 21: 1166-71.
31. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111: 297-304
32. Ferfoury F, Clement P, Gomes DM *et al.* (2009) Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertil Steril* 92: 1497 e1-4
33. Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K *et al.* (2009) Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions. *Eur J Hum Genet* 17: 44-50
34. Madan K (1995) Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96: 503-15
35. Calogero AE, Burrello N, De Palma A *et al.* (2003) Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online* 6: 310-7
36. Petit FM, Frydman N, Benkhalifa M *et al.* (2005) Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? *J Androl* 26: 235-41
37. Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I (2002) Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 8: 111-6
38. Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E *et al.* (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346: 1095
39. Rives N, Mousset-Simeon N, Sibert L *et al.* (2004) Chromosome abnormalities of spermatozoa. *Gynecol Obstet Fertil* 32: 771-8
40. Sermon K, Moutou C, Harper J *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV : May-December 2001. *Hum Reprod* 20: 19-34
41. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S *et al.* (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933-43
42. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S *et al.* (1999) Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14: 1717-21
43. Patrat C, Bienvenu T, Janny L *et al.* (2010) Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertil Steril* 93: 822-32
44. Chang PL, Sauer MV, Brown S (1999) Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 14: 2689-94
45. Bienvenu T, Patrat C, McElreavey K *et al.* (2001) Reduction in the DAZ gene copy number in two infertile men with impaired spermatogenesis. *Ann Genet* 44: 125-8
46. Mandon-Pepin B, Touraine P, Kuttann F *et al.* (2008) Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 158: 107-15
47. Faily M, Saitta A, Munoz A *et al.* (2008) DNAI1 mutations explain only 2 % of primary ciliary dyskinesia. *Respiration* 76: 198-204
48. Loges NT, Olbrich H, Fenske L *et al.* (2008) DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Am J Hum Genet* 83: 547-58
49. Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y *et al.* (2002) Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10282-6
50. Faily M, Bartoloni L, Letourneau A *et al.* (2009) Mutations in DNAH5 account for only 15% of a non-preserved cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet* 46: 281-6
51. Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N *et al.* (2007) Sensorineural deafness and male infertility : a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet* 44: 233-40
52. Avidan N, Tamary H, Dgany O *et al.* (2003) CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 11: 497-502
53. Dam AH, Kosciński I, Kremer JA *et al.* (2007) Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 81: 813-20

54. Viville S, Mollard R, Bach ML *et al.* (2000) Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? case report. *Hum Reprod* 15: 2563-6
55. Guthauser B, Vialard F, Dakouane M *et al.* (2006) Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril* 85: 750 e5-750 e7
56. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK *et al.* (2007) Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 39: 661-5
57. Dieterich K, Zouari R, Harbuz R *et al.* (2009) The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes Meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 18: 1301-9
58. Lourenco D, Brauner R, Lin L *et al.* (2009) Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360: 1200-10
59. Claustres M (2005) Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online* 10: 14-41
60. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H *et al.* (2005) Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *Eur J Hum Genet* 13: 336-40
61. Iguchi N, Yang S, Lamb DJ, Hecht NB (2006) An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 43: 382-4
62. Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A *et al.* (2003) Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod* 9: 69-73
63. Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A *et al.* (2005) Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl* 26: 779-86
64. Christensen GL, Ivanov IP, Atkins JF *et al.* (2005) Screening the SPO11 and EIF5A2 genes in a population of infertile men. *Fertil Steril* 84: 758-60
65. Tronchon V, Vialard F, El Sirkasi M *et al.* (2008) Tumor necrosis factor- α -308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility. *Hum Reprod* 23: 2858-66
66. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332: 281-5
67. Omezzine A, Chater S, Mauduit C *et al.* (2003) Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 144: 648-61
68. Plass C (2002) Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 11: 2479-88

N. Thiounn

Diagnostic et prise en charge de l'infertilité masculine

Introduction

La prise en charge de l'infertilité masculine a été transformée depuis une quinzaine d'années par la micro-injection de spermatozoïde dans l'ovocyte (*intra cytoplasmic sperm injection* ou ICSI). L'ICSI permet d'obtenir des grossesses au sein de couples infertiles dans des situations très diverses, à tel point que le diagnostic étiologique de l'infertilité masculine et son éventuel traitement peuvent passer au second plan au profit d'une ICSI systématique (1, 2). Cette évolution caricaturale risquerait à terme d'alourdir l'assistance médicale à la procréation (AMP) et de laisser plus de couples dans l'échec. En effet, dans certains cas, l'amélioration des paramètres spermatiques peut permettre d'éviter l'ICSI et d'avoir recours à des techniques plus simples comme les inséminations intra-utérines (IIU), voire d'obtenir des grossesses naturelles. Lorsque l'ICSI reste nécessaire, l'optimisation des paramètres spermatiques peut améliorer ses résultats ou la rendre réalisable lorsqu'elle était impossible.

L'infertilité masculine doit être évoquée systématiquement chez un couple infertile car elle est présente dans la moitié des cas (3). L'enquête diagnostique comporte un interrogatoire orienté notamment sur les antécédents uro-génitaux, un examen clinique complet portant en particulier sur les testicules et la voie séminale, un ou plusieurs spermogrammes, des dosages hormonaux, parfois une échographie uro-génitale et des explorations génétiques.

La prise en charge de l'infertilité masculine ne peut se concevoir de manière isolée et doit se situer au sein d'un réseau comportant l'urologue, mais également le gynécologue, le biologiste de la reproduction, le radiologue, le généticien, le pathologiste et parfois d'autres spécialistes (anesthésiste, pneumologue) en fonction des pathologies associées. Des réunions de concertation pluridisciplinaire sont souvent indispensables pour assurer une prise en charge cohérente des couples infertiles.

Nous aborderons dans ce chapitre les différentes formes cliniques, leurs diagnostics ainsi que leurs

traitements, selon qu'il s'agisse de pathologies sécrétoires (non obstructives) ou excrétoires (obstructives). Il peut parfois s'agir de formes mixtes avec atteintes sécrétoire et excrétoire sur les deux testicules, voire d'une atteinte sécrétoire d'un côté et excrétoire de l'autre, rendant plus complexe l'étape diagnostique.

Atteintes sécrétoires

Diagnostic

L'atteinte sécrétoire ou testiculaire est soit congénitale soit acquise. Le diagnostic repose sur la présence d'une hypotrophie testiculaire et un taux d'hormone folliculo-stimulante (FSH) élevé. Exceptionnellement, la taille testiculaire peut être normale ainsi que le taux de FSH dans certains cas de blocage tardif de la spermatogenèse.

Les antécédents de cryptorchidie, d'hypospadias ou d'autre anomalie uro-génitale sont évocateurs d'une atteinte congénitale. Les antécédents d'orchite, notamment ourlienne, après la puberté, de cancer avec chimiothérapie, de traumatisme des bourses ou de torsion du cordon spermatique sont également évocateurs d'une atteinte sécrétoire acquise.

L'examen clinique précise le degré d'hypotrophie testiculaire. Le volume normal d'un testicule varie de 15 à 25 mL. Le degré d'hypotrophie peut être corrélé à la sévérité de l'oligospermie. Dans les formes sévères, le volume testiculaire peut être réduit à moins de 3 mL. La consistance du testicule, qui est normalement ferme, peut être molle dans les atteintes sécrétoires. La présence d'une tumeur testiculaire doit être recherchée systématiquement à l'examen clinique et par échographie car elle n'est pas exceptionnelle en cas d'hypotrophie testiculaire (4). La voie séminale est normale (épididymes, déférents). Le reste de l'examen clinique recherche

une varicocèle avec manœuvre de Valsalva en position debout, un hypospadias, un micropénis, et apprécie le niveau d'imprégnation androgénique parfois diminué avec faible pilosité et, dans certains cas, répartition des graisses de type féminin (hanches) évocateur d'un syndrome de Klinefelter. Le *spermogramme* montre au maximum une azoospermie à volume conservé avec parfois présence de cellules germinales. Dans les autres cas, le *spermogramme* montre une oligospermie parfois sévère. L'importance de la nécrospermie, de l'asthénospermie et de la tératospermie doit être précisée. Le test de migration-survie, encore appelé test de sélection des spermatozoïdes mobiles, permet de concentrer les spermatozoïdes mobiles. La tératospermie peut se corriger lors de la sélection, et l'isolement de plus d'un million de spermatozoïdes mobiles permet parfois d'envisager le recours aux IUI en fonction du bilan féminin. Lorsque l'oligospermie est profonde, il est important de savoir si l'ICSI est possible à partir des spermatozoïdes de l'éjaculat. Il faut parfois réaliser une autoconservation de spermatozoïdes préalablement à la tentative d'ICSI, notamment en cas de fortes variations du *spermogramme*.

Les *dosages hormonaux* montrent typiquement une élévation du taux de FSH. Celle-ci est normalement inférieure à 5 UI/L. En cas d'atteinte sécrétoire, le taux s'élève en fonction de la sévérité de l'atteinte et peut atteindre jusqu'à 50 UI/L. Le taux de FSH peut être normal dans certains blocages tardifs de la spermatogenèse. Il est bas, inférieur à 1 UI/L en cas d'insuffisance hypothalamo-hypophysaire. Le taux de LH est généralement voisin de la normale. Il est élevé en cas d'insuffisance endocrine associée (testostérone basse). Il est bas en cas d'insuffisance hypothalamo-hypophysaire. Le taux de testostérone totale, prélevé entre huit et dix heures le matin, est souvent normal, mais il est parfois abaissé dans les atteintes sécrétoires sévères. Le taux d'inhibine B est souvent abaissé.

Sur le plan *génétique*, le caryotype peut montrer des anomalies, la plus fréquente étant le syndrome de Klinefelter XY, mais le syndrome de Turner est parfois présent (XO) et, dans de rares cas, il peut s'agir d'un caryotype féminin XX. D'autres recombinaisons génétiques sont parfois rencontrées. En cas d'azoospermie, il est important de rechercher une microdéletion du chromosome Y qui peut conditionner la probabilité de trouver des spermatozoïdes dans le prélèvement testiculaire. Il est dans tous les cas important de faire part au couple des limites des connaissances médicales sur les anomalies génétiques impliquées dans les atteintes sécrétoires congénitales, qui pourront être transmises à l'enfant, notamment si c'est un garçon. La consultation de conseil génétique est donc parfois nécessaire.

Traitements et prise en charge

Au terme de ces explorations, l'atteinte sécrétoire est confirmée. Certains cas peuvent être traités.

En cas d'*insuffisance hypothalamo-hypophysaire*, il faut éliminer une tumeur de l'hypophyse par une IRM cérébrale. Un traitement de gonadotrophines est proposé (5) pour stimuler les testicules dans leurs fonctions endocrine (testostérone) et exocrine (spermatogenèse). Ce traitement comporte : hCG 1 500 à 3 000 UI en IM deux fois par semaine et FSH 150 UI en IM trois fois par semaine jusqu'au démarrage de la spermatogenèse (pendant 6 à 18 mois), avec contrôle du *spermogramme* tous les trois mois. Il est ainsi possible de stimuler la spermatogenèse et voir apparaître des spermatozoïdes dans l'éjaculat pour envisager selon le résultat une grossesse naturelle ou le recours à une assistance médicale à la procréation, dont le niveau est fonction des résultats obtenus sur le *spermogramme*. Il est à noter qu'en cas de reprise de la spermatogenèse, des grossesses peuvent être obtenues avec des concentrations spermatisques exceptionnellement basses de l'ordre de 2 millions de spermatozoïdes par mL. Il faut en général en profiter pour congeler le sperme. Après avoir obtenu les spermatozoïdes, l'homme peut cesser les gonadotrophines qui nécessitent cinq injections IM par semaine et avoir recours si besoin à un traitement androgénique substitutif par testostérone (une injection par mois), mais le plus souvent avec arrêt de la spermatogenèse.

En cas de *varicocèle* (6-8), pathologie touchant 20 % de la population masculine, le traitement, dont l'efficacité reste discutée, est envisagé dans certains cas. En effet, il existe deux formes cliniques de varicocèle : la varicocèle isolée avec testicules initialement normaux, progressivement dégradés par le reflux veineux spermatique, et la forme associée à une atteinte sécrétoire le plus souvent congénitale avec hypotrophie testiculaire initiale et taux de FSH élevé. Dans la forme isolée, lorsque la varicocèle est bien visible cliniquement et éventuellement bilatérale, avec reflux significatif au doppler, le traitement de cette varicocèle peut permettre d'améliorer le *spermogramme* avec un délai pouvant dépasser trois mois. Des grossesses naturelles sont obtenues dans 30 % des cas ; ces résultats sont fonction de l'amélioration du *spermogramme* et de la situation de la femme (âge, fonction ovarienne et perméabilité tubaire). Ce traitement peut faciliter le recours à l'assistance médicale à la procréation après amélioration du *spermogramme*. Dans les autres cas, ce traitement doit être discuté en fonction des autres possibilités de l'assistance médicale à la procréation, en sachant cependant que le traitement de cette varice peut limiter la poursuite de la dégradation ultérieure de la spermatogenèse et éviter la survenue d'une azoospermie. Dans les cas d'azoospermie sécrétoire associée à une varicocèle, le

traitement préalable de la varicocèle pourrait améliorer la probabilité de trouver des spermatozoïdes lors du prélèvement testiculaire (9).

En cas de *cryptorchidie* non traitée, il faut localiser le ou les testicules cryptorchide(s) cliniquement, par échographie ou par examen tomodensitométrique abdomino-pelvien. Les testicules devront être descendus dans les bourses afin de pouvoir les surveiller en raison de la fréquence plus élevée de tumeurs du testicule chez les hommes cryptorchides. Cette orchidopexie dans les bourses peut parfois permettre ensuite un démarrage de la spermatogenèse et d'obtenir ainsi des spermatozoïdes utilisés généralement dans le cadre de l'ICSI (10).

De façon plus controversée, un traitement par clomifène (11, 12) tamoxifène (13) ou inhibiteurs de l'aromatase (14, 15) peut être proposé dans les atteintes sécrétoires avec FSH normale. Enfin, la stimulation de la spermatogenèse par testostérone donne des résultats très variables : généralement sans effet sur la spermatogenèse, cela peut parfois la stimuler comme cela peut l'arrêter, cette propriété étant notamment utilisée dans un but contraceptif (16, 17).

Les autres traitements, ayant pour but de stimuler la spermatogenèse (antioxydants, L-carnitine), n'ont pas démontré leur efficacité (18, 19).

Enfin, l'état général du patient interfère avec la spermatogenèse. L'obésité ou la maigreur (20, 21), le stress et le surmenage (22), la consommation d'alcool (23) ou d'autres toxiques et notamment l'intoxication tabagique durant la vie fœtale (24) et adulte (25) perturbent la spermatogenèse. Les *règles hygiéno-diététiques* de bon sens doivent être rappelées, et c'est parfois à cette occasion que le tabac peut être arrêté définitivement pour le couple.

En l'absence de traitement ayant pu améliorer la spermatogenèse et en cas d'azoospermie, de nécrospermie totale, ou en présence de très rares spermatozoïdes non utilisables en ICSI, le *prélèvement chirurgical de pulpe testiculaire*, généralement bilatéral, peut permettre d'isoler des spermatozoïdes utilisables en ICSI. Le prélèvement testiculaire percutané à l'aiguille permet plus rarement d'obtenir des spermatozoïdes dans le contexte d'une atteinte sécrétoire que le prélèvement chirurgical (26). Le prélèvement testiculaire chirurgical est ainsi réalisé lorsque le volume testiculaire le permet (testicules de volume supérieur à 5 mL). Il est réalisé le plus souvent au cours d'une brève anesthésie générale. Ce prélèvement de pulpe testiculaire est parfois réalisé à l'aide d'un microscope opératoire, avec un à plusieurs prélèvements par testicule, sans que l'anesthésie soit faite sur la technique opératoire (27). Le contrôle extemporané par un biologiste de la reproduction au bloc opératoire peut permettre d'éviter de prélever le second testicule lorsque des spermatozoïdes ont été détectés sur le premier côté prélevé, qui est de préférence celui du meilleur testicule

(taille, consistance). Une analyse anatomopathologique est systématiquement réalisée sur les fragments de pulpe afin de porter un diagnostic précis : syndrome de cellules de Sertoli seules, arrêt de maturation ou hypospermatogenèse. L'association des trois tableaux peut se voir au sein d'un même testicule donnant un aspect de mosaïque, mais seule l'hypospermatogenèse est compatible avec la possibilité de trouver des spermatozoïdes. Ce prélèvement est le plus souvent réalisé avant la tentative d'ICSI et les spermatozoïdes isolés sont congelés pour une utilisation ultérieure (28). Un prélèvement synchrone à la tentative d'ICSI est parfois réalisé systématiquement par certaines équipes avec un risque de près de 60 % de ne pas trouver de spermatozoïdes et de faire une stimulation ovarienne inutile car sans possibilité d'ICSI. Le prélèvement synchrone est parfois réalisé lorsque l'ICSI est impossible à partir de l'éjaculat et/ou à la décongélation des paillettes ; ces situations doivent être anticipées, le patient étant prêt pour l'intervention (patient à jeun ayant eu une consultation d'anesthésie dans le mois précédant la tentative). La probabilité de trouver des spermatozoïdes dans la pulpe testiculaire varie de 25 à près de 50 % en cas d'azoospermie sécrétoire (29, 30) ; elle est indépendante de la taille des testicules, du taux de FSH et d'inhibine B. Elle est significativement plus faible en cas de microdélétion du chromosome Y, notamment AZF a, de manière moins significative en cas de délétion AZF b ou c (31). Le prélèvement de pulpe testiculaire peut théoriquement aggraver une insuffisance androgénique, ce dont le patient doit être informé, mais en pratique, la diminution de la testostéronémie n'est généralement pas significative après le prélèvement de pulpe (32), surtout si elle était normale avant l'intervention. L'hormonothérapie substitutive peut à l'avenir devenir nécessaire lorsque que la testostéronémie est basse, et ceci même en l'absence de prélèvement testiculaire.

Lorsque le prélèvement testiculaire est négatif, le couple peut choisir une solution alternative : don de spermatozoïdes ou adoption. Il est cependant possible, lorsque le volume testiculaire le permet et avec un taux normal de testostérone, de répéter le prélèvement de pulpe testiculaire (33) avec un délai d'au moins six mois avec une probabilité d'obtenir des spermatozoïdes d'environ 20 %, notamment en cas de discordance entre les résultats anatomopathologiques et ceux de laboratoire de biologie de la reproduction.

Lorsque des spermatozoïdes ont pu être isolés, la probabilité d'obtenir une grossesse par ICSI dans les atteintes sécrétoires est voisine de 20 % par tentative avec un taux de fécondation significativement plus faible qu'en cas d'atteinte obstructive (34). Ainsi, pour l'ensemble de ces couples, moins d'un sur dix pourra obtenir une grossesse.

Atteintes excrétoires

Diagnostic

L'atteinte excrétoire est soit congénitale, soit acquise et le diagnostic repose sur l'association d'un volume testiculaire normal et d'un taux de FSH normal.

Les *antécédents* sont parfois évocateurs : mucoviscidose, infections uro-génitales notamment épididymite et/ou prostatite, cure de hernie inguinale ou autres chirurgies de la voie séminale (vasectomie, exérèse de kyste de l'épididyme).

À l'*examen clinique*, le volume testiculaire est normal avec une bonne consistance du testicule, et la voie séminale peut être anormale avec un nodule ou une dilatation épидидymaire, une dilatation ou une absence des canaux déférents. Le degré d'imprégnation androgénique est normal.

Le *spermogramme* montre généralement une azoospermie et une hypospermie avec un volume spermatique pouvant être inférieur à 2 mL. La biochimie séminale montre une diminution des marqueurs épидидymaires : α 1-4-glucosidase et carnitine. Le fructose est également abaissé ou absent en cas d'atteintes des vésicules séminales et le pH est acide. Les marqueurs prostatiques sont perturbés et le pH alcalin en cas de prostatite chronique. Un taux élevé d'élastase est en faveur de la prostatite chronique, ainsi que la présence d'un taux de leucocytes anormalement élevés (leucospermie). La spermoculture peut montrer des germes responsables de l'infection urogénitale chronique d'autant plus significative qu'il existe une leucospermie. La confrontation de la spermoculture à l'examen cytot bactériologique urinaire sur le premier jet urinaire et en milieu de miction permet de localiser l'origine de l'infection lorsqu'elle est détectée. L'antibiogramme permet au mieux de guider le choix du traitement antibiotique. Les *dosages hormonaux* sont normaux : FSH, LH, testostérone. Les autres dosages hormonaux sont inutiles.

L'*échographie* (35) des bourses permet de confirmer la normalité des testicules (taille et aspect du parenchyme) et peut montrer une dilatation épидидymaire. L'échographie du carrefour uro-génital recherche une anomalie des vésicules séminales (absence notamment en cas d'agénésie déférentielle, ou au contraire dilatation et aspect pseudo-kystique), des canaux éjaculateurs (dilatation, calcifications intracanalaires), de la prostate (volume, aspect du parenchyme, vascularisation, calcifications, kystes centraux müllériens ou latéraux wolffiens pouvant comprimer les canaux éjaculateurs), et de la vessie (résidu postmictionnel). L'échographie des reins peut montrer une agénésie rénale homolatérale à une agénésie déférentielle unilatérale, une polykystose rénale parfois associée

à un aspect polykystique des vésicules séminales, des cavités rénales dilatées et un rein détruit en cas d'abouchement ectopique de l'uretère dans la vésicule séminale, etc. Dans certains cas d'anomalies complexes du carrefour uro-génital, une IRM avec antenne endorectale ou une uréthro-cystoscopie peut permettre un diagnostic plus précis.

En cas d'agénésie bilatérale des canaux déférents, une *enquête génétique* portant sur les éventuelles mutations du gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est indispensable au sein du couple afin de connaître le risque de mucoviscidose chez l'enfant (36). Une consultation de conseil génétique est nécessaire pour informer le couple. En cas de mutation du gène *CFTR* sans mucoviscidose connue, des explorations pneumologiques sont conseillées à la recherche d'une forme fruste de mucoviscidose (test à la sueur, différence de potentiel nasal, tomodensitométrie thoracique recherchant des signes de dilatation des bronches) notamment en cas d'épisodes bronchiques répétés.

Traitements et prise en charge

Le *rétablissement chirurgical de la continuité de la voie séminale* (37) doit être réalisé lorsqu'il est possible.

- *Anastomose épидидymo-déférentielle* en cas d'obstacle épидидymaire avec canal épидидymaire d'amont dilaté et non fibrosé utilisable pour réaliser l'anastomose, ce qui devient rare en pratique en raison du type actuel des infections génitales très fréquentes par *Chlamydiae trachomatis*, qui entraînent une fibrose de l'ensemble de l'épididyme.
- *Vaso-vasostomie* après vasectomie dont le pronostic est lié au délai après vasectomie, la perméabilité déférentielle devenant plus aléatoire dix ans après la vasectomie. Après cette intervention, les spermatozoïdes sont présents dans l'éjaculat dans 70 % des cas et une grossesse naturelle est obtenue dans 50 % des cas.
- *Réparation déférentielle* après lésion iatrogène (cure de hernie par exemple), avec anastomose souvent délicate ou impossible en raison de la rétraction du segment déférentiel d'aval, notamment lorsque la hernie a été opérée dans l'enfance.
- *Résection de la partie distale des canaux éjaculateurs*, d'indication plus discutée en raison du risque d'éjaculation rétrograde et de resténose.

En cas d'intervention chirurgicale réparatrice, il faudra conseiller au patient d'effectuer lors de cette intervention un prélèvement de liquide déférentiel ou épидидymaire, ou de pulpe testiculaire afin de conserver des paillettes de spermatozoïdes utilisables secondairement dans le cadre de l'ICSI en cas d'échec.

Dans certains cas, un *traitement médical* comportant antibiothérapie et traitement anti-inflammatoire

peut améliorer la situation en permettant de traiter médicalement un obstacle infectieux et/ou inflammatoire. Dans les cas de diagnostic incertain ou en cas d'atteinte chronique, l'analyse des avantages potentiels et des inconvénients (effets secondaires) devra être discutée avec le patient.

Lorsqu'il n'a pas été possible de rétablir la continuité de la voie séminale (impossibilité ou échec d'anastomose, agénésie déférentielle), le *prélèvement de spermatozoïdes* est alors réalisé, si cela n'a pas été fait lors de la tentative de réparation de la voie séminale. Il peut s'agir d'un prélèvement déférentiel, épидидymaire ou si besoin, de pulpe testiculaire. Ce prélèvement est réalisé classiquement par voie chirurgicale, le plus souvent au cours d'une brève anesthésie générale. Il est parfois réalisé par ponction percutanée par certaines équipes. L'avantage du prélèvement chirurgical est de permettre un recueil de spermatozoïdes plus important afin de congeler suffisamment de paillettes pour permettre plusieurs tentatives d'ICSI. Dans tous les cas, par souci d'efficacité, un contrôle extemporané de la qualité des prélèvements est souhaitable avec examen au microscope en salle d'opération. Ce contrôle guide l'intervention car il permet de décider d'un prélèvement de pulpe testiculaire lorsque le prélèvement réalisé au niveau de la voie séminale est de qualité insuffisante. En cas de prélèvement de pulpe testiculaire, un contrôle anatomopathologique est souhaitable. Dans certains cas rares de sténose des canaux éjaculateurs, il est parfois possible de réaliser un prélèvement de spermatozoïdes au niveau des vésicules séminales sous contrôle échographique par voie transrectale avec une prémédication antibiotique.

Les résultats de l'ICSI dans les causes excrétoires (38) montrent plus de 25 % de grossesses par tentative. À l'issue des différentes tentatives nécessaires, plus d'un couple sur deux obtient au moins une grossesse.

Autres causes d'infertilité masculine

Anomalies de l'éjaculation

Les anomalies de l'éjaculation peuvent être source d'infertilité.

- L'anéjaculation peut se rencontrer dans un contexte d'anorgasmie. Il s'agit d'une pathologie de la sexualité dont le traitement psycho-sexologique est parfois long et complexe, ne permettant pas toujours une évolution favorable avec restauration de l'orgasme et donc de l'éjaculation. Il est parfois nécessaire d'envisager un prélèvement déférentiel de spermatozoïdes suivi d'une assistance médicale à la procréation.

- Les lésions médullaires (paraplégie, tétraplégie) sont associées à une disparition de l'éjaculation. Ces patients ont le plus souvent des troubles de la miction avec autosondage ou sonde à demeure entraînant une infection chronique du carrefour uro-génital. Lorsque l'éjaculation ne peut être obtenue par électro-stimulation ou par vibromassage, ou en cas d'infection chronique retentissant sur la qualité de l'éjaculat, le prélèvement déférentiel est alors indiqué pour permettre ensuite une assistance médicale à la procréation.
- En cas d'éjaculation rétrograde par trouble de l'innervation du col vésical (neuropathie du diabète, chirurgie rétropéritonéale avec lésion du nerf sympathique), un traitement alpha stimulant peut dans certains cas restaurer une éjaculation antérograde. En cas d'échec et dans les autres cas, notamment en cas d'atteinte du col vésical après résection prostatique, et après confirmation de l'éjaculation rétrograde par la présence de fructose dans l'urine après masturbation, il est parfois possible de recueillir des spermatozoïdes dans l'urine en prévenant le choc osmotique (restriction hydrique et vessie vide) et acide (alcalinisation par bicarbonates). Lorsque les spermatozoïdes ainsi recueillis ne sont pas utilisables, un recueil déférentiel est indiqué.

Dysérection

Les troubles sexuels (désir, érection) sont fréquents en cas d'infertilité. Ces troubles ont très souvent une origine psychogène par dévalorisation personnelle liée à la culpabilité ressentie pour cette infertilité masculine, mais ils peuvent préexister à cette infertilité en cas des causes organiques vasculaires, neurologiques ou par atteinte des corps caverneux (maladie de La Peyronie évoluée par exemple).

Dans la plupart des cas, les traitements médicaux oraux (inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5) ou intracaverneux (prostaglandine E1) permettent de remédier à une insuffisance érectile pour obtenir des rapports sexuels compatibles avec la reproduction.

Dans certains cas réfractaires avec impossibilité d'une pénétration, le recours à l'insémination artificielle peut être proposé.

Conclusion

Le traitement étiologique de l'infertilité masculine reste d'actualité car il peut permettre dans les meilleurs cas de simplifier la prise en charge du couple sans recourir à l'ICSI, mais il peut également permettre de rendre possible l'ICSI et d'en améliorer les résultats par une optimisation de la qualité du sperme.

Seule cette démarche diagnostique associée à une recherche clinique et plus fondamentale permettra de mieux comprendre et de mieux traiter les différentes causes d'infertilité masculine.

Références

- Devroey P, Vandergorst M, Nagy P, Van Steirteghem A (1998) Do we treat the male or his gamete? *Hum Reprod* 13 (Suppl 1): 178-85
- Alukal JP, Lipshultz LI (2009) Why treat the male in the era of assisted reproduction? *Semin Reprod Med* 27: 109-14
- Irvine DS (1998) Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 13 (Suppl 1): 33-44
- Peng X, Zeng X, Peng S, Deng D, Zhang J (2009) The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review. *PLoS One* 4: e5591
- Ascoli P, Cavagnini F (2006) Hypopituitarism. *Pituitary* 9: 335-42
- Zini A, Boman JM (2009) Varicocele: red flag or red herring? *Semin Reprod Med* 27: 171-8
- Evers JH, Collins J, Clarke J (2008) Surgery or embolisation for varicoceles in subfertile men. *Cochrane Database Syst Rev* 16: CD000479
- Meng MV, Greene KL, Turek PJ (2005) Surgery or assisted reproduction? A decision analysis of treatment costs in male infertility. *J Urol* 174: 1926-31
- Inci K, Hascicek M, Kara O *et al.* (2009) Sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection in men with nonobstructive azoospermia, and treated and untreated varicocele. *J Urol* 182: 1500-5
- Lin YM, Hsu CC, Wu MH, Lin JS (2001) Successful testicular sperm extraction and paternity in an azoospermic man after bilateral postpubertal orchiopexy. *Urology* 57: 365
- Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Niederberger C (2005) Clomiphene administration for cases of nonobstructive azoospermia: a multicenter study. *J Androl* 26: 787-91
- Pasqualotto FF, Fonseca GP, Pasqualotto EB (2008) Azoospermia after treatment with clomiphene citrate in patients with oligospermia. *Fertil Steril* 90:2014.e11-2
- Kadioglu TC (2009) Oral tamoxifen citrate treatment is more effective in normogonadotropic patients who have follicle-stimulating hormone levels within the lower half of normal. *Int Urol Nephrol* 21
- Patry G, Jarvi K, Grober ED, Lo KC (2009) Use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility. *Fertil Steril* 92:829.e1-2
- Lombardo F, Sgrò P, Salacone P *et al.* (2005) Androgens and fertility. *J Endocrinol Invest* 28 (3 Suppl): 51-5
- Kumar R, Gautam G, Gupta NP (2006) Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J Urol* 176: 1307-12
- Madhukar D, Rajender S (2009) Hormonal treatment of male infertility: promises and pitfalls. *J Androl* 30: 95-112
- Ghanem H, Shamloul R (2009) An evidence-based perspective to the medical treatment of male infertility: a short review. *Urol Int* 82:125-9
- Tunc O, Thompson J, Tremellen K (2009) Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 18: 761-8
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM *et al.* (2008) Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril* 90: 346-51
- Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N *et al.* (2004) Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 82: 863-70
- Collodel G, Moretti E, Fontani V *et al.* (2008) Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian J Med Res* 128: 254-61
- Muthusami KR, Chinnaswamy P (2005) Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 84: 919-24
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L *et al.* (2007) Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 165: 1372-9
- de Mouzon J, Spira A, Schwartz D (1988) A prospective study of the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 17: 378-84
- El-Haggar S, Mostafa T, Abdel Nasser T *et al.* (2008) Fine needle aspiration vs. mTESE in non-obstructive azoospermia. *Int J Androl* 31: 595-601
- Donoso P, Tournaye H, Devroey P (2007) Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update* 13: 539-49
- Verheyen G, Vernaëve V, Van Landuyt L *et al.* (2004) Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod* 19: 2822-30
- Hibi H, Ohori T, Yamada Y *et al.* (2005) Probability of sperm recovery in non-obstructive azoospermic patients presenting with testes volume less than 10 mL/FSH level exceeding 20 mIU/mL. *Arch Androl* 51: 225-31
- Seo JT, Ko WJ (2001) Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 24: 306-10
- Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F (2007) Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J* Fall 4: 192-206
- Komori K, Tsujimura A, Miura H *et al.* (2004) Serial follow-up study of serum testosterone and antisperm antibodies in patients with non-obstructive azoospermia after conventional or microdissection testicular sperm extraction. *Int J Androl* 27: 32-6
- Vernaëve V, Verheyen G, Goossens A *et al.* (2006) How successful is repeat testicular sperm extraction in patients with azoospermia? *Hum Reprod* 21: 1551-4
- Ghanem M, Bakr NI, Elgayaar MA *et al.* (2005) Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a report of case series and meta-analysis. *Int J Androl* 28: 16-21
- Cornud F, Amar E, Hamida K (2000) Imaging in male hypofertility and impotence. *BJU Int* 86 (Suppl 1): 153-63
- Stuhrmann M, Dörk T (2000) CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia* 32: 71-83
- Lee R, Li PS, Goldstein M *et al.* (2008) A decision analysis of treatments for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 23: 2043-9
- Tournaye H, Merdad T, Silber S *et al.* (1999) No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 14: 90-5

M.-L. Camp, L. Hesters
et N. Frydman

Diagnostic génétique préimplantatoire

Introduction

Technique récente, autorisée depuis moins de dix ans en France, le diagnostic préimplantatoire (DPI) appartient à un domaine en pleine évolution. Il est au centre de nombreuses interrogations d'origines éthiques, juridiques ou scientifiques. En effet, son activité interpelle aussi bien les pouvoirs publics, pour preuve l'étude de législation comparée d'octobre 2008 sur le DPI réalisée par les services juridiques du Sénat, que la communauté scientifique qui ne cesse de réévaluer ses pratiques. Le dernier rapport de l'ESHRE (1) réanalyse ainsi les données de l'ensemble des centres participant au consortium européen pour l'année 2006. Cette analyse transversale permet de faire partager la mise au point de nouveaux diagnostics, de nouvelles connaissances et de tenir un registre détaillé des activités de DPI à l'échelle européenne.

Par ailleurs, le DPI a beaucoup bénéficié des avancées technologiques en aide médicale à la procréation (AMP) et en génétique moléculaire de ces dernières années, ne cessant d'augmenter ses performances techniques. Celles-ci au premier abord sembleraient presque sans limite.

Brièvement, le DPI permet de déterminer le statut génétique d'un embryon obtenu par fécondation *in vitro* avant son transfert dans l'utérus. Ce diagnostic est indiqué en cas d'anomalies chromosomiques de structure ou de nombre et de maladies monogéniques responsables de pathologies reconnues comme d'une particulière gravité pour l'enfant à naître et incurable au moment du diagnostic. Il consiste à prélever un ou deux blastomères au 3^e jour du développement embryonnaire. Les blastomères sont ensuite analysés par des techniques d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) pour les indications chromosomiques et par biologie moléculaire pour les maladies monogéniques. Seuls les embryons indemnes pour l'anomalie recherchée sont transférés.

Il représente une véritable alternative au diagnostic prénatal et à l'interruption médicale de grossesse pour des couples dont l'histoire médicale a souvent été douloureuse : fausses couches à répétition, infertilité inexpiquée ou naissance d'un enfant gravement malade ou handicapé.

Il nécessite une importante mobilisation des équipes engagées dans sa réalisation ainsi qu'une coordination parfaite de ses acteurs. Il demande également une très grande disponibilité de la part des patients. Il s'agit donc d'une démarche relativement complexe mais dont les enjeux et les résultats sont vecteurs d'espoirs.

Contexte historique, scientifique et juridique du DPI

Historique

Les débuts du DPI en France ont été assez controversés. Alors que depuis 1990 il était autorisé en Angleterre, le Comité consultatif national d'éthique a poursuivi un moratoire sur le cadre éthique du DPI de 1986 à 1992, date à laquelle la loi autorisant le DPI a été votée par les députés. Cette loi n'a été approuvée qu'en juillet 1994 par les sénateurs et ce n'est qu'en 1998 que les décrets d'applications sont enfin parus. En 1999, ont alors été délivrés les agréments aux deux premiers centres autorisés pour la pratique du DPI : Paris (regroupant les hôpitaux Antoine Béchère et Necker) et le Centre hospitalier universitaire (CHU) de Strasbourg. Leur activité a débuté en 2000. Ils ont été rejoints en 2003 par le CHU de Montpellier.

C'est en 2000 qu'est né le premier enfant issu de DPI en France. Celui-ci avait été réalisé chez un couple dont la femme était porteuse d'un déficit en ornithine transcarbamylase, transmis selon un mode dominant lié à l'X mais de pénétrance variable (2). Ce déficit est à l'origine d'un coma hyperammonémique néonatal très grave chez les garçons et d'une symptomatologie variable chez les filles.

État des lieux

Actuellement, selon les dernières données de l'*European Society of Human Reproduction and Embryology* (1), plus de 57 centres dans le monde

sont habilités pour la pratique du DPI. Ces données ne reprennent que les activités des membres de l'ESHRE, celles-ci sont donc certainement sous-estimées par rapport à la réalité. Il existe une augmentation croissante du nombre de centres de DPI, d'actes et donc de grossesses obtenues. Et à cette activité croissante est corrélé un élargissement des indications.

Ainsi, dans certains pays comme la Belgique, le « Preimplantation Genetic Screening » ou PGS est pratiqué depuis une dizaine d'années. Il est indiqué chez des couples « à risque » d'obtenir des embryons porteurs d'aneuploidies dans les indications suivantes :

- âge maternel élevé ;
- antécédents de fausses couches à répétition ;
- échecs répétés d'implantation.

Comme pour le DPI, les embryons obtenus par ICSI (injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde) sont biopsiés au 3^e jour de développement et analysés par hybridation *in situ*. Un nombre prédéfini de chromosomes est analysé : ce sont le plus souvent les chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X et Y. Cette technique semblerait augmenter les taux d'implantation (3). Mais des études récentes remettent en cause son efficacité et ne montrent pas d'augmentation significative des taux de naissances vivantes après sélection des embryons chromosomiquement « normaux » (4, 5).

À cette nouvelle indication définie comme « scientifiquement justifiée » par les centres qui le pratiquent, se sont ajoutées des indications encore plus discutables telles que le « sexage social » qui permet de choisir le sexe de l'enfant pour convenances personnelles.

Cadre légal

Ces activités sont encadrées de manières très différentes d'un pays à l'autre, suivant la mise en place ou non d'instances directives. Du libéralisme extrême des États-Unis à l'interdiction de l'Allemagne, de la Suisse, de l'Autriche ou de l'Italie, chaque pays a défini ses propres règles régissant la pratique du DPI.

En France, son régime juridique est défini par deux lois : la loi du 29 juillet 1994 « relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal » et la loi du 6 août 2004 « relative à la bioéthique ». La première a légalisé la pratique du DPI et la seconde a précisé les circonstances dans lesquelles il peut être mis en œuvre tout en les élargissant. Actuellement, le DPI est autorisé « à titre exceptionnel, lorsque le couple a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière

gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic ». Sa pratique est depuis 2005 contrôlée par l'Agence de la biomédecine (ABM).

Indications du DPI

Le DPI est indiqué dans deux types de situations en France :

- pour éviter la transmission à l'enfant d'une maladie génétique d'une particulière gravité. Il s'agit soit de maladies monogéniques dont la mutation est bien connue et identifiable par biologie moléculaire, soit de maladies dont la transmission est liée au sexe pour lesquelles une FISH est réalisée pour déterminer le sexe gonosomique de l'embryon ;
- pour éviter la transmission d'un déséquilibre chromosomique en rapport avec une anomalie de structure équilibrée ou de nombre chez l'un des deux membres du couple.

Dans tous les cas, seule l'anomalie responsable est recherchée, après avoir été préalablement identifiée chez les parents ou les ascendants proches, et le consentement écrit du couple doit être recueilli.

Maladies monogéniques

Les trois maladies les plus fréquemment analysées représentent plus de 45 % des indications de biologie moléculaire dans notre centre. Il s'agit des pathologies suivantes.

- La *dystrophie myotonique de Steinert* – atteinte polymorphe caractérisée en premier lieu par une faiblesse musculaire axiale et distale, ainsi que des troubles du rythme et de la conduction cardiaque. Sa transmission se fait selon un mode autosomique dominant avec anticipation : son expression tend à s'aggraver et à apparaître plus précocement avec les générations. Cette expression est fonction du nombre de répétition de triplets CTG sur le gène codant pour la myotonine (*DMPK*), qui peuvent s'amplifier lors de la transmission parent-enfant. Il est donc très difficile de prédire la sévérité potentielle de la maladie chez un enfant recevant ces répétitions de l'un de ses parents. Lors du DPI, l'analyse en biologie moléculaire combine l'étude des triplets à celle de marqueurs indirects associés au gène *DMPK* (6).
- Le *syndrome de l'X fragile* – étiologie monogénique la plus fréquemment impliquée dans les retards mentaux. Ce syndrome associe un retard mental, des particularités physiques (visage allongé, hyperlaxité ligamentaire) et une macro-orchidie chez le garçon. Son expression est variable chez la fille. De transmission domi-

nante liée à l'X, il s'agit également d'une maladie caractérisée par une expansion anormale de triplets CGG situés dans la région 5' du gène codant pour la protéine FMR. En fonction du nombre de répétitions, on peut distinguer des sujets sains (6 à 50 répétitions), des sujets vecteurs d'une prémutation (50 à 200 répétitions) et des sujets malades porteurs d'une mutation complète (plus de 200 mutations). L'analyse en biologie moléculaire associe l'étude de ces triplets à celle de marqueurs indirects du gène FMR, ainsi que l'analyse du gène de l'amélogénine qui permet un diagnostic de sexe simultané (7). Seuls les embryons masculins sains et féminins non vecteurs sont transférés.

- La *mucoviscidose* : il a été décrit plus de 1 500 mutations différentes de la protéine CFTR, mais en France la mutation $\Delta F508$ représente près de 75 % des cas. De transmission autosomique récessive, cette maladie se caractérise par des atteintes respiratoires et digestives. Et dans 98 % des cas, il existe une stérilité masculine obstructive en rapport avec une agénésie bilatérale des canaux déférents. Son diagnostic en DPI se fait par l'étude conjointe de la mutation préalablement identifiée et de marqueurs indirects associés au gène *CFTR*.

Indications cytogénétiques

Deux types d'anomalies sont actuellement analysés : d'une part, les anomalies de structure, les plus fréquentes, d'autre part, les anomalies de nombre, en rapport avec une suspicion de mosaïcisme germinale pour la trisomie 21. Aux indications purement cytogénétiques, s'ajoutent les diagnostics de sexe réalisés par FISH dans le cadre de maladies monogéniques de transmission liées à l'X dont le diagnostic spécifique n'est pas réalisable.

Parmi les anomalies de structure représentant près de 85 % des indications en cytogénétique, trois indications principales sont reconnues.

Translocations robertsoniennes

Elles ont lieu entre chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) et sont responsables de la perte des bras courts des chromosomes transloqués suite à la fusion de ces chromosomes. La formation d'un trivalent en méiose (fig. 1) est à l'origine de malségrégations dont sont issus des gamètes nullosomiques ou disomiques, qui seront responsables de la formation d'embryons monosomiques ou trisomiques.

Le DPI permet alors de sélectionner les embryons équilibrés, qu'ils soient porteurs de la translocation

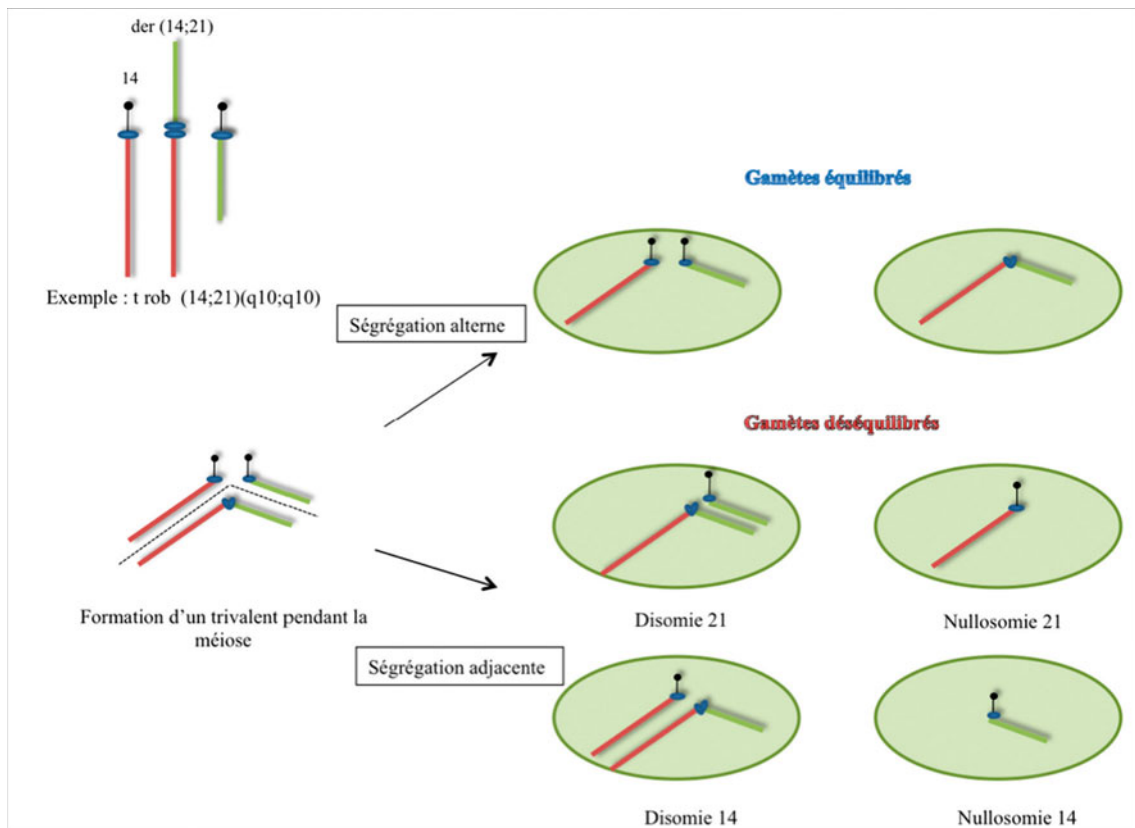


Fig. 1 – Gamètes obtenus lors des différentes ségrégations méiotiques d'une translocation robertsonienne.

ou non. Il s'agit d'une véritable solution aux problèmes d'infertilité des parents porteurs de cette anomalie. Keymolen *et al.*, en 2009, rapportent ainsi un taux de naissances vivantes par cycle de 20,2 % lorsqu'un diagnostic préimplantatoire est réalisé chez un couple porteur d'une translocation robertsonienne (8).

Translocations réciproques

Elles correspondent à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes. Elles sont responsables comme pour les translocations réciproques de troubles de la fertilité se traduisant par des fausses couches à répétition chez la femme ou une oligospermie, voire une azoospermie chez l'homme. En effet, leur présence en méiose impose la formation d'un quadrivalent (fig. 2) à l'origine de la formation de gamètes déséquilibrés. Le DPI permet en sélectionnant les embryons équilibrés de réduire le nombre de fausses couches, tout en augmentant les taux d'implantation et de grossesses chez les couples porteurs de telles anomalies (9).

Inversions péricentriques

Il s'agit de remaniements équilibrés faisant suite à deux cassures sur les deux bras d'un même chromosome entraînant au moment de la méiose des difficultés d'appariement. La survenue d'une recombinaison dans le segment inversé entraîne la formation de gamètes anormaux par duplication/déficiences (fig. 3). Il s'agit d'une indication également reconnue en DPI (10).

Évolution récente des indications

Depuis 2004, le DPI peut aussi être conduit « à titre expérimental » afin de sélectionner des embryons sains immunocompatibles avec un frère, ou une sœur, déjà né atteint d'une maladie génétique affectant le système immunitaire ou l'hématopoïèse. Le DPI est indiqué en l'absence de donneurs de moelle HLA compatible, l'objectif étant de récupérer à la naissance du second enfant, les cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon pour permettre la greffe du premier.

Preuve d'une évolution constante des pratiques, l'ABM a étendu en 2008 le recours au DPI à la détermination des formes héréditaires des cancers les plus graves, décision transitoire jusqu'à la révision de la loi de bioéthique prévue courant 2010.

Principes techniques du DPI

De nombreux centres dans le monde pratiquent le DPI en suivant les mêmes étapes. Mais les techni-

ques et méthodes utilisées ne sont pas strictement identiques d'une équipe à une autre et sont toujours en cours d'évaluation.

Un choix consensuel : l'ICSI

Les embryons sont obtenus par injection intracytoplasmique de spermatozoïde ou ICSI (fig. 4). Cette pratique est la plus répandue, car elle permet d'éliminer les risques de contamination liés à la présence de cellules de la granulosa ou de spermatozoïdes sur la zone pellucide.

Elle est utilisée dans toutes les indications : anomalie chromosomique, maladie monogénique ou même screening d'aneuploïdie (1).

Biopsie

Il existe plusieurs écoles concernant le jour et la technique de biopsie. Concernant le moment de la biopsie, la méthode la plus usuelle est de prélever un à deux blastomères au 3^e jour du développement, lorsque l'embryon présente huit cellules (fig. 5).

Certaines équipes (11) ont proposé cependant une biopsie d'embryon au stade de blastocyste. La biopsie a été réalisée au niveau du trophoblaste (fig. 6), cinq cellules au moins ont pu être prélevées sans porter atteinte à la masse cellulaire interne de l'embryon. Cette technique nécessite de réaliser une ouverture dans la zone pellucide à j3 pour laisser s'expandre à l'extérieur le trophoctoderme, afin qu'il soit facilement accessible à j5. Les auteurs ont rapporté une augmentation du taux d'implantation tout en réduisant le nombre de grossesses multiples.

L'hypothèse serait que le blastocyste serait plus apte à reprendre son développement que l'embryon clivé à j3, ce qui favoriserait le transfert mono-embryonnaire. Cette expansion non physiologique laisse tout de même certaines questions en suspens.

Les techniques de biopsie ne sont pas non plus consensuelles. L'ouverture dans la zone pellucide peut se faire par action mécanique, physique avec un laser ou chimique par la mise en contact avec une solution acide. Les blastomères sont traditionnellement aspirés à travers cette ouverture. Mais certains, comme l'équipe de Wang *et al.* (12), ont proposé d'introduire la pipette dans la zone pellucide pour repousser le blastomère à l'extérieur (fig. 7).

Cette méthode aurait pour avantage de diminuer le contact du blastomère avec la pipette (diminution du risque d'altération de la cellule) et de minimiser les effets de la biopsie, ce qui se traduirait par une augmentation des taux d'implantation.

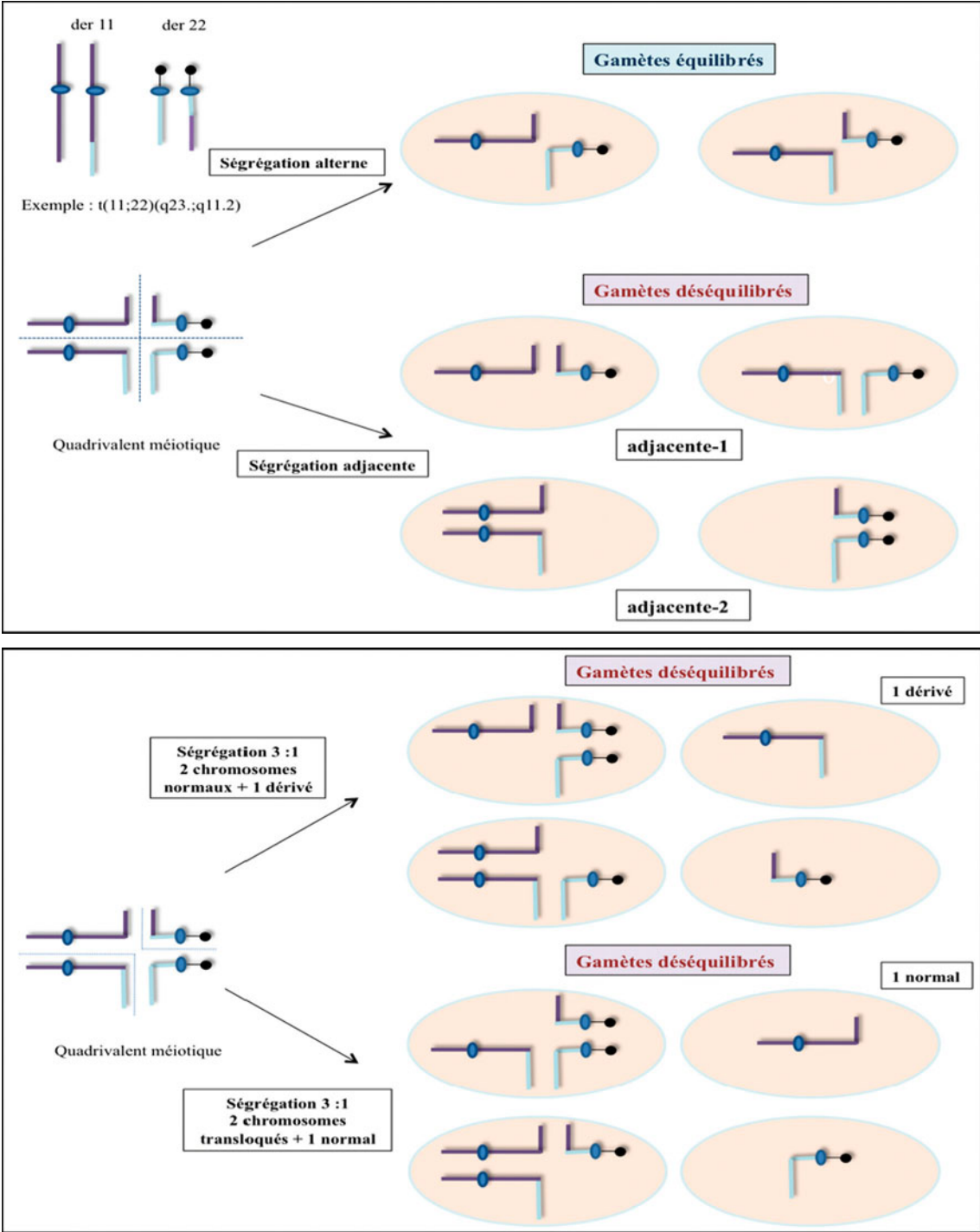


Fig. 2 – Ségrégation méiotique d'une translocation réciproque, A : ségrégation alterne et adjacente ; B : ségrégation 3 : 1.

Analyse cytogénétique et moléculaire

Diagnostic moléculaire

Il repose sur le principe de la PCR (*polymerase chain reaction*) qui permet d'amplifier une quantité

minime d'ADN de manière exponentielle à partir de deux amorces situées de part et d'autre de la région à amplifier. Les premières PCR sur cellule unique datent de 1988 (13), suivies en 1990 des premiers DPI par analyse moléculaire (14).

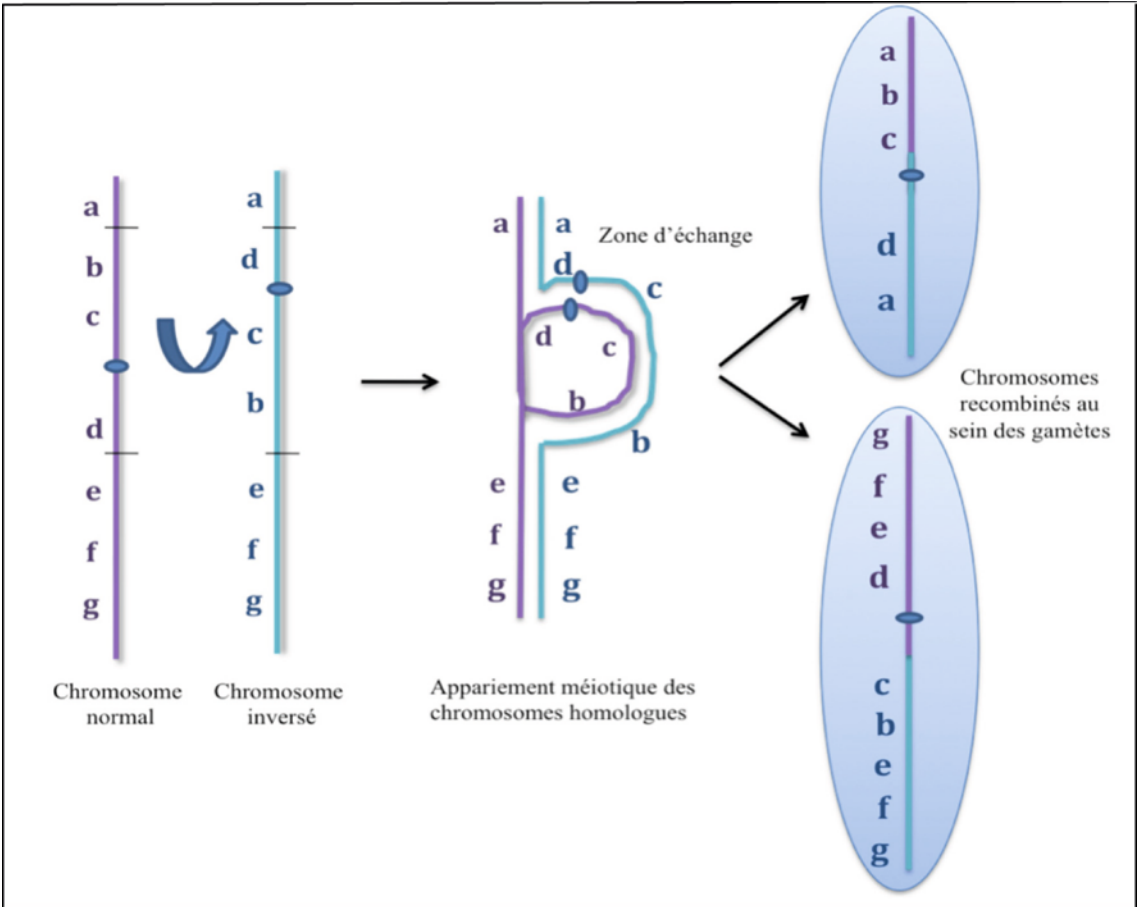


Fig. 3 – Formation de gamètes déséquilibrés par recombinaison méiotique lors d’une inversion péricentrique.

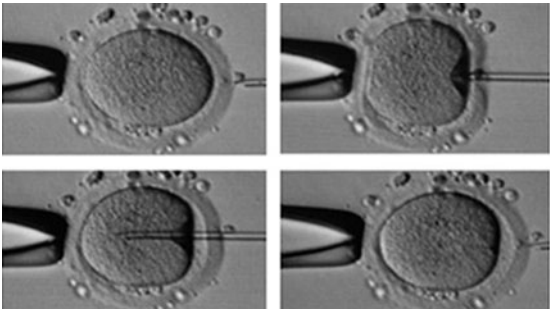


Fig. 4 – Technique d’ICSI.



Fig. 5 – Biopsie d’un embryon à j3 de son développement par aspiration.

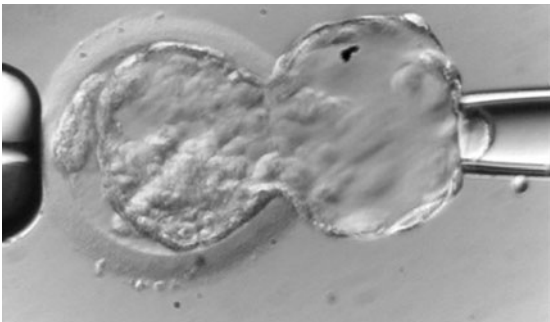


Fig. 6 – Biopsie de trophoblaste.



Fig. 7 – Biopsie d’un embryon à j3 de son développement par refoulement selon Wang *et al.* (12).

Il existe deux méthodes diagnostiques le plus souvent combinées permettant d'analyser l'ADN amplifié : une méthode directe et une méthode indirecte.

- Le *diagnostic direct* consiste à amplifier la mutation pour la mettre secondairement en évidence :
 - dans le cas des insertions ou des délétions, on peut utiliser la migration sur gel d'acrylamide qui montre des modifications de taille des fragments d'ADN ;
 - une digestion par une enzyme de restriction peut être utilisée si la mutation crée ou supprime un site de restriction ;
 - l'amplification à l'aide d'amorces spécifiques ou ARMS (*amplification refractory mutation system*) est utilisée pour la détection de certaines mutations du gène ;
 - les méthodes sont multiples et très dépendantes du type de mutation mais aussi des habitudes du centre. Dans notre centre, nous utilisons deux protocoles différents :
 - d'une part, la *PCR nichée* : elle permet de faire un nombre de cycles important tout en restant dans des conditions de réaction optimales. Le fait d'utiliser un couple d'amorces internes pour la 2^e réaction, par rapport au premier couple d'amorces externes, évite de générer des quantités massives d'ADN cible susceptible d'engendrer des contaminations. En effet, le produit d'amplification final, plus petit, ne contient pas la séquence des amorces initiales et ne peut donc pas être amplifié lors de la première PCR. Comme peu de cycles sont pratiqués lors de la deuxième PCR, seule une contamination massive est capable de générer un produit d'amplification final en quantité suffisante pour fausser le diagnostic. Elle est combinée à la migration sur gel d'acrylamide (2, 15) ;
 - d'autre part, la *PCR fluorescente* : cette technique dérivée du séquençage du génome permet de détecter des molécules fluorescentes attachées à l'une des amorces. On estime que la détection en fluorescence est près de 1 000 fois plus sensible que celle obtenue par révélation au bromure d'éthidium. On effectue 34 à 40 cycles de PCR pour générer, à partir d'une seule cellule, un nombre de molécules d'ADN suffisant pour être analysé par un séquenceur automatique (16).
- Le *diagnostic indirect* est souvent combiné au diagnostic direct. Mais il permet également la réalisation du DPI lorsque la détection directe de la mutation est impossible. Il repose sur l'analyse simultanée de plusieurs marqueurs polymorphes associés à la région étudiée. Ce sont le plus souvent des microsatellites ou STR (*simple tandem repeat*) qui sont étudiés. Il a beaucoup bénéficié des avancées en biologie moléculaire et notamment de la

PCR multiplex qui permet de coamplifier plusieurs fragments d'ADN marqués par des sondes fluorescentes différentes. Cette technique est particulièrement utilisée dans des maladies comme la mucoviscidose, où il existe une très grande variété de mutations (17) et où un diagnostic spécifique par mutation est irréalisable.

Diagnostic cytogénétique

Il repose sur la FISH (hybridation *in situ* avec sondes d'ADN fluorescentes) dont le principe est l'hybridation d'une sonde (fragment d'ADN) marquée par un fluorochrome, avec l'ADN des chromosomes interphasiques dénaturés. Ces sondes sont spécifiques de certaines régions chromosomiques. La visualisation d'un signal fluorescent au microscope à épifluorescence signe la présence du fragment chromosomique étudié. Il est possible grâce à l'utilisation de sondes marquées de fluorochromes différents d'étudier simultanément plusieurs régions chromosomiques. Pour les translocations robertsoniennes deux sondes télomériques spécifiques des bras longs des chromosomes acrocentriques (13-15, 21, 22) ont été utilisées. Pour les translocations réciproques, trois sondes télomériques spécifiques des chromosomes impliqués dans le remaniement, dont deux sondes situées sur les bras transloqués, ont été utilisées. Pour le diagnostic de sexe, ce sont des sondes centromériques spécifiques du X et du Y qui ont été utilisées. Ce système de marquage permet d'étudier l'ensemble des ségrégations possibles au cours de la méiose, mais n'expliquent pas toujours la totalité des anomalies, où notamment les événements secondaires comme les *crossing-over* ou les pertes chromosomiques sont difficiles à appréhender.

Ainsi dans le cas d'une translocation robertsonienne t rob (14, 21) portée par l'un des membres du couple, plusieurs types d'embryons sont observés en fonction du statut des gamètes (fig. 8 et 9). En cas de translocations réciproques de nombreux schémas de ségrégations sont possibles. Pour exemple dans le cas d'une translocation réciproque t (11, 22) (q23 ; q11,2) portée par l'un des membres du couple (fig. 10 et 11).

Questions encore non résolues

Effets de la biopsie

Les effets de la biopsie sur le développement ultérieur de l'embryon ont toujours été très discutés. Dès la mise en place du DPI, des études se

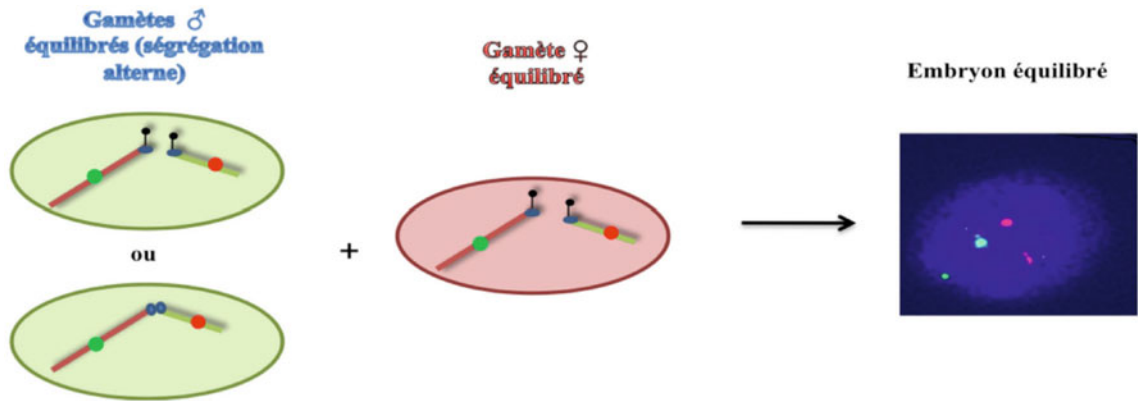


Fig. 8 – Gamètes et embryon en cas de ségrégation alterne d'une translocation robertsonienne.

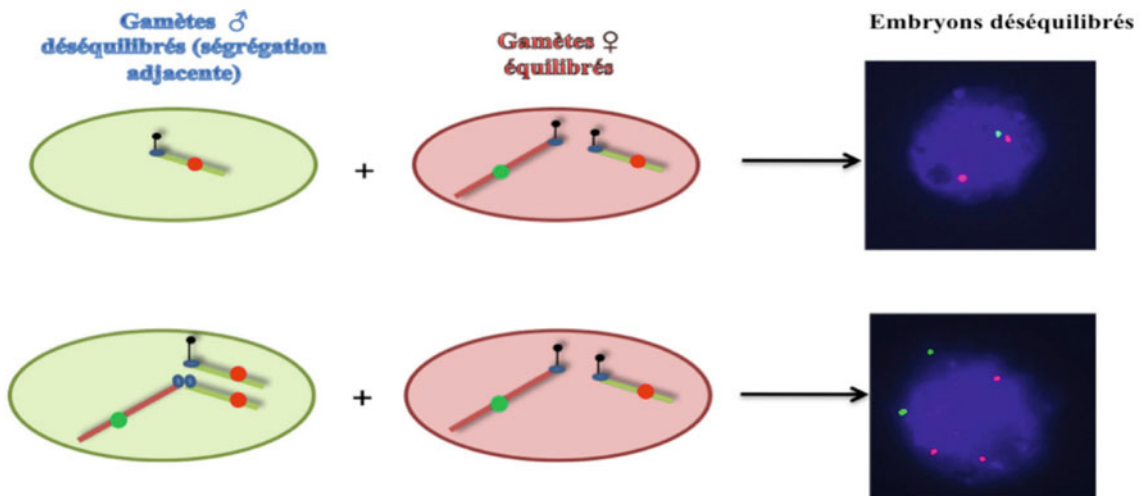


Fig. 9 – Gamètes et embryons en cas de ségrégation adjacente d'une translocation robertsonienne.

sont attachées à mettre en évidence ceux-ci sur le développement embryonnaire, aussi bien chez la souris que chez l'homme. Les résultats ont été controversés. Somers *et al.* ont montré qu'il y avait une réduction du ratio masse cellulaire interne/trophectoderme sur les embryons biopsiés (18). Tandis que Hardy *et al.* ont rapporté qu'il n'y avait aucun effet de la biopsie sur le métabolisme ou le ratio masse cellulaire interne/trophectoderme des embryons (19). Malheureusement, aucune de ces études n'abordaient les capacités d'implantation et de viabilité de l'embryon. Les discussions se sont poursuivies avec le développement du PGS. Les études publiées ont permis de comparer les taux d'implantation, de grossesses cliniques et de naissances dans deux groupes : l'un avec PGS et l'autre sans. Elles ont comparé des transferts d'embryons biopsiés ou non biopsiés. Staessen *et al.* ont montré qu'il n'y avait aucun effet significatif de la biopsie sur l'implantation (20). Cependant, cette équipe a obtenu moins de naissances dans le groupe PGS.

Plus récemment, Mastenbroek *et al.* (4) et Hardarson *et al.* (21) ont montré qu'il y avait un effet délétère de la biopsie en réduisant le nombre de grossesses cliniques dans le groupe PGS.

Nombre de blastomères biopsiés

Le nombre de blastomères à biopsier est aussi un sujet largement discuté. Certaines études ont montré qu'il n'y avait pas de différence concernant le taux d'implantation suivant le nombre de blastomères biopsiés. Pour Van de Velde *et al.*, il n'y a pas eu d'impact du nombre de blastomères prélevés sur les taux d'implantation, de β HCG ou de naissances vivantes (22). Ce sont essentiellement les critères morphologiques de l'embryon avant la biopsie qui étaient prédictifs de ses capacités d'implantation. Les auteurs ont recommandé ainsi de biopsier de manière systématique deux blastomères pour assurer une fiabilité diagnostique.

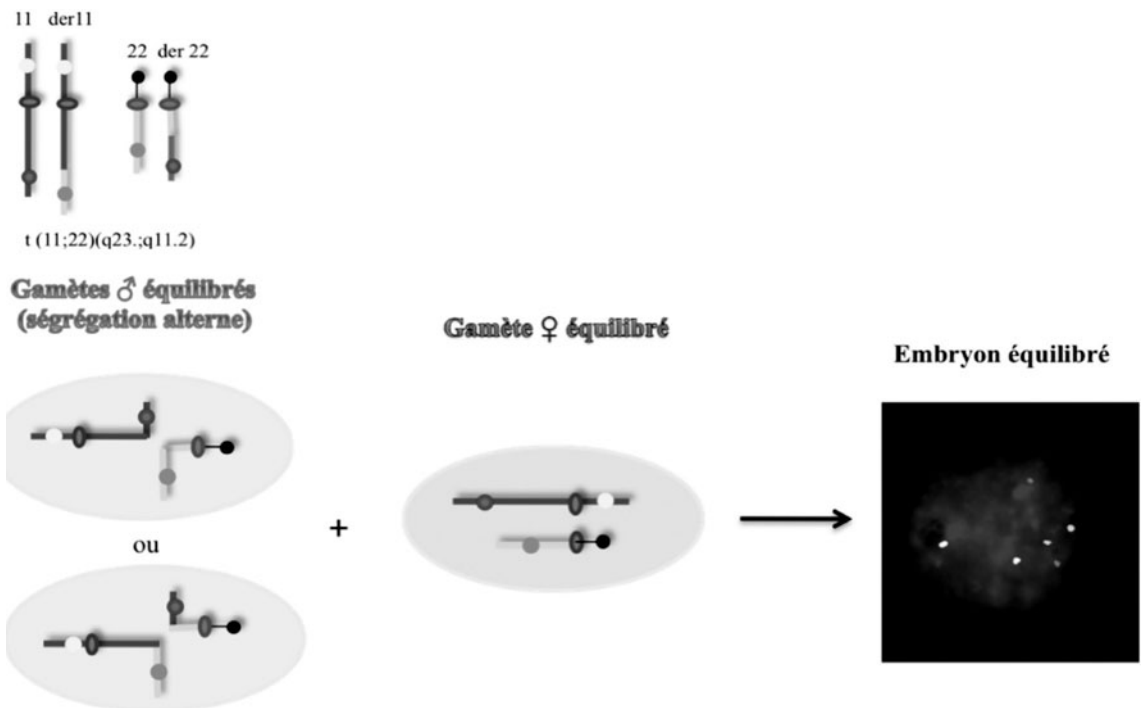


Fig. 10 – Gamètes et embryons en cas de ségrégation alterne d’une translocation réciproque.

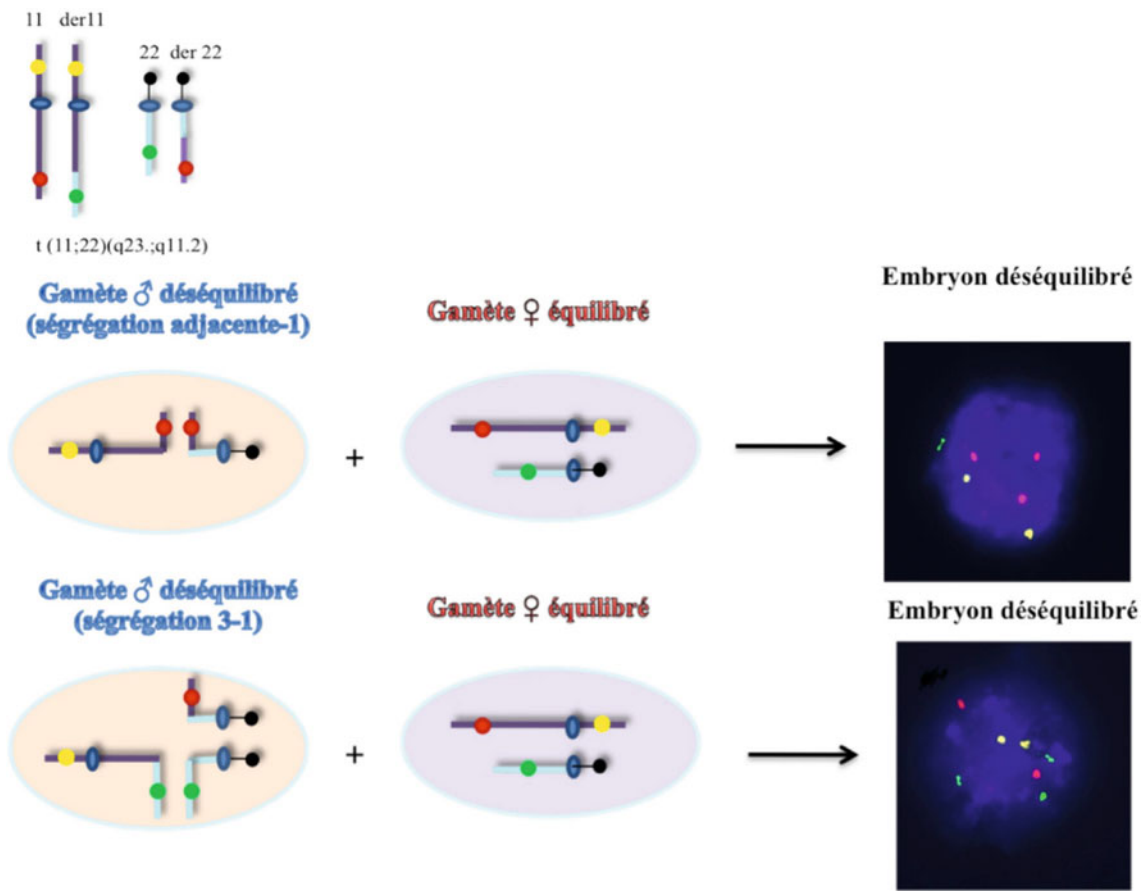


Fig. 11 – Gamètes et embryons en cas de ségrégation adjacente et 3-1 d’une translocation réciproque.

En 2008, Goossens *et al.* ont montré qu'il y avait un bénéfice pour l'embryon à ne biopsier qu'une seule cellule (23). La biopsie d'un blastomère serait en effet associée à un taux de blastulation plus élevé. Par ailleurs, l'efficacité diagnostique serait conservée pour les indications de *screening* d'anéuploidies et de diagnostic de sexe.

Depuis la mise en place du DPI dans notre centre, deux blastomères ont systématiquement été biopsiés. Au regard des résultats de Goossens, il semblerait licite d'envisager la biopsie d'un seul blastomère dans l'objectif d'augmenter le potentiel de développement des embryons biopsiés. Cependant, cette politique de biopsie ne doit pas être à l'origine d'une diminution de la réussite du diagnostic car elle aboutirait à une diminution du nombre d'embryons potentiellement transférables. De plus, elle ne doit pas non plus être responsable de la survenue de faux diagnostics négatifs.

Conclusion

Les couples qui sont pris en charge en DPI sont confrontés aux mêmes difficultés que ceux participant à un démarche d'AMP : traitements contraignants, effets secondaires, suivi clinico-biologique imposant une grande disponibilité, risques d'échecs de la tentative.

De plus, la réalisation d'un diagnostic préimplantaire est une source de difficultés supplémentaires.

- L'accès aux soins est limité. Peu de centres, seulement trois en France, sont autorisés à réaliser un DPI. Les délais d'attente sont donc longs et les distances à parcourir pour les patients souvent plus importantes.
- La réalisation d'une biopsie au 3^e jour du développement embryonnaire impose d'autres contraintes : qualité embryonnaire suffisante pour la biopsie, culture prolongée, synchronisation des équipes en biologie de la reproduction et en génétique.
- Le contexte psychologique est particulier. Les patients ont souvent été « fragilisés » par des expériences antérieures douloureuses. Par ailleurs, certains acceptent difficilement la nécessité d'une prise en charge en AMP, alors qu'ils ne présentent pas de difficultés à avoir des enfants, notamment dans le cas de maladies monogéniques.

Le parcours dans lequel s'engagent les patients souhaitant un DPI est souvent très long. Cependant, le DPI représente tout de même une source d'espoir pour ces couples qui ont été très affectés par la réalisation d'une interruption médicale de grossesse ou par la naissance d'un enfant atteint d'une maladie génétique.

Références

1. Goossens V, Harton G, Moutou C *et al.* (2009) ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 24: 1786-810
2. Ray PF, Gigarel N, Bonnefont JP *et al.* (2000) First specific Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) for ornithine transcarbamylase deficiency. *Prenat Diagn* 20: 1048-54
3. Munné S, Sandalinas M, Escudero T *et al.* (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7: 91-7
4. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J *et al.* (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 357: 9-17
5. Staessen C, Verpoest W, Donoso P *et al.* (2008) Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 23: 2818-25
6. Burlet P, Frydman N, Gigarel N *et al.* (2005) Improved single-cell protocol for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Fertil Steril* 84: 734-9
7. Burlet P, Frydman N, Gigarel N *et al.* (2006) Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 12: 647-52
8. Keymolen K, Staessen C, Verpoest W *et al.* (2009) A proposal for reproductive counselling in carriers of Robertsonian translocations: 10 years of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 24: 2365-71
9. Munné S (2001) Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. *Mol Cell Endocrinol* 183 (Suppl 1): S55-8
10. Escudero T, Lee M, Stevens J *et al.* (2001) Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 21: 760-6
11. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT *et al.* (2008) Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenat Diagn* 28: 434-42
12. Wang WH, Kaskar K, Ren Y *et al.* (2009) Comparison of development and implantation of human embryos biopsied with two different methods: aspiration and displacement. *Fertil Steril* 92: 536-40
13. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16: 10953-71
14. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh R *et al.* (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 18: 347-9
15. Ray PF, Frydman N, Attié T *et al.* (2002) Birth of healthy twins after preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis combined with gender determination. *Mol Hum Reprod* 8: 651-7
16. Gigarel N, Ray PF, Burlet P *et al.* (2005) Single cell quantification of the 8993T>G NARP mitochondrial DNA mutation by fluorescent PCR. *Mol Genet Metab* 84: 289-92
17. Moutou C, Gardes N, Viville S (2004) Duplex, triplex and quadruplex PCR for the preimplantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis (CF), an exhaustive approach. *Prenat Diagn* 24: 562-9
18. Somers GR, Trounson AO, Wilton LJ (1990) Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm of 3/4 mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 2: 51-9
19. Hardy K, Martin KL, Leese HJ *et al.* (1990) Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 5: 708-14
20. Staessen C, Platteau P, Van Assche E *et al.* (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19: 2849-58

21. Hardarson T, Hanson C, Lundin K *et al.* (2008) Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age causes a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 23: 2806-12
22. Van de Velde H, De Vos A, Sermon K *et al.* (2000) Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 20: 1030-7
23. Goossens V, De Rycke M, De Vos A *et al.* (2008) Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 23: 481-92

F. Vialard, D. Molina-Gomes,
I. Hammoud, M. Bergère,
R. Wainer et J. Selva

Analyse du premier globule polaire et diagnostic préconceptionnel : états des lieux

Introduction

Le diagnostic préconceptionnel (DPC), décrit pour la première fois en 1990 (1), est considéré, par beaucoup, comme une alternative au diagnostic préimplantatoire (DPI) et au screening préimplantatoire des aneuploïdies (SPI) (2). Il s'agit non pas du diagnostic d'une anomalie embryonnaire, mais du diagnostic indirect, sur globule polaire (GP), de la constitution génétique de l'ovocyte. À l'opposé du DPI, fait sur blastomère (3), le diagnostic préconceptionnel s'effectue sur le premier GP avant la fécondation, voire sur les deux globules polaires après la fécondation.

Actuellement, le DPI est considéré par de nombreuses équipes comme la méthode de choix pour le diagnostic des anomalies génétiques avant transfert embryonnaire, que ces anomalies soient monogéniques ou chromosomiques. Pour les anomalies du nombre des chromosomes, on parlera plutôt d'un dépistage des aneuploïdies ou SPI.

À l'inverse des DPI et SPI qui permettent à la fois le diagnostic des anomalies d'origine paternelle et maternelle, le DPC permet uniquement le diagnostic des anomalies d'origine maternelle si on analyse les deux globules polaires, et uniquement celles survenant durant la première division méiotique si seul le premier GP est analysé. C'est la raison pour laquelle le DPI et le SPI sont les méthodes de choix au niveau international. Néanmoins, dans certains pays comme la Suisse, l'Autriche, l'Allemagne et l'Italie, le diagnostic sur embryons est interdit et, dans d'autres pays comme la France, il est impossible si une anomalie génétique n'a pas été identifiée chez un parent, même si le couple appartient à un groupe à risque accru d'aneuploïdie. Dans ces situations, comme l'âge de la patiente supérieur à 38 ans, le SPI est *de facto* interdit en France.

Que se soit le DPI, ou SPI ou DPC, l'objectif de ces méthodes est d'éviter la survenue d'une grossesse ou la naissance d'un enfant portant une

anomalie monogénique ou chromosomique et/ou d'augmenter le succès des techniques d'assistance médicale à la procréation en éliminant du transfert les embryons porteurs d'une anomalie de nombre des chromosomes. Au total, ces techniques nécessitent le recours à la fécondation *in vitro* (FIV) et sont donc proposées à deux groupes de couples, les couples infertiles et les couples fertiles mais ayant des antécédents d'anomalies génétiques associant interruptions médicale de grossesse, fausses couches spontanées, naissance d'enfants atteints de maladies génétiques graves. Pour ces couples, ces techniques sont souvent considérées comme un diagnostic prénatal ultra-précoce.

L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur le DPC, ses applications actuelles en France, dans le cadre de protocole de recherches validés par un comité de protection des personnes, et dans le monde, après un bref rappel sur l'origine chromosomiques des anomalies gamétiques et principalement ovocytaires qui ont amené à proposer ces techniques. Cette mise au point a d'autant plus d'intérêt que de nombreuses études randomisées tendent à montrer que le SPI systématique n'a probablement pas d'intérêt chez les patientes prises en charge en FIV (4-6), en raison d'un probable effet délétère de la biopsie des blastomères.

La part des gamètes dans la survenue des aneuploïdies

Notre espèce a une importante mortalité prénatale principalement due aux aneuploïdies. C'est Leridon, épidémiologiste, qui a pour la première fois montré de façon explicite qu'il existait dans notre espèce une forte mortalité prénatale (7). En effet, il a recensé toutes les grossesses et leurs issues dans une large cohorte de femmes et a ainsi montré que moins de 40 % des grossesses débu-

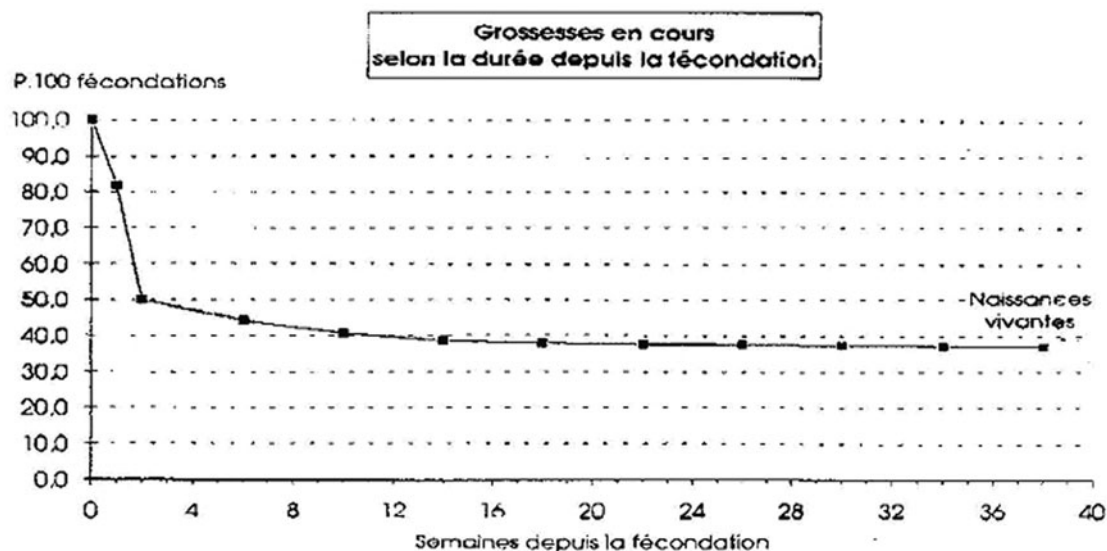


Fig. 1 – Pourcentage de grossesses évolutives en fonction du nombre de semaines de gestation d'après Leridon (7).

tées arrivaient à terme, et que les accidents survenaient très majoritairement durant le premier trimestre de la grossesse, voire avant la date des règles (fig. 1). Les chances de concevoir, sans aide médicale, un enfant vivant à terme, sont estimées à 21–28 % par cycle naturel pour les femmes âgées de 20 à 30 ans (8), et la plupart des échecs reproductifs seraient dus à des anomalies chromosomiques embryonnaires.

Depuis fort longtemps, A. et J. Boué (9) ont démontré, en réalisant le caryotype de fausses couches spontanées, que la majorité des échecs de reproduction étaient dus à des anomalies chromosomiques. Ils ont montré que cette fréquence d'anomalies chromosomiques était beaucoup plus importante parmi les « produits » de fausses couches (60 %) que parmi les « produits » d'interruption volontaire de grossesse (10 %). Cette étude montrait également la présence de trisomies (présence d'un chromosome en trois exemplaires au lieu de deux) impliquant tous les chromosomes à l'exception du chromosome 1. En revanche, aucune monosomie (un exemplaire au lieu de deux) n'a été retrouvée, à l'exception de celle du chromosome X (syndrome de Turner). L'interprétation de ce résultat était que les monosomies étaient très peu viables et conduisaient à la survenue de fausses couches trop précoces (avant 2 semaines) pour être reconnues.

En étudiant les enfants porteurs de trisomies 13, 18 et 21, ainsi que les fœtus porteurs d'autres trisomies, l'origine majoritairement maternelle des aneuploïdies a été démontrée. Selon Hassold (11), 93 % des trisomies 18 sont d'origine maternelle, 95 % des trisomies 21 et 100 % des trisomies 16. De plus, ces anomalies surviennent plus particuliè-

rement durant la première division méiotique (11, 12) et l'âge maternel est à ce jour le seul facteur étiologique reconnu.

Puisque les anomalies chromosomiques de l'embryon relèvent pour l'essentiel de causes méiotiques, elles préexistent dans les gamètes matures, spermatozoïdes et ovocytes. L'étude cytogénétique de ces cellules revêt donc un caractère fondamental pour une meilleure compréhension des mécanismes de formation et de transmission de ces anomalies. Chaque gamète mature est le produit fini et unique du processus méiotique, et leur analyse n'est pas influencée par les paramètres de viabilité ou de perte embryonnaire précoce.

Les données les plus récentes font état de taux d'anomalies chromosomiques ovocytaires de l'ordre de 15 à 20 % (13–16). Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un mode de non-disjonction jusqu'ici passé inaperçu dans le processus méiotique humain, à savoir la séparation prématurée des chromatides sœurs (SPCS) au cours de l'anaphase de la première division méiotique. Ce type d'anomalie méiotique aboutit à la ségrégation aléatoire des chromatides libres au cours des deux divisions méiotiques successives, et peut ainsi conduire à la formation de trisomies. Ainsi, parallèlement aux non-disjonctions chromosomiques conventionnelles, ce nouveau type d'erreur de ségrégation a dû être pris en compte (fig. 2), et des études réalisées sur de larges échantillons d'ovocytes humains issus d'échecs de FIV ont permis de démontrer que ce type de non-disjonction était en fait le mode majeur de non-disjonction intervenant dans la méiose féminine (14, 15).

De plus, il semble que la SPCS soit liée de façon plus significative à l'âge de la patiente que la non-

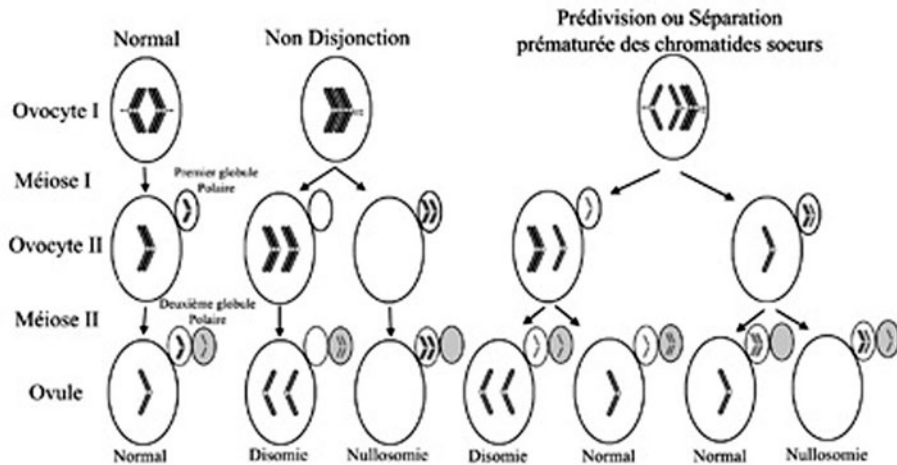


Fig. 2 – Les différents types de malségrégation méiotique, comparée à la ségrégation méiotique normale d'une paire de chromosomes. La non-disjonction chromosomique classique aboutit à la présence de deux chromosomes homologues dans la métaphase II alors que la séparation prématurée d'une paire de chromatides se traduit par la présence d'une (ou de deux) chromatide(s) libre(s) dans la métaphase II.

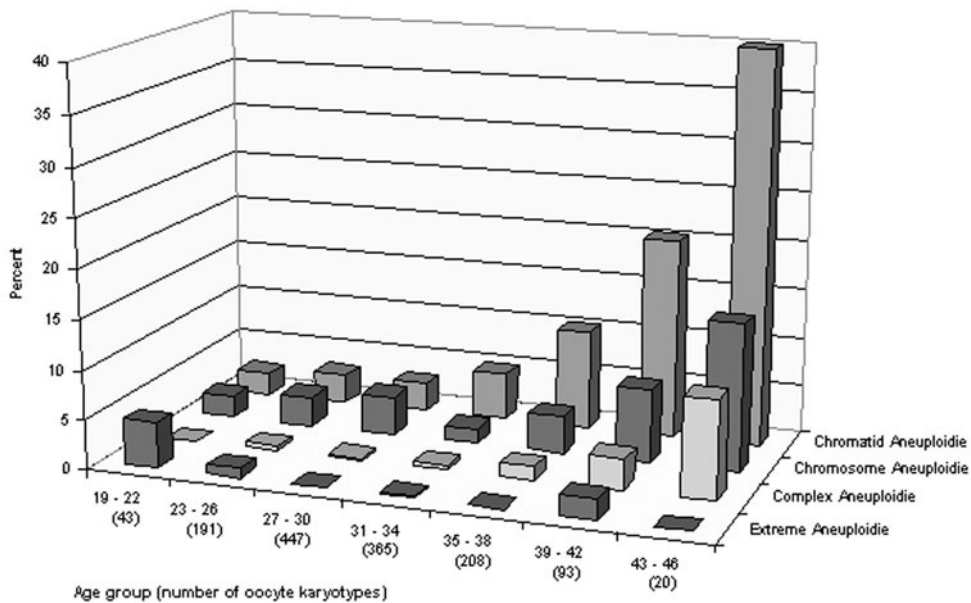


Fig. 3 – Distribution des différents types de malségrégation en fonction de l'âge de la patiente d'après Pellestor *et al.* (17).

disjonction conventionnelle (17) (fig. 3), avec une prépondérance des anomalies pour les chromosomes de petite taille. Néanmoins, ces résultats pourraient être biaisés puisque toutes ces analyses ont été réalisées sur des ovocytes non fécondés après FIV, susceptibles d'être porteurs d'une anomalie. De plus, l'influence de la durée de la culture sur le vieillissement des ovocytes *in vitro* conduisant à des SPCS a été évoquée (18).

Grâce au développement des techniques de micro-manipulation et de FIV d'une part, et de l'analyse génétique sur cellule unique d'autre part, il

était donc devenu possible d'analyser l'ovocyte et l'embryon, et les premiers diagnostics sur globule polaire ou blastomère ont été réalisés (1). Mais, du fait de la plus grande complexité du diagnostic sur le 1^{er} globule polaire, cette approche a été délaissée au profit du diagnostic effectué sur embryon ou DPI. Dès lors, de nombreuses équipes ont réalisé le dépistage des aneuploïdies embryonnaires ou SPI chez les femmes âgées de plus de 35 ou 38 ans, et toutes montrent une très forte proportion d'anomalies chromosomiques, avec des taux avoisinant parfois les 70 % d'anomalies chromosomiques

embryonnaires quand neuf chromosomes ont été étudiés (19).

D'autres catégories de patientes bénéficient actuellement du SPI (20), parmi lesquelles on trouve les patientes en échec d'implantation, défini comme l'absence de grossesse après le transfert de plus de dix embryons (21), les patientes ayant des fausses couches à répétition ou des aneuploïdies à répétition (interruptions médicales de grossesses, enfants porteurs d'aneuploïdies).

Diagnostic préconceptionnel : méthode

Le DPC s'effectue dès le recueil des ovocytes, et il est réalisé sur les ovocytes matures, ayant expulsé leur 1^{er} globule polaire. L'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI) est réalisée, quant à elle, l'après-midi, pour les ovocytes diagnostiqués normaux. Les ovocytes non diagnostiqués, c'est-à-dire les ovocytes ayant expulsé leur 1^{er} globule polaire entre le moment de la biopsie et de l'injection ou n'ayant pu être analysés en raison d'un échec technique, peuvent également être micro-injectés si le couple est pris en charge, en ICSI, pour une infertilité (fig. 4). Ces ovocytes, non diagnostiqués, ne seront pas micro-injectés si la patiente est fertile et a recours à l'ICSI pour

des antécédents de fausses couches ou aneuploïdies à répétition.

La biopsie a été réalisée sur les ovocytes matures, après décoronisation par la hyaluronidase (fig. 5A). L'ouverture de la zone pellucide peut être effectuée de façon mécanique, enzymatique ou à l'aide d'un laser (fig. 5B).

Personnellement, nous utilisons un laser (Zylos TK laser, Hamilton) qui permet d'aménager un trou dans la zone pellucide après trois ou quatre impacts (180 mW pendant 0,5 ms). Le globule polaire est alors extrait à l'aide d'une micropipette de biopsie montée sur un microscope équipé d'un système de micromanipulation (fig. 5C et 5D) et placé dans une goutte d'eau de 0,5 µL sur une lame silicanée. Cette étape est très manipulateur-dépendante et doit être réalisée par des mains expertes.

Après fixation (fig. 6) et passage dans plusieurs bains successifs, une goutte de solution de sondes spécifiques (exemple : kit *Polar Body™ PGT multi-colour Abbott* pour le screening des aneuploïdies) est déposée sur chaque GP pour l'hybridation. Après lavage des lames, celles-ci sont interprétées en sachant que chaque 1^{er} globule polaire contient un chromosome de chaque paire, constitué de deux chromatides sœurs. Chaque signal (spot) correspond donc à une chromatide, et seule la présence de deux « spots » est considérée comme normale.

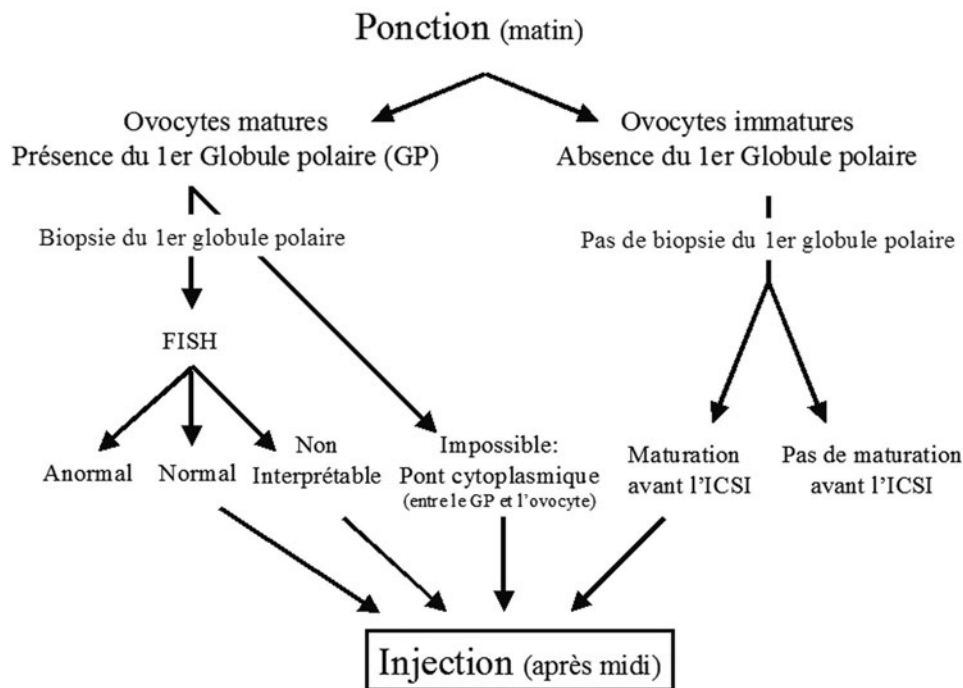


Fig. 4 – Description de la procédure de réalisation du DPC.

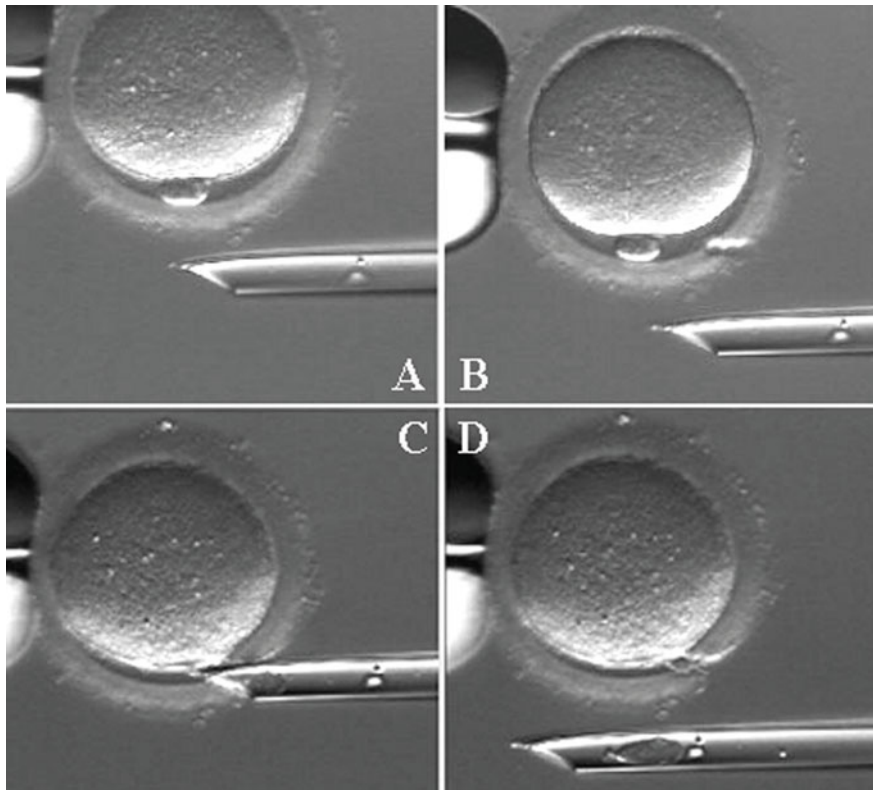


Fig. 5 – Biopsie du globule polaire sur un ovocyte en métaphase II, avant la mise en fécondation en ICSI.

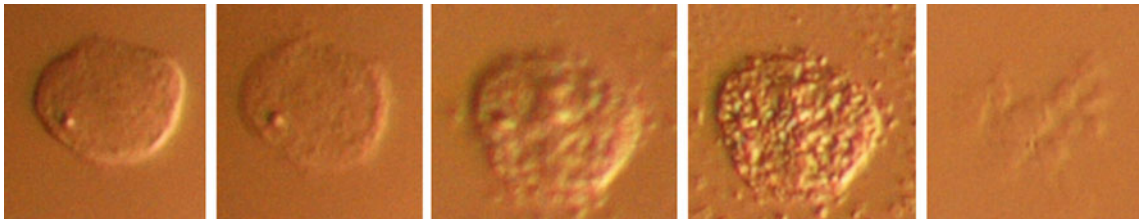


Fig. 6 – Fixation du premier globule polaire par évaporation d'une goutte d'eau.

Dépistage des aneuploïdies ovocytaires

Analyse du premier globule polaire chez les patientes de plus de 35 ou 38 ans

Initialement, l'analyse du premier globule polaire a été développée pour les patientes âgées de plus de 38 ans en analysant les chromosomes les plus fréquemment impliqués dans les fausses couches et les anomalies viables, à savoir les chromosomes 13, 16, 18, 21 et 22. Tout d'abord, cette analyse visait uniquement à améliorer les taux de grossesses chez ces patientes. Elle a également montré une valeur diagnostique et pronostique pour les futures tentatives. De plus, elle nous renseigne sur les mécanismes à l'origine des aneuploïdies ovocytaires et sur leur fréquence.

Interprétation des signaux

Deux mécanismes peuvent être à l'origine d'anomalies chromosomiques ovocytaires, la non-disjonction chromosomique due à la non-séparation des chromosomes homologues, et la SPCS ou prédivision. Zéro ou quatre spots correspondent donc à une non-disjonction (fig. 7B), un ou trois spots à une SPCS (fig. 7C) (tableau I). Enfin, la présence de deux spots séparés dans le 1^{er} globule polaire est considérée comme normale malgré la séparation des deux chromatides sœurs (fig. 7D).

Dans notre première étude, concernant uniquement des patientes âgées de plus de 38 ans, nous avons trouvé un taux d'anomalies chromosomiques de 30,5 % (22), comparable à celui des études précédentes (23, 24). De plus, nous avons confirmé, sur des ovocytes, en dehors de tout vieillissement *in vitro*, que la séparation prématurée des chromatides sœurs était à l'origine de la plupart des

Tableau I – Table d’interprétation du nombre de spots observé après FISH sur globule polaire issu d’ovocyte en métaphase II.

Nombre de spots dans le globule polaire	0	1	2	3	4
Interprétation	chromosome absent	chromatide manquante	normal	chromatide en excès	disomie du chromosome
Résultat attendu dans l’ovocyte II	disomie du chromosome	chromatide en excès	normal	chromatide manquante	chromosome absent
Mécanisme	non-disjonction	prédivision	normal	prédivision	non-disjonction

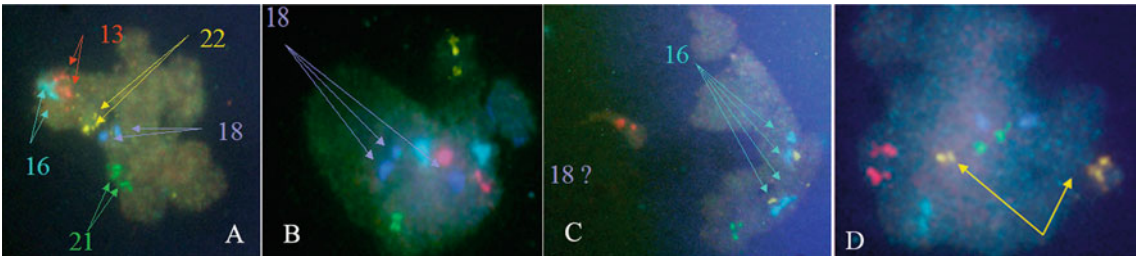


Fig. 7 – Marquage spécifique *in situ* par la technique de FISH multicouleurs (kit Multivision PB Abbott) : chromosome 13 en rouge, 16 en bleu clair (acqua), 18 en bleu foncé, 21 en vert et 22 en jaune. Chaque spot correspond à une chromatide.
A : globule polaire normal ; B : globule polaire anormal avec division prématurée des chromatides sœurs (chromosome 18) ; C : globule polaire anormal avec non-disjonction chromosomique (chromosome 16) ; D : globule polaire normal avec séparation des chromatides (chromosome 22).

anomalies chromosomiques rencontrées (80 %). Parallèlement, nous avons obtenu des taux de grossesses de 21,5 % par transfert, comparables également aux études précédentes.

Analyse du premier globule polaire chez les patientes en échec d’implantation

Nous avons entrepris la réalisation de la même étude chez des patientes en échec d’implantation. Comme pour les patientes âgées de plus de 38 ans, nous avons retrouvé chez ces patientes un taux d’anomalie comparable aux précédentes études (25, 26), soit 40,5 % (27), avec des taux de grossesses bas chez les femmes âgées de moins de 38 ans à 11,1 %, et de 22,2 % pour celle ayant plus de 38 ans. De plus, nous avons identifié un sous-groupe de patientes ayant un taux d’anomalies ovocytaires très élevé, supérieur aux deux tiers (pour « seulement » cinq chromosomes analysés), sous-groupe absent chez les femmes âgées de plus de 38 ans. Dans ce sous-groupe, aucune grossesse n’a pu être obtenue. Très vraisemblablement, si nous avions étudié tous les chromosomes, ces patientes n’auraient eu aucun ovocyte normal. Nous avons également confirmé que la population des patientes en échec d’implantation est très hétérogène puisque les patientes ont entre 0 et 85 % d’ovocytes anormaux.

Nous avons également pu analyser l’origine des anomalies rencontrées et il s’est avéré que les non-disjonctions et les séparations prématurées des chromatides sœurs avaient des fréquences identiques. Cette population se différencie donc de celle

des patientes de plus de 38 ans, car l’origine des anomalies est plus variée.

Analyse du premier globule polaire chez les patientes ayant des fausses couches à répétition et/ou des aneuploïdies à répétition

Il s’agit également de populations décrites comme à risque d’aneuploïdies ovocytaires. Ces patientes bénéficient dans le monde du screening des aneuploïdies ovocytaires. Les résultats montrent encore une fois un taux d’aneuploïdie embryonnaire très élevé (28). Une étude des premiers globules polaires a donc été démarrée récemment pour les patientes ayant des aneuploïdies à répétition, et les premiers résultats semblent confirmer un très fort taux d’aneuploïdie ovocytaire proche des 80 % (résultats personnels non publiés).

Analyse du premier globule polaire : valeur prédictive en AMP

Afin d’étudier la valeur pronostique de l’étude du premier globule polaire sur les tentatives ultérieures, nous avons comparé chez 24 patientes la concordance des résultats de deux cycles d’analyse du premier globule polaire (29) (suite à l’absence de grossesse au premier cycle ou suite à la demande d’une nouvelle grossesse dans notre centre).

En utilisant le test de Spearman ($n = 24$), nous avons montré une corrélation ($p = 0,0007$) entre les deux taux aneuploïdies avec un Z score à 3,391 et un coefficient de corrélation à 0,707. Ainsi,

dans les cas où le taux d'anomalies est supérieur à 70 % pour seulement cinq chromosomes testés, il est important de discuter avec les couples de l'opportunité d'avoir recours à une autre stratégie. La réalisation d'une stimulation folliculaire plus légère peut être proposée, voire le don d'ovocyte et l'adoption. À l'inverse, pour des taux inférieurs à 30 % (voisin de la population générale), l'échec reproductif n'a probablement pas une étiologie cytogénétique. Entre les deux, le bénéfice de l'analyse du premier globule polaire est probable, si la cohorte ovocytaire obtenue est suffisante.

Innocuité de la biopsie de premier globule polaire

En ce qui concerne la biopsie de premier globule polaire, nous avons analysé l'effet du laser et de la biopsie du premier globule polaire sur des ovocytes maturés *in vitro* à j1. Nous avons montré que les taux de lyse ovocytaire, d'activation ovocytaire avec du calcium ionophore, et de clivage étaient identiques que l'ovocyte ait eu (i) sa biopsie de premier globule ou (ii) le laser sans biopsie ou (iii) aucune procédure (30). Cette étude tend à confirmer l'absence d'effet délétère de la biopsie du premier globule polaire sur l'évolution immédiate de l'ovocyte.

De plus, nous avons obtenu des taux de fécondation après biopsie de premier globule polaire et de clivage, respectivement de 67,5 % et 92,5 %, taux comparables à ceux obtenus en ICSI, en France, entre 2002 et 2006 (entre 62,9 et 65,8 %) d'embryons clivés par ovocytes injectés (31).

Au total, il semble qu'il n'y ait pas d'effet délétère de la biopsie du premier globule polaire. De plus, nous avons obtenu des taux de grossesse proches de 20 % pour les femmes de plus de 38 ans mais également des informations pour la prise en charge des couples en échec récurrent d'implantation.

Analyse du premier globule polaire : intérêt dans la connaissance des mécanismes impliqués dans les aneuploïdies ovocytaires

Au total, l'analyse du premier globule polaire nous a permis d'identifier une variabilité individuelle et une population de femmes à très haut risque d'anomalies chromosomiques gamétiques, anomalies qui touchent en particulier la cohésion des chromatides durant la méiose. Cette cohésion implique une classe particulière de protéines, les cohésines (32) qui maintiennent la cohésion entre les chromatides sœurs. Pendant la transition métaphase/anaphase, ces protéines sont clivées, entraînant le mécanisme de ségrégation chromosomique (33). L'action des cohésines s'exerce au niveau des

centromères, mais aussi sur de nombreux sites le long des bras chromosomiques. En fonction de leur implication dans la première ou deuxième division méiotique, elles subissent des séquences de dégradation différentes, extrêmement précises et orchestrées. Les principales protéines de cohésions se nomment SMC1, SMC3, RAD21 et REC8 (34), mais d'autres protéines peuvent intervenir de manière très ciblée. Ainsi, au cours de la première division méiotique (MI), une protéine nucléaire nommée Sughoshin (SOG1) intervient pour maintenir la cohésion centromérique entre les chromatides sœurs et ainsi empêcher leur séparation en MI. Puis, cette protéine est dégradée pour permettre la ségrégation des chromatides-sœurs en anaphase de la deuxième division méiotique (MII) (35).

Une dégradation prématurée ou un défaut partiel de ces protéines pourrait entraîner une SPCS.

Récemment, l'étude de souris Knock Out pour le gène *SMC1* β a montré le rôle essentiel de cette protéine dans la cohésion des chromatides sœurs (36). Ces souris femelles, n'exprimant plus le gène *SMC1* β , présentent toutes un épuisement ovarien prématuré, qui a lieu conjointement à une séparation prématurée des chromatides sœurs.

Avec l'âge, une dégradation progressive de ces protéines de cohésion paraît probable. Cette hypothèse pourrait expliquer le lien entre la SPCS, l'âge maternel et une susceptibilité génétique.

L'existence éventuelle de polymorphismes ou de mutations génétiques de facteurs impliqués dans la gamétogenèse chez ces patientes pourrait expliquer cette variabilité individuelle observée. C'est le premier pas vers une meilleure compréhension des dysfonctionnements méiotiques ovocytaires.

Influence du microenvironnement dans la survenue des aneuploïdies ovocytaires

De plus, des changements subtils dans les conditions de régulation de la folliculogenèse et de la maturation ovocytaire paraissent capables d'induire des aneuploïdies, comme ceci a été montré chez la souris. Roberts (37) a montré qu'une exposition à forte dose de FSH durant une maturation *in vitro* pourrait accélérer la croissance nucléaire et augmenter le pourcentage d'aneuploïdies en méiose II. Hodges (38) a montré une augmentation du taux des aneuploïdies ovocytaires chez des souris mutées pour le gène de la LH. Enfin, Van Blerkom (39) a montré que les stimulations répétées par FSH pourraient altérer la qualité du fuseau méiotique et aussi augmenter le taux de chromosomes détachés de leurs fuseaux.

Dans l'espèce humaine, de nombreux arguments plaident en faveur d'une interaction entre environnement hormonal (FSH en particulier), qualité de

la maturation ovocytaire, qualité de la méiose et risque d'aneuploidie.

Il paraît donc envisageable de trouver des marqueurs dosables dans le sang et le liquide folliculaire (LF) et prédictifs du risque d'aneuploidie.

Nous avons entrepris une telle étude (16) sur une série de 678 ovocytes et montré que le taux de FSH folliculaire était plus élevé ($p = 0,0144$) dans le groupe des ovocytes anormaux ($5,20 \pm 2,38$) par rapport aux ovocytes normaux ($4,64 \pm 1,89$) et que cette augmentation semblait plutôt liée à la séparation des chromatides sœurs ($p = 0,0334$) qu'aux non-disjonctions. Elle semblait également liée au nombre d'anomalies retrouvées dans l'ovocyte ($p = 0,0007$; 0 vs 2 anomalies). Ces résultats préliminaires suggèrent donc que la FSH pourrait avoir un rôle important dans la survenue des aneuploidies ovocytaires et plus particulièrement les SPCS*.

Le DPC chez les patientes porteuses d'une translocation réciproque équilibrée ou robertsonienne

Avec la même technologie, il est possible d'analyser le premier globule polaire des patientes porteuses d'une translocation équilibrée.

Dans notre pratique courante de l'aide médicale à la procréation, le diagnostic de translocation réciproque équilibrée ou robertsonienne est réalisé dans deux situations : (i) soit la patiente est la conjointe d'un homme ayant une altération sévère de la spermatogenèse, (ii) soit elle est fertile, son conjoint aussi, mais a dans ses antécédents la survenue de fausses couches et/ou aneuploidies viables conduisant soit à une IMG, soit à la naissance d'un enfant porteur d'une aneuploidie. Chez toutes ces patientes, une ICSI avec analyse du premier glo-

bule polaire peut être réalisée. Dans le premier cas, l'ICSI est indiquée par l'altération de la spermatogenèse du conjoint, alors que dans le second l'ICSI n'est réalisée que dans le but d'analyser génétiquement les ovocytes. Cette approche est actuellement réalisée dans les pays où le DPI est interdit (2), et nous le proposons également en France aux patientes non prises en charge dans l'un des trois centres de DPI, principalement en raison de leur âge, ou aux couples qui ne veulent pas attendre un délai de prise en charge variant entre 12 et 18 mois.

La technique est identique à celle décrite auparavant. Seule diffère l'interprétation pour permettre l'étude de la ségrégation des chromosomes impliqués dans la translocation (fig. 8 et 9).

Il semble qu'en fonction des indications, la proportion de gamètes aneuploïdes retrouvée est différente. Ainsi, pour les patientes porteuses d'une translocation réciproque, dont la réalisation du caryotype a été faite de façon fortuite, précédant la prise en charge en ICSI pour altération majeure de la spermatogenèse chez son conjoint, le risque d'aneuploidie est faible à modéré. À l'inverse pour les autres patientes, ce risque est majeur, avec une proportion très importante d'ovocytes anormaux (40).

Au total, nous avons pris en charge six patientes bénéficiant d'une ICSI pour infertilité masculine et porteuses d'une translocation. Sur cette courte série, le taux de grossesse par transfert a été de 31,25 %. Trois patientes ont été incluses pour antécédents de fausses couches ou aneuploidies à répétition. Aucune grossesse n'a été obtenue, avec des taux d'anomalie ovocytaire de 80 % en moyenne.

De plus, il semble que, comme pour le screening des aneuploidies, le DPC ait une valeur pronostique en raison de l'analyse de toute la cohorte ovocytaire mature et non pas uniquement ceux ayant évolué jusqu'au stade huit cellules.

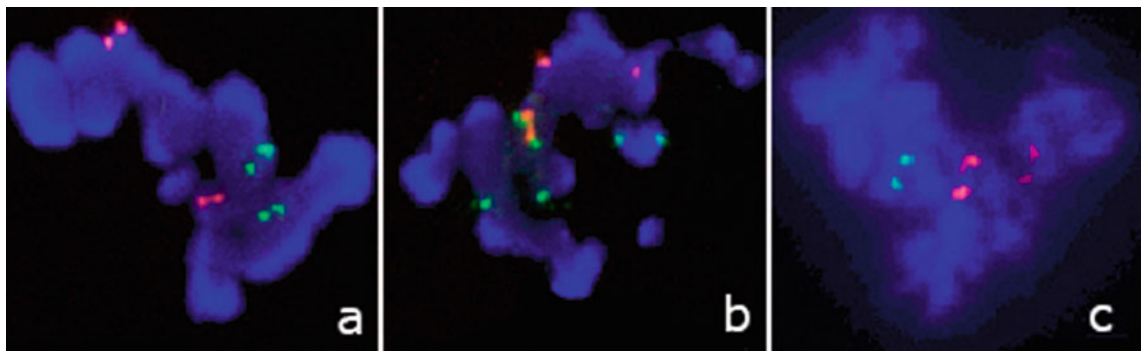


Fig. 8 – Marquage spécifique *in situ* par la technique de FISH pour une patiente porteuse d'une translocation 45,XX,rob(13;14)(q10;q10) avec les sondes centromériques des chromosomes 13/21 en vert et 14/22 en rouge. Chaque spot correspond à une chromatide, il faut donc quatre spots par couleur (deux par chromosome).

a : globule polaire normal ; b : globule polaire anormal avec le dérivé 13-14 et un chromosome 13 en plus ; c : globule polaire anormal avec deux spots verts correspondant probablement au chromosome 13.

* Résultats personnels non publiés.

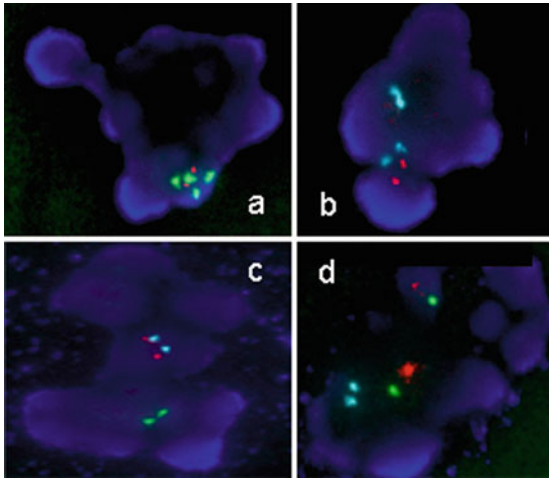


Fig. 9 – Marquage spécifique *in situ* par la technique de FISH pour une patiente porteuse d'une translocation 46,XX,t(12;17)(q13;q21) avec les sondes centromériques des chromosomes 12 (vert) et 17 (bleu) et le télomère du bras long du chromosome 12 (rouge).

a : globule polaire anormal avec les deux chromosomes 12 et sans chromosome 17 ; b : globule polaire anormal avec les deux chromosomes 17 et sans chromosome 12 ; c : globule polaire normal avec la translocation ; d : globule polaire normal avec une séparation des chromatides du chromosome 12.

Le DPC chez les patientes porteuses d'une anomalie monogénique

Comme pour les translocations réciproques, il est possible d'analyser les ovocytes chez toutes les patientes porteuses d'une anomalie monogénique, et ceci est fait dans les pays où le DPI est interdit (2). Il peut s'appliquer en premier lieu aux maladies récessives liées à l'X comme la myopathie de Duchenne, l'hémophilie ou l'X fragile, et aux maladies autosomiques dominantes. Dans le cas des anomalies récessives autosomiques, la sélection est également possible même si 50 % des ovocytes seront éliminées alors que 25 % seulement le seraient par le DPI.

Analyse du premier globule polaire/SPI : avantages/inconvénients

Chez les patientes à caryotype normal mais à risque d'aneuploïdies ovocytaires, l'intérêt de l'analyse du premier globule polaire ou des blastomères est très discuté actuellement suite à la réalisation d'essais randomisés (4, 41) qui ont montré que les taux de grossesses étaient identiques qu'il y ait eu ou non SPI. Il a également été montré que les mosaïques étaient une source importante d'erreurs de diagnostic en SPI et ceci d'autant plus que celui-ci était effectué sur un seul blastomère (42). La mosaïque embryonnaire est une des caractéristiques de la

période préimplantatoire et un des écueils majeurs du DPI (43). On estime à 60 % la probabilité de mosaïque pour un embryon (44), ce qui comporte deux écueils. D'une part, la faible représentativité de une ou deux cellules pour un embryon de sept à huit cellules qui pourrait expliquer les taux de faux positif et négatif rencontrés au cours du DPI pour aneuploïdie. D'autre part, les possibilités de régulation ultérieure des embryons anormaux qui ont été soulignées par une étude qui faisait état de la constitution de cellules souches embryonnaires normales à partir d'embryons anormaux issus du SPI (45), par autocorrection ou sélection des lignées normales en culture, sans que l'on sache exactement à quelle étape cette éventuelle régulation se produit en culture *in vitro* et si oui ou non elle serait possible *in vivo*. De plus, il a été montré que dès les stades quatre cellules, les blastomères n'étaient pas identiques et qu'il y avait mise en place d'une polarité embryonnaire (46, 47). Au total, il semblerait que si le DPI sur deux blastomères augmente la fiabilité du résultat, il induit très vraisemblablement des effets délétères sur l'embryon, effets qui pourraient expliquer les faibles taux de grossesse chez des femmes fertiles bénéficiant d'un DPI pour maladie monogénique ou chromosomique. Nos études et celles des autres équipes ont en revanche montré que le DPC ne semblait pas induire d'effet délétère sur le développement embryonnaire. Un essai randomisé doit néanmoins être réalisé afin de confirmer ces données et de démontrer le bénéfice de cette méthode.

Enfin, le DPC permet l'analyse de l'ensemble de la cohorte ovocytaire, alors que seuls les ovocytes fécondés et dont l'embryon a une morphologie de bon pronostic le sont en SPI et/ou DPI.

Néanmoins, cette approche souffre de quelques écueils techniques. On constate une prépondérance de signaux manquants (1 ou 0) (71 %) par rapport au gain de spots (3 ou 4) (24). Il peut s'agir d'un phénomène physiologique, mais la question des artefacts techniques doit bien sûr être posée. Le seul moyen de répondre à cette interrogation est la réalisation systématique de FISH de contrôle sur ovocytes diagnostiqués anormaux. Une seule étude (48) a tenté de vérifier la fiabilité de l'analyse du GP en analysant l'ovocyte. Le taux de concordance (75 %) n'était pas très bon, mais en cas de divergence, il est bien difficile de dire où se situe l'erreur, c'est-à-dire sur l'analyse du GP ou sur l'ovocyte. La FISH sur ovocyte est techniquement plus difficile que la FISH sur GP et les écueils techniques sont encore plus nombreux. En particulier, le cytoplasme, s'il n'est pas bien éliminé, gêne l'hybridation. On s'attend donc à plus d'échecs d'hybridation sur l'ovocyte que sur le globule polaire. Au total, soit il s'agit d'un réel problème technique lors de la fixation du premier globule

polaire, soit les pertes sont réellement majoritaires comme semblent le montrer les études effectuées en hybridation génomique comparative (CGH) des globules polaires (49-51) qui permettent d'analyser l'ensemble des chromosomes.

Le second écueil est lié à la possible correction des séparations prématurées des chromatides sœurs lors de la deuxième division méiotique. Dans le cas des SPCS, les ovocytes II anormaux conduisent à 50 % d'ovules anormaux théoriquement (fig. 2). Nous avons estimé que le risque d'exclusion d'un ovocyte, pouvant donner finalement un embryon normal, est de 7 % (27). Mais, peut-on prendre le risque d'injecter un ovocyte qui a une chance sur deux d'évoluer vers un embryon porteur d'une aneuploidie viable ?

Ce constat est en fait un problème général dans la « sélection » des gamètes ou des embryons pour le transfert. Cette période préimplantatoire est très riche en événements génétiques avec des anomalies surimposées et une régulation génétique « normalisant » peut-être certaines anomalies. Ainsi, en pratique courante de FIV classique, les embryons à 3PN sont détruits alors que 25 à 35 % d'entre eux pourraient évoluer en un embryon diploïde (52, 53). De plus, une grande proportion (53 %) des embryons 3PN seront mosaïques après clivage comme une partie des embryons morphologiquement anormaux (43 %).

Biopsie du deuxième globule polaire

L'analyse du deuxième globule polaire ne peut pas être considéré comme un DPC au sens strict du terme puisque effectué après la fécondation. En revanche, il permet l'analyse de structures ovocytaires et non embryonnaires. Elle peut s'effectuer simultanément avec celle du premier globule polaire, quelques heures après la mise en contact des gamètes. Cette technique est choisie le plus souvent car c'est la seule utilisable à large échelle au cours d'un programme d'ICSI pour des raisons de coût et de délai. De plus, 15 % des anomalies fœtales sont dus à des anomalies isolées de la seconde division méiotique (54).

Conclusion

Le diagnostic sur globule polaire à sa place en complément du DPI dans les situations à risque chromosomique prévisible, où celui-ci est interdit comme en France (femmes âgées de plus de 35 ou 38 ans, femmes en échec d'implantation, femmes ayant des fausses à répétition) ou lorsqu'il n'est pas

assez rapidement accessible, restreint ou en raison d'un délai trop long de prise en charge (femmes porteuses d'une anomalie chromosomique).

Les études ultérieures devront s'attacher à définir un seuil de risque au-delà duquel il est raisonnable d'avoir recours au DPC. Ceci est d'autant plus important dans notre pays où l'âge des patientes qui ont recours à la procréation médicalement assistée augmente inexorablement et où le nombre de tentatives de FIV prises en charge par la Sécurité sociale tend à diminuer.

Références

1. Verlinsky YN, Ginsberg A, Lifchez J *et al.* (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 5: 826-9
2. Montag MK, van der Ven B, Rosing B, van der Ven H (2009) Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reprod Biomed Online* 18 (Suppl 1): 6-11
3. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ *et al.* (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1: 347-9
4. Staessen C, Platteau P, Van Assche E *et al.* (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19: 2849-58
5. Blockeel C, Schutyser V, De Vos A *et al.* (2008) Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 17: 848-54.
6. Harper J, Sermon K, Geraedts J *et al.* (2008) What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod* 23: 478-80
7. Leridon H (1977) Human fertility: the basics components. University of Chicago Press.
8. Miller JF, Williamson E, Glue J *et al.* (1980) Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* 2: 554-6
9. Boue JG, Boue A (1969) Frequency of chromosomal aberrations in spontaneous human abortions. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 269: 283-8
10. Boue JG, Boue A (1976) Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. (Their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells). *Curr Top Pathol* 62: 193-208
11. Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-91
12. Pellestor F (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86: 283-8
13. Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86: 383-7
14. Nakaoka Y, Okamoto E, Miharu N, Ohama K (1998) Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. *Hum Reprod* 13: 419-24
15. Pellestor F, Andreo B, Arnal F *et al.* (2002) Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17: 2134-45
16. Selva J, Martin-Pont B, Hugues TN *et al.* (1991) Cytogenetic study of human oocytes uncleaved after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 6: 709-13

17. Pellestor F, Andreo B, Arnal F *et al.* (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 112: 195-203
18. Munne S, Dailey T, Sultan KM *et al.* (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10: 1014-20
19. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S *et al.* (2004) Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 82: 292-4
20. Sermon K, Moutou C, Harper J *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* 20: 19-34
21. O'Neill C, Ferrier AJ, Vaughan J *et al.* (1985) Causes of implantation failure after in-vitro fertilisation and embryo transfer. *Lancet* 2: 615
22. Vialard F, Petit C, Bergere M *et al.* (2006) Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age. *Hum Reprod* 21: 1172-8
23. Montag M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H (2004) Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 9: 425-9
24. Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y (2003) Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 6: 54-9
25. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 72: 837-44
26. Munne S, Sandalinas M, Escudero T *et al.* (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7: 91-7
27. Vialard F, Lombroso R, Bergere M *et al.* (2007) Oocyte aneuploidy mechanisms are different in two situations of increased chromosomal risk: older patients and patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 87: 1333-9
28. Munne S, Sandalinas M, Magli C *et al.* (2004) Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 24: 638-43
29. Vialard F, Gomes DM, Hammoud I *et al.* (2008) Stability of aneuploidy rate in polar bodies in two cohorts from the same patient. *Reprod Biomed Online* 17: 213-9
30. Hammoud I, Molina-Gomes D, Albert M *et al.* (2010) Are zona pellucida laser drilling and polar body biopsy safe for in vitro matured oocytes? *J Assist Reprod Genet* 27: 423-7
31. <<http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2007>>.
32. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91: 35-45
33. Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM (2000) Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103: 399-410
34. Marston AL, Amon A (2004) Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 983-97
35. Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427: 510-7
36. Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R *et al.* (2005) SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 37: 1351-5
37. Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D *et al.* (2005) Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 72: 107-18
38. Hodges CA, Ilagan A, Jennings D *et al.* (2002) Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod* 17: 1171-80
39. Van Blerkom J, Davis P (2001) Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 16: 757-64
40. Molina Gomes D, Hammoud I, Bailly M *et al.* (2009) Preconceptional diagnosis for Robertsonian translocation as an alternative to preimplantation genetic diagnosis in two situations: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 26: 113-7
41. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J *et al.* (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 357: 9-17
42. Baart EB, Martini E, van den Berg I *et al.* (2006) Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 21: 223-33
43. Munne S, Sandalinas M, Escudero T *et al.* (2002) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 4: 223-32
44. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C (2004) The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 10: 79-94
45. Munne S, Velilla E, Colls P *et al.* (2005) Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Human Reprod* 20(suppl 1): i7
46. Plusa B, Hadjantonakis AK, Gray D *et al.* (2005) The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature* 434: 391-5
47. Edwards RG (2005) Genetics of polarity in mammalian embryos. *Reprod Biomed Online* 11: 104-14
48. Cupisti S, Conn CM, Fragouli E *et al.* (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 23: 663-8
49. Wells D, Escudero T, Levy B *et al.* (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 78: 543-9
50. Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D *et al.* (2004) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 19: 2859-68
51. Fragouli E, Wells D, Thornhill A *et al.* (2006) Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 21: 2319-28
52. Bergere M, Selva J, Baud M *et al.* (1995) Chromosome 18 analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) in human blastomeres of abnormal embryos after in vitro fertilization (IVF) attempt. *Prenat Diagn* 15: 835-41
53. Grossmann M, Calafell JM, Brandy N *et al.* (1997) Origin of trippronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2762-5
54. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 111: 193-8

IV Techniques d'assistance médicale à la procréation

C. Rongières, L. Moreau,
E. Lamarca et P. Weber

Stimulation ovarienne, déclenchement de l'ovulation et soutien de la phase lutéale

Introduction

L'utilisation de la stimulation ovarienne a pour objectif d'augmenter les taux de succès de la fécondation *in vitro* en permettant le développement de nombreux follicules, favorisant ainsi l'obtention d'un nombre conséquent d'ovocytes et d'embryons. Elle est également utilisée seule ou en association avec des inséminations intra-utérines. Dans ce cas, le but est d'induire une ovulation. Dans le cadre des inséminations ou des stimulations simples, c'est-à-dire sans insémination, la stimulation se veut douce pour faire émerger entre un à trois follicules au plus et ainsi éviter au mieux les grossesses multiples.

Ces stimulations sont conduites sous l'effet de thérapeutiques spécifiques et différentes. Les unes seront utilisées dans tous les cas de figures, pour stimuler l'ovaire et faire croître un à plusieurs follicules, les autres seront associées, en particulier en FIV et ICSI pour éviter une ovulation prématurée et ainsi permettre la maîtrise du cycle stimulé en cours et sa programmation. Enfin, les dernières sont utilisées pour déclencher au moment opportun l'ovulation afin de déterminer le moment adéquat de la ponction ovocytaire.

Nous allons tout d'abord détailler et apprendre à connaître ces différentes thérapeutiques pour ensuite décliner les différents protocoles de stimulation les mettant en action. Enfin, nous nous attacherons au déclenchement de l'ovulation et au soutien de la phase lutéale qui peut être associée à des traitements adjuvants dont le but est d'améliorer les taux d'implantation avec plus ou moins de succès.

Thérapeutiques

Agonistes du GnRh

En l'absence de contrôle des mécanismes à l'origine de l'ovulation, le risque d'ovulations prématurées lors des stimulations pouvait intéresser jusqu'à 30 % des cycles de traitement (1). En bloquant la

production des gonadotrophines endogènes, l'idée était d'obtenir la maîtrise totale du cycle, d'éviter tout risque d'ovulation et de lutéinisation prématurées des follicules et de pouvoir programmer le recueil d'un grand nombre d'ovocytes pour la FIV. Les agonistes agissent en continu sur les récepteurs hypophysaires de la LHRH qui, à l'état naturel, est sécrétée de façon pulsatile. Au cours de la première phase, il y a une libération massive de LH et de FSH. C'est ce que l'on appelle l'effet *flare-up*. Si cet effet peut être utilisé pour optimiser les effets de la stimulation dans certaines situations cliniques, en général elle en retarde d'autant son efficacité. La deuxième phase entraîne un effondrement des sécrétions de gonadotrophines, c'est ce que l'on appelle la désensibilisation. En effet, il faudra attendre au moins une dizaine de jours pour obtenir une désensibilisation, mettant l'hypophyse et par voie de conséquence l'ovaire au repos. Enfin, à partir de là, la troisième phase permet la programmation du démarrage de la stimulation et donc de l'ovulation. Ce facteur est primordial pour décider et choisir le jour du déclenchement.

Grâce à la programmation et aux excellents résultats obtenus relativement rapidement, l'utilisation des agonistes s'est largement imposée dans tous les centres d'AMP. Les agonistes ou analogues du GnRH ont été les premiers à être utilisés en clinique dans les années 1980. Auparavant, la réalisation de la FIV se faisait dans l'urgence, la ponction était réalisée quand l'ovulation survenait, avec le risque de la manquer, d'annuler la ponction (dans 20 % des cas) et de devoir attendre le cycle suivant. Le recours aux agonistes a vraiment constitué un progrès. Cette programmation du recueil d'ovocyte, elle-même à l'origine du développement à plus large échelle de la FIV, a permis de déterminer le début de la stimulation, le moment du déclenchement et de la ponction avec cette fois seulement 2 % d'annulations, d'accroître le nombre d'ovocytes prélevés, donc d'embryons pour le transfert ou la congélation, enfin à terme, d'augmenter les chances de succès.

Cette désensibilisation est réalisée soit avec un agoniste à doses quotidiennes injectables ou intranasales, soit avec un agoniste retard. Du fait du temps nécessaire pour obtenir cette désensibilisa-

tion, l'introduction de l'agoniste se fera plusieurs jours avant le démarrage de la stimulation elle-même, environ 10 jours à 3 semaines avant.

Les agonistes du GnRH ont connu une évolution favorable quant à leur galénique avec la mise au point de formes injectable et intranasale (qui reste d'un usage confidentiel en France). Les formes injectables sont à effet immédiat ou bien retardé.

Les plus communément utilisés en France sont le Décapeptyl Retard 3 mg®, le Décapeptyl quotidien à 0,1 mg, le Gonapeptyl® 3,75 mg très récemment et la busériline par voie sous-cutanée ou le Synarel® qui, lui, est utilisé par voie nasale mais reste peu prescrit en France.

Cependant, dans le protocole le plus prescrit (protocole long), l'utilisation des GnRH-a augmente la durée de la stimulation ovarienne (puisque une période de 2 à 3 semaines est nécessaire pour obtenir la désensibilisation), la quantité de gonadotrophines nécessaires et le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (HSO). La période de désensibilisation est de plus associée à un ensemble d'effets secondaires liés à la carence œstrogénique (bouffées de chaleur, maux de tête, saignements, sécheresse vaginale) (2).

Antagonistes du GnRH

C'est dans ce contexte que l'arrivée des antagonistes de la GnRH était très attendue. Ils agissent également en continu sur les récepteurs de la GnRH, mais ont une action immédiate, ce qui a pour effet d'entraîner une chute des taux de FSH et de LH dès la première injection. Dans ces conditions, puisqu'il n'est pas nécessaire d'attendre la phase de désensibilisation comme les agonistes, ils sont utilisés en moyenne ou fin de phase folliculaire au moment où le risque d'ovulation prématurée est possible. Ils sont même capables d'interrompre un pic prématuré de LH qui débute.

Deux composés différents sont disponibles : le cetrotex (Cetrotide®, Serono), et le ganirelix (Orgalutran® ou Antagon®, Organon). Deux schémas thérapeutiques ont été proposés (dans la littérature) pour l'utilisation des antagonistes du GnRH dans la stimulation ovarienne en vue de FIV.

Dans le protocole doses multiples, des doses faibles (0,25 mg) d'antagonistes du GnRH sont injectées au milieu de la phase folliculaire (3). Dans le protocole dose unique, une dose plus importante (3 mg) est injectée en fin de phase folliculaire au moment du risque le plus important de pic de LH (4). Le traitement s'avère de prime abord plus simple, plus confortable et moins risqué pour la patiente, au prix de résultats conceptionnels au mieux équivalents après un monitoring plus délicat qu'avec les agonistes. En dehors de la place même des antagonistes

dans la stratégie de FIV, c'est le monitoring de cette stimulation qui pose problème. Bien loin de se réduire à une simple stimulation par les gonadotrophines où le risque de pic intempestif de LH serait simplement supprimé, il est vite apparu aux utilisateurs que le recours aux antagonistes aboutissait à une stimulation totalement différente, et donc nécessitant un certain apprentissage. Les praticiens ont effectué celui-ci à partir de leur propre expérience, et de la littérature qui reste encore contradictoire sur bien des points. Autant les agonistes ont connu rapidement une quasi-homogénéité de l'utilisation allant de paire avec les résultats escomptés, autant les antagonistes n'ont pas encore trouvé leur équilibre bien que sans contexte ils ont un avantage certain chez une grande population de patientes et cela pour diverses raisons.

Antioestrogènes et gonadotrophines (Annexe 1)

Citrate de clomifène

Bien que conçu en 1956 et ayant fait l'objet de plus de 8 000 publications, le citrate de clomifène reste encore mystérieux de par certains de ses mécanismes d'action. Son intérêt clinique n'est cependant pas contestable et il est considéré à juste titre comme le premier agent thérapeutique à recommander dans l'induction d'ovulation. Néanmoins, ses effets secondaires ne doivent pas être méconnus et impliquent certaines précautions lors de sa prescription.

Structure chimique et mécanisme d'action

Le clomifène appartient à la famille des « triphényléthylènes », composés chimiques qui interagissent avec les récepteurs des œstrogènes. La nature de l'effet exercé est le plus souvent de type antagoniste (antioestrogène) mais comme nous le verrons un effet de type œstrogène-like s'exerce également dans certains tissus. Le citrate de clomifène agit de façon quasi physiologique en initiant artificiellement la séquence des événements hormonaux qui se succèdent au cours de la phase intercycle.

Chez les femmes ovulant régulièrement, cette période débute en fin de phase lutéale par la chute des sécrétions d'œstradiol, de progestérone et d'inhibine A. Ces produits sécrétés par le corps jaune interviennent dans le feedback négatif exercé par l'ovaire sur l'hypothalamo-hypophyse pendant la phase lutéale. La diminution de la sécrétion de progestérone libère la sécrétion pulsatile de GnRH dont la fréquence s'accélère. Grâce à la diminution de l'œstradiol et un moindre degré de l'inhibine A, cet effet sur la GnRH induit une reprise préférentielle de la sécrétion de FSH tandis que celle de

LH n'est pas modifiée. Cela permet aux follicules les plus mûrs d'avancer dans leur maturation et de former la cohorte de follicules sélectionnables dont sera issu le follicule dominant. En stimulant la production d'inhibine B par des follicules de la cohorte, l'élévation inter-cycle de la FSH provoque de façon différée sa propre extinction car l'inhibine B est un puissant agent de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de FSH.

Cette séquence intercycle permet le rebond « d'un cycle à l'autre » qui ne se produit plus chez les femmes souffrant d'une anovulation. Le citrate de clomifène est un excellent moyen de relancer ce phénomène. En tant qu'antioestrogène, l'effet classique du citrate de clomifène est d'inhiber le rétrocontrôle négatif qu'exerce l'œstradiol sur la sécrétion de FSH et donc d'imiter les effets physiologiques de sa chute en fin de phase lutéale. Cela suppose d'une part l'accélération de la pulsativité de la GnRH (*via* des mécanismes encore incertains) et, d'autre part, un effet direct sur l'hypophyse dont l'existence est soupçonnée par des expériences sur culture hypophysaire.

L'administration de citrate de clomifène initie une élévation rapide des taux de FSH telle qu'elle se produit au cours d'une période inter-cycle naturelle, suivie d'une montée des taux d'inhibine B. Dès lors, les taux de FSH vont ensuite diminuer avant même la fin de la séquence thérapeutique qui dure habituellement 5 jours. Cependant, le mimétisme avec la phase intercycle naturelle n'est pas parfait car le citrate de clomifène induit de façon concomitante une élévation de la sécrétion de LH, pouvant parfois être délétère sur la maturation folliculaire et ovocytaire car elle se prolonge volontiers au-delà de la séquence thérapeutique.

Son action au niveau de l'utérus se situe à deux niveaux :

- réduction de la sécrétion de mucus cervical observée de longue date en clinique ;
- effets endométriaux : développement irrégulier de l'endomètre avec œdème du stroma responsable d'une asynchronie de maturation pouvant perturber le processus d'implantation. Si ces effets utérins sont probablement le fait d'une action antioestrogénique du citrate de clomifène, on ne peut exclure qu'il puisse être lié à un effet propre de la molécule.

Bases physiopathologiques des indications du citrate de clomifène

Les principaux mécanismes d'action du citrate de clomifène qui viennent d'être rappelés aident à comprendre les bonnes et les mauvaises indications du citrate de clomifène (5).

En effet, il ne peut rétablir un dialogue efficace entre l'hypothalamo-hypophyse et les ovaires si l'un et/

ou l'autre système ne peuvent s'exprimer. L'hypothalamo-hypophyse doit être intact d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Le citrate de clomifène n'a donc pas d'indication chez :

- les patientes en situation de préménopause avec un taux de FSH plasmatique déjà élevé ;
- les patientes présentant une hyperprolactinémie pour laquelle les agents dopaminergiques sont plus logiques et plus efficaces puisque, dans ce cas-là, l'hyperprolactinémie est responsable d'une inhibition fonctionnelle de l'hypothalamus gonadotrope ;
- les patientes présentant une pathologie tumorale hypothalamique ou hypophysaire ;
- les patientes présentant une imprégnation œstrogénique de base trop faible pour que l'effet antioestrogénique hypothalamique du citrate de clomifène puisse s'exercer. C'est typiquement le cas de l'anovulation hypothalamique fonctionnelle sévère où les taux de LH et de FSH sont effondrés. Une telle situation est actuellement reconnue par un test aux progestatifs qui juge de la sécrétion endogène d'œstradiol, l'absence de règles attestant d'une hypo-œstrogénie.

L'indication idéale pour le citrate de clomifène est donc celui de l'*anovulation normo-œstrogénique eugonadique* avec rapport LH/FSH normal ou augmenté (classe II de l'OMS). Dans tous ces cas d'anovulation eugonadique (anovulation hypothalamique peu sévère, SOPMK, anovulation idiopathique), la folliculogenèse est normale, voire augmentée, jusqu'au stade des follicules de classe V (2 à 5 mm) dits immédiatement sélectionnables.

Le citrate de clomifène, enfin, n'a pas sa place dans le traitement des stérilités inexplicables chez les femmes normo-ovulantes où les taux de grossesses spontanées sont altérés par l'utilisation du citrate de clomifène.

Il n'a pas non plus sa place dans les insuffisances lutéales ni dans le traitement des simples dys-ovulations par folliculogenèse tardive inadéquate. Dans ces cas-là, il peut, par l'augmentation de la LH, provoquer une lutéinisation prématurée.

Effets secondaires

Des effets secondaires mineurs ont été décrits après administration de citrate de clomifène, tels des troubles visuels qui peuvent être gênants mais tout à fait réversibles. En fait, une des préoccupations principales, plus récemment mise en évidence, se situe dans le risque potentiel d'induire un cancer ovarien ou une tumeur épithéliale « border line » de l'ovaire. Il est particulièrement recommandé au prescripteur de ne pas prolonger l'utilisation de citrate de clomifène au-delà de 6 à 9 mois, si la grossesse n'est pas obtenue. Il est alors tant d'envisager le recours aux gonadotrophines exogènes.

Gonadotrostimulines et gonadotrophine chorionique

Les gonadotrophines stimulantes sont de deux types :

- d'origine humaine ; *human menopausal gonadotrophine* (HMG) contenant de la FSH et de la LH en taux équivalents (ménotropine) ;
- purifié *i.e.* contenant de la FSH et moins de 1 unité de LH (urofollitropine) ; hormones recombinantes RH-FSH, follitropine alpha ou bêta.

Gonadotrophines humaines stimulantes

D'utilisation ancienne, plus de 30 ans, elles sont d'origine humaine, plus précisément des urines de femmes ménopausées. Elles présentent une combinaison de FSH et de LH dans un rapport théorique 1/1 mais contiennent également des protéines urinaires non spécifiques. Son activité LH est essentiellement liée à la présence d'hCG. Elles ont comme propriété de stimuler la croissance folliculaire, permettant ainsi une maturation de l'ovocyte. Leur injection se fait par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Aujourd'hui, seul le Menopur® (laboratoires Ferring) est disponible pour le prescripteur français par voie sous-cutanée.

FSH hautement purifiés

Il s'agit d'une génération de produits plus récents, également d'origine humaine (urines), la purification repose sur des anticorps monoclonaux permettant par les propriétés d'immunoaffinités de la FSH un haut taux de purification. Celle-ci peut s'établir à 90 % de pureté, comparée au moins de 2 % dans le cadre de la FSH d'extraction urinaire sans ces techniques de purification. L'administration sous-cutanée peut donc se faire et la constance de produits actifs est mieux établie. Enfin, la présence de protéines autres d'origine humaine est extrêmement réduite. Par là même, la bioactivité de ces nouvelles FSH est plus importante que celle des anciennes FSH disponibles, toutefois ces produits présentent une activité résiduelle de type LH notable. Aujourd'hui, seul le Fostimon® (laboratoires Génévrier) est disponible pour le prescripteur français.

FSH recombinantes

Leur production repose sur l'utilisation de lignées de cellules d'ovaire de hamster portant sur des plasmides les gènes qui codent les deux chaînes protéiques de la protéine de la FSH. Il n'y a plus dans ces préparations de protéines humaines d'origine uri-

naire d'une nature inconnue. Par ailleurs, aucune activité LH n'est présente ; enfin l'activité spécifique est maximale. Deux produits sont actuellement sur le marché : l'alphafollitropine Gonal-F® (laboratoires Merk Serono) et la bêtafollitropine Puregon® (laboratoires Schering Plough). La voie de l'administration est sous-cutanée.

LH recombinante

La LH recombinante est obtenue dans les mêmes modalités que la FSH recombinante. Elle s'injecte par voie sous-cutanée et est essentiellement associée à l'administration de FSH recombinante. Un seul produit est sur le marché actuellement : Luveris® (laboratoires Merk Serono).

FSH-LH recombinante

Depuis 2009, la combinaison de 150 unités de RH-FSH pour 75 unités de RH-LH a fait son apparition sous le nom de Pergoveris® (laboratoires Merk Serono). C'est le premier produit recombinant qui allie les deux molécules dans une proportion de 2 pour 1 à l'inverse de HMG qui a un rapport de 1 pour 1.

Les indications sont globalement les mêmes que pour l'HMG. Il est encore trop jeune sur le marché pour pouvoir dire si cette combinaison apporte une amélioration particulière dans les traitements de stimulation et si de nouvelles indications vont apparaître.

Gonadotrophines chorioniques

Ces produits utilisés sont essentiellement les gonadotrophines chorioniques dont l'association est obligatoire avec une stimulation afin de pouvoir déclencher l'ovulation. On peut l'utiliser seule cependant dans le cadre de maturation *in vitro* et dans le cadre des cycles strictement spontanés. Elles peuvent être d'origine humaine, extraites d'urine de femmes enceintes, l'administration se fait par voie intramusculaire mais la voie sous-cutanée est possible Gonadotrophine chorionique® (laboratoires Schering Plough), elles sont dosées à 1 500 ou 5 000 unités. Une hCG recombinante est aussi accessible avec injection en sous-cutanée : Ovitrelle® (laboratoires Merk Serono).

Principe et indications de l'utilisation des gonadotrophines

L'induction physiologique de l'ovulation implique une séquence précise d'événements permettant

l'émission d'un ovule et sa transformation en ovocyte à partir d'un follicule qui sera transformé, si la fécondation a lieu, en un corps jaune gravidique. Deux phénomènes caractérisent la maturation folliculaire :

- le recrutement se fait entre le 1^{er} et le 5^e jour du cycle à partir de follicules antraux. Loin d'avoir une conception uniquement mensuelle de la croissance folliculaire, les follicules se préparent à pouvoir mûrir deux cycles avant le cycle observé ;
- la sélection du follicule dit dominant : ces mécanismes sont complexes et font bifurquer certains follicules vers l'atrésie sur un cycle physiologique. C'est à partir du 7^e jour qu'une dominance dans les follicules est observée. Il va de soi qu'en se rapprochant le plus possible de ces profils hormonaux on peut comprendre l'efficacité des traitements. On sait, en revanche, que le recrutement et la sélection sont multifactoriels et doivent donc inciter à la prudence en ce qui concerne des raisonnements plus théoriques que pratiques.

Indications principales

La définition même des inducteurs de l'ovulation montre que leur indication principale est d'induire une ovulation. Ainsi, les patientes qui ovulent spontanément ne devraient pas bénéficier d'un tel traitement.

AMM des différents produits

FSH recombinante de dernière génération :

- anovulation avec dystrophie ovarienne polykystique ;
- hyperstimulation ovarienne contrôlée (HOC) pour FIV.

FSH hautement purifiée :

- stimulation de la croissance folliculaire chez les femmes atteintes d'un dysfonctionnement hypothalamo-hypophysaire avec spanioménorrhée ou aménorrhée après échec de stimulation par citrate de clomifène ;
- ovaires polykystiques, FIV ;
- HMG : indication supplémentaire qui est la stérilité par insuffisance de production de glaire.

En reprenant ces différents intitulés des AMM, on s'aperçoit que les indications devront donc être mesurées et n'être posées qu'après un bilan hormonal étiologique parfait.

Quelles indications ?

Hors FIV

Rappel de la classification de l'OMS :

- Type 1 : Association d'une hypo-œstrogénie et de taux d'hormones gonadotropes normaux ou bas

(test aux progestatifs négatif). Ceci correspond à une inertie fonctionnelle de l'axe gonadotrope d'origine suprahypophysaire. Ces patientes, sans hémorragie de privation spontanée ou induite, présentent un tableau d'aménorrhée hypothalamique dont le degré peut être précisé par un test au LH-RH.

- Type 2 : Il persiste une certaine sécrétion œstrogénique (test au progestatif positif). Selon le taux des hormones gonadotropes de base on distingue :

- le type 2a où les taux de FSH et de la LH sont ceux d'un début de phase folliculaire. Selon la réponse au test au citrate de clomifène, le traitement est différent ;
- le type 2b où la LH est supérieure à la FSH en début de phase folliculaire avec des androgènes élevés. C'est le syndrome des SOPK qui relève en premier lieu d'un traitement par citrate de clomifène. Le test au LHRH confirmerait l'extrême sensibilité de l'hypophyse.

Quatre vingt cinq pour cent des patientes sont classées en groupe II, mais en fait les dosages hormonaux sont quelquefois variables et les critères pour les SOPK sont controversés.

- Type 3 : Ce sont les différents stades de l'insuffisance ovarienne, dont la première manifestation est l'augmentation de l'œstradiol qui est le reflet d'une augmentation inhabituelle de la FSH en phase pré- et permenstruelle. Ces patientes présentent par conséquent des cycles courts avec des phases folliculaires brèves (10 jours). Le stade ultérieur associe cette fois une élévation de la FSH à j3 et un taux d'œstradiol normal qui traduit la résistance de l'ovaire à l'action de la FSH endogène.

Prise en charge des anovulations après échec des thérapeutiques de première intention

Dans l'anovulation de type 1, l'administration pulsatile de GnRH (pompe à LhRH), en particulier lorsque le déficit en GnRH est profond, est d'efficacité remarquable. En cas d'échec, l'utilisation aux HMG (Menopur®) est à l'heure actuelle la seule licite.

Dans l'anovulation de type 2, l'administration de citrate de clomifène permet souvent d'induire une ovulation à moindre frais. En cas d'échec de cette thérapeutique, les protocoles retenant la FSH hautement purifiée ou la FSH recombinante semblent les plus logiques comme les résultats le confirment.

Dysovulations avec insuffisance lutéale dans le cadre d'une folliculogénèse inadéquate

Dans ce cas-là, l'utilisation de petites doses de FSH à partir de j8 afin de ne pas initier un recrutement multifolliculaire est licite.

Optimisation de l’ovulation dans le cadre de la programmation d’une insémination intra-utérine

L’optimisation d’une ovulation en cas d’insémination intra-utérine (IIU) concerne dans la plupart des cas, des patientes normo-ovulantes dont l’origine de l’infertilité n’est pas claire : idiopathique, qualité du sperme limite mais compatible avec une IIU, endométriose légère, pathologie tubaire non obstructive. Les gonadotrophines sont les seules thérapeutiques recommandées à des doses faibles entre 37,5 à 75 UI dans la plupart des cas pour ne faire émerger qu’un voire deux à trois follicules maximum. Le but est de provoquer une croissance folliculaire, de déclencher une ovulation pour une insémination de sperme préparé au bon moment et ainsi faciliter la rencontre des gamètes. Le processus de fécondation étant *in vivo*, le risque de grossesses multiples s’accroît au nombre de follicules stimulés. Il faut donc être d’une grande prudence quant aux doses de gonadotrophines utilisées et bien connaître le profil hormonal de la patiente.

Indications de FIV/ICSI

Hyperstimulation contrôlée (HOC) dans le cadre de la programmation d’une FIV ou ICSI.

Pharmacocinétique et résultats

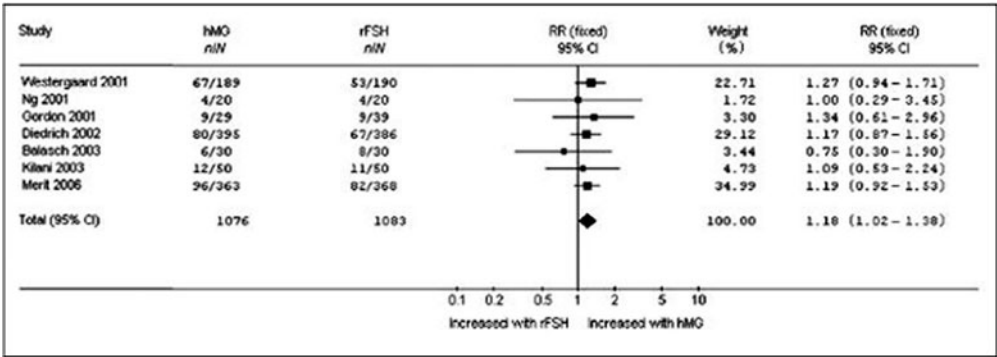
Les propriétés pharmacocinétiques des gonadotrophines ont fait l’objet de nombreuses études. La demi-vie de la FSH urinaire après administration intramusculaire dépasse 40 heures. La demi-vie de la RH-FSH après administration intramusculaire ou sous-cutanée est équivalente, environ 37 heures. Quelle que soit la dose quotidienne utilisée, il faut 5 à 6 jours pour obtenir une concentration plasmatique stable de FSH. Cela implique pour le praticien d’attendre pour juger de l’efficacité d’une dose thérapeutique d’autant plus que les variations interindividuelles dans la réponse ovarienne sont considérables.

Si les différentes études ont montré l’efficacité des HMG dans le cadre des anovulations hypogonadiques-hypogonadotropes, la supériorité de rFSH par rapport à uFSH, aussi bien dans les protocoles de stimulation que dans les protocoles d’hyperstimulation en FIV, est loin d’être démontrée. De récentes méta-analyses tendent tout de même à montrer que, dans le cadre du protocole *chronic low dose*, la durée de stimulation et le nombre d’ampoule sont diminués avec l’utilisation de FSH recombinante pour un taux de grossesse identique. Les différentes publications depuis plus d’une dizaine d’années, discutent et disputent la supériorité d’un traitement sur un autre (6, 7). Ce sujet reste à l’heure actuelle très controversé. Il n’en reste pas moins que ces deux produits (hMG et FSH recombinante) sont efficaces et trouvent leur place en fonction du profil des patientes. En effet, la place revenant à l’heure actuelle aux HMG est loin d’être négligeable, notamment dans le domaine de la PMA avec l’utilisation des analogues de la LH-RH (tableau I).

Précautions d’emploi et les dangers des gonadotrophines

Tous ces produits peuvent être dangereux s’ils sont mal utilisés ou mal prescrits. Le syndrome d’hyperstimulation (SHO) est le danger le plus important et le plus fréquent d’un tel traitement. Dans le cadre des IIU, il est dû essentiellement à une insuffisance de monitoring, aussi bien échographique que biologique. Plus que le risque de SHO, ce sont les grossesses multiples qui doivent être minorées en s’abstenant de déclencher l’ovulation lorsque le traitement a recruté plus de deux follicules. Le déclenchement de l’ovulation n’est envisageable qu’en l’absence de développement multifolliculaires et lorsque le follicule dominant a atteint sa maturité (diamètre moyen de 18 mm). L’utilisation des gonadotrophines en pratique clinique, qu’il s’agisse d’une optimisation de l’ovulation ou d’une induction mono-paucifolliculaire, sous-

Tableau I – Méta-analyse de Coomasamy *et al.* (7).



Test for heterogeneity (Chi-square test): *P*=0.97.
Test for overall effect: *P*=0.03.

entend un monitoring échographique rigoureux. L'appréciation de la qualité de la glaire, de l'endomètre et du taux d'œstradiol sécrété par le follicule préovulatoire permet de déterminer au mieux le moment de l'injection d'HCG. Dans les inductions difficiles, notamment dans le syndrome des ovaires polykystiques, une surveillance attentive aussi bien échographique que biologique reposant sur le dosage des 17β -œstradiol et de la LH, devra être proposée aux patientes afin d'éviter les risques d'hyperstimulation dépassant le cadre admis.

En FIV, l'hyperstimulation ovarienne augmente le nombre d'ovocytes recueillis, le nombre d'embryons disponibles pour le transfert et ainsi les chances de grossesse. De plus, grâce à l'utilisation des analogues de la GnRH, elle diminue les annulations de cycle par pic prématuré de LH, les ponctions blanches et elle facilite la programmation des patientes pour optimiser l'organisation des centres d'AMP.

En pratique, la prescription d'une stimulation de l'ovulation doit tenir compte du profil hormonal de la patiente, de l'indication, des résultats des cycles des traitements précédents quand ils existent :

- L'âge avancé, s'il ne constitue pas en soi une contre-indication à la stimulation sauf en cas de FSH constamment élevée, nous laisse supposer le déclin des performances. On sait qu'à partir de 38 ans, même en cas d'ovulation normale, l'âge doit être pris en compte dans les stratégies thérapeutiques mises en place chez ces patientes.
- Le poids joue un rôle important, dans le cas idéal, il ne faudrait entreprendre une stimulation de l'ovulation que chez les patientes dont l'IMC est normal. L'insuffisance de poids est souvent associée à un contexte psycho-existential difficile. En cas d'obésité, la réponse aux inducteurs de l'ovulation est souvent éteinte.
- Les dosages hormonaux faits en début de cycle comprennent FSH, LH, œstradiol, hormone anti-müllerienne (AMH), TSH et prolactine.
- L'aspect échographique des ovaires (aspect microkystique, etc.), un compte de follicules antraux (CFA) compris entre 2 et 7 mm.
- La réponse aux traitements antérieurs quand ils existent.

Ces prérequis vont permettre de supposer la réserve ovarienne de la patiente et de décider du traitement le plus adéquat pour la stimuler de façon à obtenir environ une dizaine de follicules tout en ne prenant pas le risque d'un SHO. Le praticien doit gérer l'équilibre qui n'est ni facile ni anticipable à chaque fois.

La pratique d'une induction de l'ovulation hors FIV ou en FIV, qu'il s'agisse d'une induction par citrate de clomifène ou par gonadotrophines doit répondre à plusieurs objectifs :

1. Optimiser le taux de grossesses par cycle (notion de coût).

2. Éviter les hyperstimulations et les grossesses multiples : il apparaît donc comme indispensable de réaliser avant toute induction un bilan sur la stérilité du couple, de choisir le produit inducteur le mieux adapté au but recherché et au statut hormonal. Il faut réaliser, quel que soit le traitement de stimulation, un monitoring échographique et hormonal.

3. Réévaluer les couples en cas d'échec et ne pas s'acharner sur une seule technique.

Dans le cadre des stimulations simples ou avec IIU, il faut respecter les pratiques de l'induction monofolliculaire en sachant interrompre les cycles sans recruter plus de deux follicules dominants.

S'il existe des échecs au traitement, il faut réévaluer le couple et savoir passer en temps voulu à d'autres traitements.

Monitoring de l'ovulation

Tout traitement d'induction ou de stimulation de l'ovulation doit être monitoré par des échographies et/ou des dosages hormonaux et ceci sans exception. Ce monitoring consiste à évaluer la réponse ovarienne au traitement de stimulation par échographie en comptant le nombre et la taille des follicules totaux ainsi que la qualité et l'épaisseur de la muqueuse utérine, associé à un dosage de l'œstradiol, de la LH et parfois de la progestérone.

Dosages hormonaux

L'œstradiol plasmatique mesure la sécrétion des follicules visualisés à l'échographie et évalue le risque d'hyperstimulation.

La LH détecte le pic d'ovulation précoce ou adapté. La progestérone peut être dosée dans certains cas : des taux anormalement élevés (supérieurs à 1,5 ng/mL) peuvent révéler une lutéinisation prématurée et éclairer le déroulement inexplicablement défavorable d'une stimulation.

Échographie

Elle se fait de façon obligatoirement par voie transvaginale, cette méthode étant fiable pour apprécier la taille et le volume folliculaire ainsi que le nombre de follicules en croissance et apprécier la réceptivité endométriale. Le bilan échographique en cycle de témoin au troisième jour étudie la taille, le nombre, et la répartition des follicules en début de cycle et apporte des notions prédictives sur la réponse ovulaire à la stimulation en discriminant les futures mauvaises répondeuses ou les hyper-répondeuses. Pendant la stimulation, l'échographie détecte la sélection et la dominance d'un ou plusieurs follicules.

Détecter la maturité ovocytaire pour prescrire en temps adéquat l'injection d'HCG est l'élément final de ce monitoring. Cette maturité peut être appré-

ciée par le dosage de l'œstradiol associé au volume folliculaire. Il est admis qu'un follicule préovulatoire s'accompagne d'un taux d'œstradiol entre 200 et 300 pg. Parallèlement, l'endomètre s'épaissit (supérieur à 6 mm) et prend l'aspect typique préovulatoire en triple ligne. Cet aspect permet de différencier un follicule mature d'une image kystique non sécrétante. La plupart des données de la littérature s'accordent à dire qu'en deçà de 7 mm, les chances de grossesses sont moins bons, l'aspect de l'endomètre reste cependant primordial.

L'échographie permet également de dépister les complications (SHO) et les échecs (atrésie folliculaire) pendant la stimulation.

Le monitoring complet est obligatoire lors de l'utilisation de la FSH car la réponse au traitement est variable d'une patiente à l'autre et d'un cycle à l'autre chez la même patiente. Il ne faut pas oublier également que, lors de l'utilisation de la FSH, la dose efficace est proche de la zone dangereuse. La posologie et la durée du traitement étant imprévisibles, la prescription de schémas thérapeutiques préétablis sans contrôle est absolument interdite. Il n'y a pas de petites stimulations, c'est pourquoi toutes sans exception doivent être suivies avec attention. Quelle que soit la méthode de surveillance proposée, même si elle n'est qu'échographique, elle doit exister (8, 9). C'est dans ces conditions qu'à la fois on optimise les résultats tout en diminuant les risques de complications.

Stimulation ovarienne

Hors AMP

Utilisation clinique du citrate de clomifène

Le citrate de clomifène s'utilise sous la forme d'une brève séquence de cinq jours. Il n'y a aucun avantage à débiter tardivement cette séquence, elle doit être initiée dès j1 ou j2. La posologie de départ est de 50 mg au besoin augmentée de 50 mg par jour, cycle après cycle, jusqu'à obtention de la dose permettant l'ovulation. Certains considèrent qu'il est inutile d'aller au-delà de 150 mg par jour en cas d'échec, d'autres apportent des résultats intéressants à 200 voire 250 mg par jour. L'intérêt de prolonger la séquence au-delà de 5 jours est encore plus controversé. Enfin, dans de rares cas, il peut se produire une hyperstimulation dès le premier cycle de traitement, imposant le recours à la posologie d'un demi-comprimé par jour le cycle suivant.

Stratégie de surveillance :

- dosage de LH et FSH le jour suivant la dernière administration de CC et seulement le 1^{er} cycle

pour détecter une élévation trop importante de LH, délétère pour la maturation de l'ovocyte ;

- échographie au 12^e ou 13^e jour du cycle avec mesure du diamètre folliculaire et de l'épaisseur endométriale ;

- test post-coïtal pour certains.

Un monitoring échographique simple est suffisant mais indispensable pour apprécier l'efficacité du CC et éviter la survenue de grossesses multiples dont les deux tiers sont liés à l'usage intempestif de citrate de clomifène.

Stimulations simples par gonadotrophines (10)

Le plus souvent, il s'agit de patientes présentant des anovulations (OPK ou insuffisance hypothalamo-hypophysaire) ou des dysovulations.

Protocole step-up

Son utilisation repose sur le principe du seuil de FSH. Il peut être conventionnel avec une augmentation de 75 UI de FSH par palier de 5 à 7 jours. Il peut être plus prudent avec de faibles doses progressives 50 U ou même 37,5 U dans certains cas pour démarrer (*chronic low dose*) et une augmentation de 37,5 UI de FSH par palier de 5 à 7 jours. Lorsque l'échographie met en évidence un follicule de 10 mm, la dose ne doit plus être changée. Ce dernier protocole est tout particulièrement recommandé pour le traitement des ovaires polykystiques car il expose moins au risque d'hyperstimulation. Ce risque n'est jamais totalement exclu, ce qui implique dans tous les cas de surveiller attentivement tous les cycles induits de cette manière. Une concentration plasmatique supérieure à 300 pg/mL avant que le follicule n'atteigne 14 mm de diamètre doit faire craindre une hyperstimulation et oblige une réduction des doses.

Protocole step-down

Son utilisation repose sur le principe de l'hypersensibilité à la FSH du follicule sélectionné. Après une dose de charge de 150 à 225 UI de FSH permettant de recruter une cohorte folliculaire, la posologie est réduite dès qu'apparaît le follicule dominant. Ce protocole semble donner de bons résultats dans les équipes qui l'utilisent mais il est de maniement beaucoup plus délicat. Le risque est de dépasser le seuil de FSH et d'ouvrir trop largement la fenêtre et, d'autre part, de réduire trop vite les doses en risquant l'atrésie de toute la cohorte.

Protocole séquentiel (protocole step-up/step-down)

Sur la base initiale du protocole initial de step-up, il propose de réduire de moitié les doses de gonadotrophines une fois que le follicule sélectionné est apparu. Il peut être très utile et permet de réduire significativement la concentration d'œstradiol préovulatoire et le nombre de follicules intermédiaires mesurant de 10 à 13 mm.

Il convient également de souligner que le taux d'œstradiol sous stimulation par FSH est plus faible à stimulation comparable que sous HMG. On retiendra un taux compris entre 150 et 250 pg/mL lorsque le follicule est mûr.

En pratique, le *chronic low-dose* :

– Premier cycle :

1 amp./jour pendant 7 jours, premier contrôle à j8 :

- réponse folliculaire discernable : maintenir la même dose et refaire un contrôle 2 à 3 jours plus tard selon la taille du follicule ;
- pas de réponse discernable : maintenir la dose pendant 7 jours supplémentaires et faire un contrôle à j15.

– Deuxième contrôle à j15 :

- réponse folliculaire discernable : maintenir la même dose et faire les contrôles ultérieurs selon la taille du follicule ;
- pas de réponse discernable : passer à 1,5 ou 2 ampoules et revoir à j22.

– Troisième contrôle à j22 :

- réponse OK : continuer même dose ;
- pas de réponse : continuer 1,5 ou 2 ampoules/j jusqu'à j29.

Cycles ultérieurs : même principe qu'au premier cycle, c'est-à-dire pas d'augmentation pendant 14 jours, la dose initiale étant choisie selon le résultat du cycle précédent :

- réponse optimale avec 1 ampoule, faire idem, 2^e palier éventuel 2 amp. ;
- pas de réponse avec 1 ampoule, réponse optimale avec 2 : faire 2 amp./jour ;
- pas de réponse avec 1 ampoule, réponse multifolliculaire avec 2 amp. : faire 1,5 amp. ;
- développement multifolliculaire avec 1 ampoule : faire ½ amp. ou ¾ amp.

En AMP

Insémination intra-utérine

Les traitements proposés sont des traitements par gonadotrophines recombinantes ou par FSH urinaires puisqu'il s'adresse en majorité à des patientes normo-ovulantes à LH normale. Les protocoles vus ci-dessus peuvent également s'appliquer et en particulier chez les patientes OPK. Le citrate de clomifène n'a pas de place en cas d'IIU.

Le traitement classique d'une patiente normo-répondeuse consiste en une injection allant de 37,5 à 75 unités à partir du 3^e jour du cycle ou 150 unités à j2, j4, j6, j8 moins contrôlable et plus rarement utilisé. Un contrôle par échographie et dosages hormonaux s'effectue au 9^e jour du cycle pour évaluer la réponse. En général, le déclenchement n'aura pas lieu avant le 11^e jour où un deuxième contrôle sera effectué (fig. 1). Il est possible de proposer un traitement de stimulation sous antagoniste pour éviter une ovulation

Stimulation un jour sur deux à partir de J2 de 150 UI de rFSH, uFSH



Stimulation par rFSH, uFSH de J3 J8 de 75 UI



Fig. 1 – Stimulation à partir de j2 de 150 UI de rFSH, uFSH.

prématurée, pour réduire les taux de LH de base dans le cadre des OPK ou pour programmer l'IIU et éviter le week-end (11). Les traitements avec antagonistes ont montré une augmentation des taux de grossesses mais au prix de grossesses multiples. L'intérêt n'est donc pas pour l'instant démontré.

En FIV/ICSI

Protocoles avec des agonistes de la GnRH

Protocoles longs

Les agonistes sont administrés de préférence à la fin de la phase lutéale (j21) pour accélérer la désensibilisation.

Pour l'agoniste retard, l'injection IM est unique et s'effectue en général entre le 1^{er} et le 4^e jour du cycle. La désensibilisation est obtenue au bout de 2 à 3 semaines, et persiste environ 6 semaines. Pour la forme rapide (prise quotidienne), l'effet inhibiteur apparaît souvent entre le 12^e et le 15^e jour. Il sera confirmé par un dosage de l'E2 (< 50 pg/mL), de la LH (< 3 UI/mL) et de la progestérone (< 1 ng/mL) et par une échographie mettant en évidence l'absence de kyste et la présence d'une muqueuse fine.

Les doses quotidiennes ont l'avantage de moins freiner l'ovaire, entraînent moins d'effets secondaires et, probablement, permettent une réponse plus rapide avec des doses moindres. La dose « dépôt » se fait en une seule injection, mais les besoins en gonadotrophines sont plus importants et les patientes se plaignent d'effets secondaires comme la baisse de la libido et les bouffées de chaleur. En termes de taux de grossesses, les résultats sont équivalents mais les études manquent de puissance (12).

En présence d'un kyste de l'ovaire sécrétant avec hyperœstrogénie, on peut soit le ponctionner, soit prolonger l'agoniste s'il est quotidien et refaire un contrôle plusieurs jours après. La stimulation ne sera démarrée que si le taux d'E2 baisse et si la muqueuse utérine devient fine.

Le début de la stimulation sera programmé en fonction de l'activité du centre d'AMP.

Certains protocoles utilisent des doses quotidiennes d'agonistes plus faibles pour éviter un blocage trop

fort de la sécrétion endogène des gonadotrophines (en général diminuées de moitié : Decapeptyl® demi-dose à 0,05 mg ou Busérlin® demi-dose à 0,3 mL). La stimulation commence le plus souvent entre 150 à 300 UI de FSH ou d'hMG selon l'évaluation de la fonction ovarienne et les réponses antérieures. Le premier contrôle se fait à j6 par un dosage de l'E2 et de la LH et une échographie endovaginale. Le taux d'E2 est alors idéalement entre 150 et 300 pg/mL et sa croissance sera de 30 à 50 % toutes les 24 à 48 heures. Dans certaines circonstances, l'échographie seule peut donner suffisamment de renseignements (nombre de follicules et taille, épaisseur de l'endomètre).

Un taux de LH autour d'une valeur seuil de 1,2 UI/L en cours de stimulation semble donner de meilleurs résultats en termes de taux de grossesse. Ainsi, lorsque la déplétion de LH induite par les agonistes est profonde, il est licite d'envisager un apport de LH recombinante (75 UI/j) ou d'hMG (13).

En cours de stimulation, le traitement peut être interrompu soit pour mauvaise réponse (faible recrutement folliculaire, ou chute des taux d'E2), soit pour risque de SHO.

Les agonistes quotidiens sont arrêtés le jour de l'HCG, il n'est pas nécessaire de faire une dernière injection le plus souvent.

Protocoles courts

Ils utilisent l'effet flare-up des agonistes de la GnRH qui consiste en une libération initiale de gonadotrophines hypophysaires.

L'agoniste est débuté au 2^e, 3^e jour du cycle et les gonadotrophines 2 à 3 jours plus tard. Ces protocoles limiteraient l'inhibition ovarienne et profiteraient de la stimulation supplémentaire due à l'effet agoniste initial. Ils favoriseraient le recrutement folliculaire chez les mauvaises répondeuses mais surtout, ils diminueraient la consommation de Gn et la durée du cycle.

Les études comparant les deux protocoles n'ont cependant pas montré de différence en termes d'efficacité. Les résultats médiocres obtenus pourraient s'expliquer par la réponse initiale de l'axe hypophyso-ovarien à l'administration de l'agoniste de la GnRH. En effet, des taux élevés de LH, de progestérone et de testostérone ont été retrouvés pendant la phase folliculaire lorsque l'agoniste est administré au début du cycle. Un traitement anovulant préalable, par progestatifs seuls ou une combinaison œstroprogestative le cycle précédant la stimulation, améliore le profil hormonal de la phase folliculaire et permet d'obtenir de meilleurs résultats en termes de taux de grossesse et de taux d'annulation des cycles.

Des doses d'agoniste plus faibles ont également été proposées. Ainsi, 25 à 50 µg d'acétate de leuprolide suffisent pour induire un effet flare sur la sécrétion de FSH et de LH (14).

Deux variantes ont été proposées :

- le protocole ultra-court : l'agoniste est administré pendant 3 jours afin d'éviter les pics de LH de la période préovulatoire tout en limitant la période réfractaire de l'hypophyse ; ils ne sont à l'heure actuelle plus utilisés ;
- le protocole mini-court : l'agoniste est donné pour 7 jours ce qui aurait pour effet de diminuer l'effet néfaste de l'analogue sur la maturation finale du complexe cumulo-ovocytaire. On constate cependant, à l'arrêt de l'analogue une décroissance du taux de LH et une stagnation du taux d'E2 dès le lendemain de l'arrêt.

Ces données incitent à poursuivre, lors des protocoles courts, la prescription de l'analogue jusqu'au déclenchement par HCG.

Les analogues ont amélioré le pronostic des cycles de FIV par le biais de deux mécanismes :

- la suppression de la lutéinisation prématurée attestée par une augmentation du taux de progestérone au-dessus de 0,9 ng/mL ; cette lutéinisation aurait des effets délétères sur la qualité ovocytaire et sur l'endomètre ;
- les effets de l'hypo-œstrogénie sur la réponse aux gonadotrophines. La mise au repos fonctionnelle de l'ovaire permet de synchroniser la cohorte folliculaire. Le seuil de FSH ne semble pas modifié par la prescription des agonistes (fig. 2, 3 et 4).

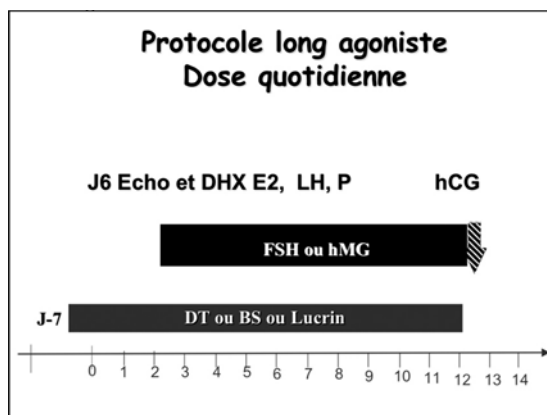


Fig. 2 – Protocole long agoniste, dose quotidienne.

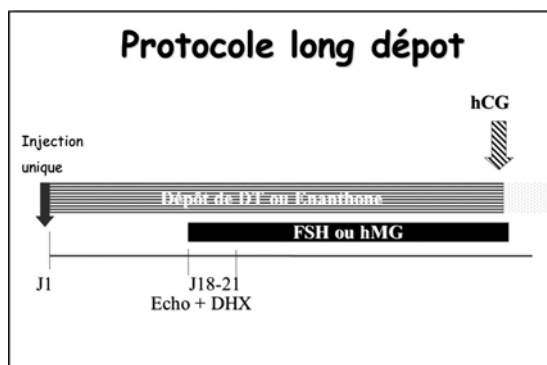


Fig. 3 – Protocole long.

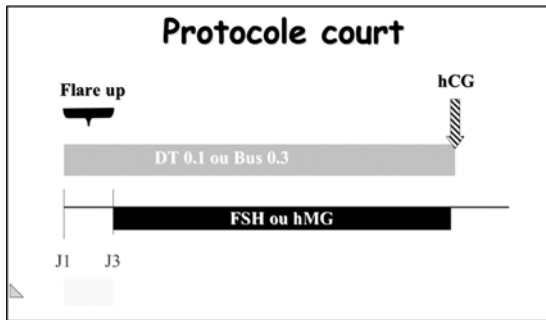


Fig. 4 – Protocole court.

Protocoles avec antagonistes du GnRH

L'administration des antagonistes du GnRH a été proposée en AMP selon deux protocoles : le protocole doses multiples, administrées à partir du 6^e jour de stimulation et poursuivies jusqu'à l'administration de l'HCG, et le protocole dose unique où l'antagoniste est injecté en fin de phase folliculaire (j7 ou 9 à 11) en tenant compte de la réponse à la stimulation (15, 16). Les travaux menés avec le Cetrorelix® et le Ganirelix® ont permis d'établir que la dose quotidienne minimale efficace pour prévenir toute augmentation de LH est de 0,25 mg. Le blocage des récepteurs du GnRH par les antagonistes entraîne une chute brutale des gonadotrophines plus marquée sur la LH que sur la FSH (demi-vie plus longue de cette dernière) associée à un moindre degré à la chute de l'œstradiol.

Dans le protocole à doses multiples, les gonadotrophines sont prescrites dès le 2^e jour du cycle et l'antagoniste peut être injecté à partir du 6^e jour de stimulation. La durée moyenne d'administration est de 4 à 5 jours.

Pour le protocole monodose (fig. 5), l'antagoniste est administré en une dose de 3 mg (Cetrorelix®) au 7^e jour de stimulation ou à partir du moment où le taux d'E2 atteint 400 pg/mL. Cette dose prévient tout pic de LH pendant 3 à 4 jours. Si le cycle

est prolongé, il est nécessaire d'utiliser des doses complémentaires de 0,25 mg jusqu'au déclenchement de l'ovulation.

La forte dose d'antagoniste (fig. 6) induit une chute brutale de LH et de FSH et une pause voire un infléchissement de la courbe de croissance de E2. L'augmentation des doses de gonadotrophines le jour de l'administration de l'antagoniste n'améliore pas le pronostic du cycle. Les réactions sont très variables selon les patientes avec parfois une décroissance plus prononcée et durable des taux de E2, traduisant sans doute des réserves en LH diminuées.

L'avantage de l'antagoniste est son utilisation en fin de phase folliculaire, ce qui a permis de le prescrire dans les cycles spontanés ou semi-spontanés. Ces cycles spontanés qui avaient été abandonnés après les échecs du démarrage de la FIV ont repris un intérêt d'une part pour limiter les risques de SHO et les grossesses multiples d'autre part grâce aux antagonistes. Il devenait intéressant de proposer cette technique en premier lieu aux patientes « bonnes répondeuses » car en supprimant le risque d'une ovulation spontanée, on redonnait à ces patientes une chance de grossesse certes assistée, mais à moindre frais physique et psychologique (17) (fig. 7).

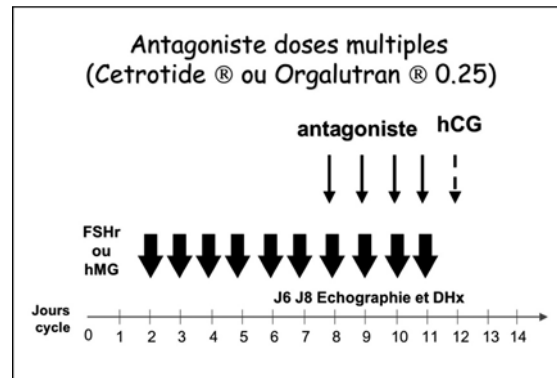


Fig. 6 – Antagoniste doses multiples.

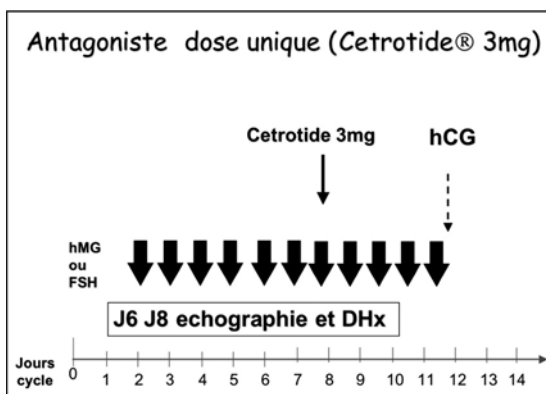


Fig. 5 – Antagoniste dose unique.

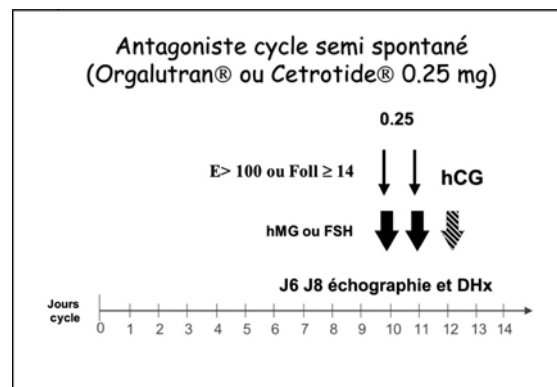


Fig. 7 – Antagoniste cycle semi-spontané.

Malgré une baisse du nombre d'ovocytes matures et d'embryons, les taux de conception des protocoles avec antagoniste sont comparables à ceux utilisant les analogues de la GnRH. En revanche, la consommation de gonadotrophines est diminuée, la durée de la stimulation est écourtée, et le taux d'E2 le jour de l'HCG est diminué. Ainsi, on améliore le confort des patientes et on diminue le risque d'hyperstimulation sévère.

Il avait été question, dans le but de diminuer les risques d'HSO sévère de déclencher par des agonistes (grâce au flare up). Les études qui ont été effectuées ont montré certes un déclenchement mais un effondrement des taux d'implantation. Cette technique est aujourd'hui déconseillée.

Il est nécessaire de compléter la phase lutéale du fait d'une chute prolongée de LH en période postovulatoire accentuée par l'injection de HCG. L'utilisation des antagonistes n'est pas encore tout à fait limpide et, contrairement aux agonistes, leur mode d'utilisation reste flou pour certains. Un temps d'apprentissage est nécessaire. Les résultats chez des patientes normo-répondeuses sont excellents, pour les patientes plus difficiles (SOPK ou mauvaises répondeuses) les modalités d'utilisation ne sont pas toujours claires. Les principales sont :

- À quel moment introduire les antagonistes : à date fixe vers le 6-7^e jour de stimulation ou de façon flexible dès qu'il existe un follicule de 12-13 mm et/ou un œstradiol supérieur 300 pg/mL ?
- À partir de quand peut-on déclencher l'ovulation à partir de trois follicules de plus de 17 mm ou dès qu'il existe trois follicules de plus de 17 mm ?
- Y a-t-il un avantage à utiliser les antagonistes en début de traitement à j1 pour diminuer les taux de LH comme dans les cycles sous agonistes ou chez des patientes OPK ?
- Du fait de la déplétion en LH, a-t-on besoin d'une supplémentation en LH en fin de phase folliculaire ?

Ceci en fait sa difficulté mais aussi sa richesse (18) (fig. 5 à 7).

Déclenchement de l'ovulation

Rappel de la physiologie de l'ovulation

Processus ovulatoire

L'ovulation consiste en la rupture du follicule mûr à son apex, laissant échapper par le stigma son

contenu avec l'ovocyte. Entre la décharge des gonadotrophines qui initie le processus et la rupture folliculaire, il s'écoule un intervalle de temps de l'ordre de 36 à 40 heures pendant lequel des changements irréversibles se produisent, réalisant le processus ovulatoire. La décharge préovulatoire, de LH et de FSH, est caractérisée par trois événements.

Maturation ovocytaire

D'une part, la maturation nucléaire qui se traduit par la reprise de la première division de la méiose de l'ovocyte du follicule dominant, bloqué au stade prophase de la première mitose du processus méiotique depuis la vie fœtale. La méiose s'arrête à la métaphase de la deuxième mitose (métaphase II) et reprendra son cours à l'occasion d'une éventuelle fécondation.

D'autre part, la maturation cytoplasmique avec la libération des granules corticaux dans l'espace périvitellin permettant d'éviter la polyspermie.

Rupture folliculaire

La rupture folliculaire avec expulsion de l'ovocyte résulte de modifications biochimiques responsables d'une fragilisation de la paroi du follicule et d'une augmentation de sa pression interne.

Une cascade d'événements successifs explique le temps de latence entre le début de la décharge de gonadotrophines et la rupture folliculaire. Une perturbation de ce processus peut aboutir à la non-rupture de la paroi : c'est le syndrome du follicule lutéinisé non rompu ou lutéinisation folliculaire sans rupture ovulatoire de la paroi avec ovocyte captif ou LUF syndrome.

Lutéinisation folliculaire

La lutéinisation folliculaire commence avant l'ovulation et s'accompagne de modifications de la granulosa. La fragilisation de la membrane basale permet l'invasion des cellules de la thèque interne à l'intérieur de la granulosa. Le processus de stéroïdogénèse se modifie, transformant la sécrétion dominante d'œstradiol en sécrétion de progestérone. Les deux types de cellules lutéinisées restent distincts : celles de la granulosa produisent des taux plus élevés de progestérone mais répondent peu à la stimulation par LH ou hCG, celles de la thèque sécrètent des taux plus faibles de progestérone mais sont fortement stimulables par ces gonadotrophines.

Déclenchement artificiel de l'ovulation

Au cours d'une stimulation ovarienne, en l'absence d'agonistes de la GnRH, une décharge spontanée de gonadotrophines présentant un profil physiologique peut se produire en présence d'un follicule

mûr et sous l'effet de taux croissants d'oestradiol plasmatique. Cette décharge de gonadotrophines (FSH et LH) peut assurer un processus ovulatoire de bonne qualité (c'est le type de réponse qui s'observe lors d'une stimulation efficace par citrate de clomifène mais également sous gonadotrophines) mais dont l'inconvénient potentiel est la programmation d'une insémination intra-utérine ou d'un prélèvement ovocytaire (protocole sans analogues) en raison de son caractère imprévisible (début de l'onde inconnue). En effet, aucun examen complémentaire ne permet de prédire le moment exact de l'ovulation (ni la courbe de température, ni le score cervical, ni l'échographie, ni le dosage de la LH). L'éventualité d'une décharge spontanée de gonadotrophines constitue également un des arguments au recours à une désensibilisation hypophysaire par un analogue de la GnRH lors d'une stimulation en vue d'une FIV, évitant l'interférence avec les gonadotrophines endogènes.

Ce déclenchement peut toutefois ne pas se faire spontanément, même en présence d'un follicule mûr, et être remplacé par des pics erratiques de gonadotrophines de faible amplitude et/ou de courte durée. Ces décharges sont alors incapables d'initier un processus ovulatoire complet, pouvant induire une lutéinisation prématurée du follicule (corps jaune inadéquate, asynchronisme de maturation endométriale), ou ré-initier prématurément la méiose, facteurs de mauvais pronostic conceptionnel.

C'est pourquoi l'ovulation doit généralement être déclenchée après stimulation par les gonadotrophines lorsque les paramètres de maturité folliculaire sont atteints. L'intérêt de déclencher l'ovulation après administration de citrate de clomifène n'est pas démontré, le pic de LH survenant spontanément. Le seul intérêt serait de connaître avec certitude la date de l'ovulation pour la programmation des rapports, mais on peut également proposer des rapports toutes les 48 heures du 10^e au 20^e jour du cycle. Pour certains, la fréquence de LUF syndromes inciterait cependant au déclenchement dans cette situation.

Moyens thérapeutiques du déclenchement

Dès les débuts des stimulations ovariennes en 1930, par PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*, gonadotrophines extraites de sérum de juments gravides et utilisées pour leur effet FSH), l'hCG a été utilisée pour le déclenchement de l'ovulation. Depuis, son utilisation n'a pas été fondamentalement remise en question, bien que de nombreuses différences existent entre l'hormone physiologique, la LH (en association avec la FSH) et l'hCG.

Nous aborderons successivement l'hCG (urinaire et recombinante), puis la LH endogène et la LH exogène.

hCG

hCG urinaire

L'hCG urinaire est extraite des urines de femmes enceintes. Son administration en présence d'un follicule mûr déclenche l'ovulation, quel que soit l'inducteur utilisé, grâce à son effet « LH like ». La rupture folliculaire, documentée par échographie, s'étale sur une période de temps assez large après injection intramusculaire d'hCG. Le délai moyen d'ovulation est de l'ordre de 40 heures, mais la rupture survient avant la 36^e heure dans 10 % des cycles et n'a pas encore eu lieu à la 48^e heure dans également 10 % des cycles. Ces données sont comparables à celles observées à partir du début de la décharge endogène préovulatoire.

Différences avec la LH

Il est intéressant de souligner les différences (de structure et de biodisponibilité) qui existent entre l'hCG et la LH, hormone principalement impliquée dans le processus ovulatoire (en association avec la FSH).

- *Différences de structure* : l'hCG et la LH sont des glycoprotéines dont le noyau polypeptidique est composé de deux sous-unités alpha et bêta. Les sous-unités alpha sont identiques pour les deux gonadotrophines (ainsi que pour FSH et TSH). Les sous-unités bêta de la LH et de l'hCG montrent, quant à elles, toutes deux une spécificité stricte pour le récepteur de la LH, mais il existe entre elles de nombreuses différences.
- *Différences dans la séquence d'acides aminés* : la bêta-hCG présente une chaîne peptidique carboxyterminale de 24 acides aminés supplémentaires.
- *Différences dans leur contenu en acide sialique* qui conditionnent le volume de la molécule, donc la rapidité de sa dégradation dans le foie et le rein, sa vitesse d'élimination rénale (clairance métabolique plus lente de l'hCG), et par conséquent la demi-vie plasmatique de l'hormone.
- *Différences de biodisponibilité* : la LH et l'hCG ont des demi-vies très différentes (demi-vie plasmatique de l'hCG prolongée) expliquées, entre autres, par la différence de taille de leur molécule. La demi-vie de l'hCG est environ trois fois plus longue que celle de la LH, de l'ordre de 30 heures. La courbe de disparition plasmatique de l'hCG comme celle de la LH est bi-exponentielle avec une phase initiale rapide d'environ 8 heures pour l'hCG (*versus* 20 à 45 minutes pour la LH), puis une phase lente d'environ 36 à 56 heures pour l'hCG (*versus* 10 heures pour la LH). La lente disparition plasmatique de l'hCG explique qu'il est

possible de la détecter 10 à 14 jours après une injection intramusculaire unique de 10 000 unités, à un taux suffisant pour perturber l'interprétation d'un test de grossesse. Toutefois, en l'absence de grossesse, le taux d'hCG au 10^e jour est en général inférieur à 10 % du taux à j0.

Hétérogénéité de l'hCG

L'hCG urinaire est très hétérogène, les préparations commercialisées peuvent contenir jusqu'à 45 % de fragments de chaînes à activité biologique réduite ou inexistante, avec de possibles variations de bioactivité d'un lot à l'autre.

Posologie d'hCG

La dose nécessaire et suffisante d'hCG pour déclencher le processus ovulatoire dans les différents types de stimulation a été peu étudiée. Il est toutefois bien établi que les différents événements du processus ovulatoire nécessitent des taux hormonaux différents pour se réaliser.

En stimulation multifolliculaire, l'étude d'Abdalla (19) montre que la dose de 10 000 UI ne comporte pas d'avantages par rapport à 5 000 UI, alors que des doses plus faibles (2 000 à 4 000 UI) peuvent être insuffisantes pour certaines patientes (absence de recueil ovocytaire).

En stimulation mono- ou paucifolliculaire, il est probable que de faibles doses sont suffisantes. Emperaire (20) a montré, dans une étude prospective, que la fréquence de la rupture folliculaire était comparable, que l'ovulation ait été déclenchée avec 1 500, 3 000 ou 5 000 UI d'hCG par voie intramusculaire. En pratique, la dose de 5 000 UI d'hCG paraît adéquate pour déclencher l'ovulation après stimulation mono- ou paucifolliculaire par les gonadotrophines, compte tenu des variations potentielles de bioactivité des lots et d'une grande variabilité interindividuelle entre les doses nécessaires pour obtenir une ovulation de bonne qualité. La dose de 10 000 unités après stimulations multifolliculaires en FIV/ICSI est communément admise et utilisée en France et dans le monde ; 5 000 unités pourraient suffire, toutefois, certaines patientes n'obtiendront pas une ovulation satisfaisante. Pour éviter une hyperstimulation ovarienne incontrôlable, la possibilité d'utiliser de plus faibles doses d'hCG peut paraître séduisant autant que les taux d'œstradiol ce jour-là sont élevés.

Compte tenu de la lente disparition plasmatique de l'hCG, une seule injection intramusculaire suffit pour obtenir un effet LH au moins comparable à celui d'une décharge endogène de LH. De la même façon, il est désormais acquis que l'administration d'une dose unique de 5 000 UI est suffisante pour assurer un déclenchement ovulatoire satisfaisant. La répétition des doses n'amé-

liore pas l'efficacité de l'ovulation mais expose particulièrement au risque de SHO et de grossesses multiples.

Voie d'administration

L'injection devra se faire en soirée, en général entre 21 et 23 heures, puisque la ponction ovocytaire doit être effectuée 36 à 40 heures après pour arriver avant la rupture folliculaire. C'est pourquoi la méthode par voie intramusculaire la plus utilisée laisse sa place à la voie sous-cutanée qui est aussi efficace et permet l'injection par la patiente elle-même.

hCG recombinante

Le développement de l'hCG recombinante, obtenue par génie génétique, a une bioactivité identique à l'hCG urinaire (demi-vies semblables d'environ 30 heures) avec les avantages de la reproductibilité d'un lot à l'autre et de l'homogénéité (absence de protéines contaminantes, de sous-unités bêta ou alpha libres, ou encore de fragments de bêta-hCG inactif). L'injection est prévue de fait en sous-cutanée et la tolérance locale est meilleure qu'avec de l'hCG urinaire.

Hormone lutéinisante LH

Pour éviter les inconvénients potentiels de l'usage d'hCG, il est apparu logique d'avoir recours à la LH elle-même, la décharge de substitution étant plus brève et plus physiologique. Ceci peut s'envisager en induisant une décharge de LH endogène (par exemple avec des agonistes mais les résultats sont décevants) ou en utilisant de la LH exogène.

LH recombinante (LHrec)

Les hormones recombinantes, produites par génie génétique, ont plusieurs intérêts : disponibilité et sécurité de l'origine, grande pureté, activité biologique spécifique élevée, stabilité et reproductibilité des lots. La posologie nécessaire n'est pas encore déterminée parce qu'elle pose certaines difficultés puisque la quantité nécessaire et suffisante de LH pour déclencher une ovulation normale est inconnue. Pour la LH comme pour l'hCG, les doses nécessaires pour ré-initier la méiose, entraîner la rupture folliculaire et obtenir un corps jaune normal sont progressivement croissantes. En FIV, où le seul rôle de l'hormone lutéinisante est de ré-initier la méiose, les résultats sont comparables quelle que soit la dose de LH administrée. En effet, 5 % du pic physiologique de LH suffisent à déclencher la poursuite de la méiose ovocytaire et également une lutéinisation significative, alors que 85 % du pic de concentration de la décharge de LH sont nécessaires à un processus ovulatoire complet, en particulier pour assurer la rupture folliculaire.

La LHrec devrait permettre de limiter le risque de SHO, probablement du fait d'une demi-vie plus courte. L'utilisation de la LHrec chez les femmes à risque de SHO (SOPK) en FIV ou en stimulation simple pourrait ainsi être envisagée. Cependant, aucune équipe ne l'utilise en pratique courante.

Critères de déclenchement

Le déclenchement de l'ovulation ne peut s'inscrire évidemment que dans un contexte de monitoring hormonal et échographique permettant de programmer idéalement le test post-coïtal, l'insémination intra-utérine ou la ponction oocytaire.

Les critères de déclenchement reposent donc sur des données biologiques (taux d'œstradiol par follicule mature) et échographiques (diamètre folliculaire). D'autres données échographiques pourraient préjuger du pronostic implantatoire (aspect, épaisseur, échogénicité, vascularisation de l'endomètre, vascularisation des follicules, Doppler utérin).

Les résultats conceptionnels sont comparables quel que soit le moment de l'insémination intra-utérine entre la 28^e et la 48^e heure post-hCG. Les taux de succès étant significativement inférieurs pour des inséminations plus précoces.

En FIV, la ponction oocytaire est réalisée environ 36 à 40 heures après l'injection, avant l'ovulation.

Il n'existe pas de critères consensuels en ce qui concerne le jour du déclenchement. Ce qui est communément admis est un déclenchement pas avant le 10^e jour du cycle, temps nécessaire à une maturation cytoplasmique de l'ovocyte. Chaque équipe a ses propres critères de déclenchement comprenant le jour du cycle, le nombre de follicules et leur taille, le taux d'œstradiol voire de progestérone, le démarrage spontané d'une élévation de LH et les résultats des traitements antérieurs s'ils existent.

Soutien de la phase lutéale

Exploration de la phase lutéale

Courbe ménothermique

Elle permet le diagnostic de phase lutéale courte (durée du plateau inférieure à 10 jours) mais pas celui de la phase lutéale inadéquate (durée du plateau normale mais quantité de progestérone sécrétée insuffisante).

Dosages hormonaux

Le dosage de la progestéronémie en milieu de phase lutéale, vers le 6^e ou 7^e jour après le décalage thermique (valeur normale supérieure à 10 ng/mL) ou la somme de trois dosages durant la même période (normale si supérieure à 30 ng/mL). Il permet de vérifier la bonne sécrétion du corps jaune.

Échographie pelvienne

Des travaux ont porté sur l'index de pulsatilité, qui serait plus élevé en cas de déficit en progestérone. La résistance de l'artère utérine semble un bon reflet de la réceptivité endométriale au moment du déclenchement, une résistance augmentée (IP > 3) apparaît comme un facteur de mauvais pronostic implantatoire. La mesure du diamètre folliculaire n'est pas un bon critère de déficit lutéal.

Biopsie d'endomètre

Les critères publiés par Noyes sont les plus employés. La biopsie est évaluée rétrospectivement à partir de la date réelle de survenue des règles, après le prélèvement histologique. L'insuffisance lutéale est définie comme un retard (supérieur ou égal à 2 jours) des transformations sécrétoires de l'endomètre appréciées histologiquement.

L'insuffisance lutéale est définie comme une altération de la morphologie endométriale dont la datation histologique sur une biopsie de fin de cycle a plus de deux jours de retard sur la datation chronologique (modèle décrit par Noyes *et al.*, 1950). Les transformations sont donc en retard sur la chronologie de la phase lutéale. Cette altération est la conséquence d'une insuffisance de production de progestérone en quantité et/ou en durée par le corps jaune. L'insuffisance de la phase lutéale peut s'observer au cours de cycles spontanés mais également après stimulation ovarienne et, en particulier, lors d'association avec les analogues de la GnRH.

Moyens thérapeutiques de soutien de la phase

Si l'on considère que l'insuffisance lutéale est la conséquence directe d'un défaut de sécrétion progestéronique par le corps jaune, les méthodes de soutien de la phase lutéale passent :

- soit par la stimulation du corps jaune pour augmenter la production de progestérone endogène par des injections répétées d'hCG (effet LH) ;
- soit par l'administration de progestérone exogène.

L'utilisation de l'hCG passe par la répétition des injections intramusculaires à la dose de 1 500 UI.

La progestérone a été utilisée par voie intramusculaire, orale puis vaginale. La progestérone naturelle micronisée (le procédé de micronisation permet une absorption rapide du composé natif) est le progestatif de choix, son administration par voie vaginale lui confère une meilleure biodisponibilité, une réduction de la variabilité intra- et interindividuelle de l'absorption, et une bonne tolérance. Son administration par voie vaginale lui permet d'augmenter ses concentrations au niveau endométrial, par le biais du « premier passage utérin » (21) et de limiter les effets secondaires comparativement aux autres modes d'administration (somnolence). Un effet indésirable décrit est l'intolérance locale. La dose optimale minimale retenue actuellement est de 200 mg par jour. La majorité des praticiens utilisent au minimum 400 mg (200 mg matin et soir). La réponse endométriale est plus physiologique, permettant d'obtenir une transformation sécrétoire complète apte à la nidation.

En fonction du protocole de stimulation

Induction par citrate de clomifène

Le recours à la progestérone pourrait sembler moins intéressant dans cette indication en raison de sa responsabilité dans les altérations endométriales secondaires à ses propriétés antioestrogéniques (l'œstradiol déterminant la teneur en récepteurs à la progestérone au niveau de l'endomètre), même en présence de taux physiologiques d'œstradiol et de progestérone.

Induction par les gonadotrophines exogènes

L'hyperstimulation ovarienne contrôlée par des gonadotrophines optimise la maturation folliculaire avec des taux circulants plus élevés d'œstradiol permettant d'améliorer la réceptivité de l'endomètre à la progestérone.

Indications

Nous distinguerons l'insuffisance lutéale au cours de cycles spontanés et l'insuffisance lutéale au cours de stimulations ovariennes.

Insuffisance lutéale au cours de cycles spontanés

L'insuffisance lutéale peut être corrigée efficacement par un apport en progestérone micronisée administrée préférentiellement par voie vaginale, même si la physiopathogénie inciterait plus vers la prescription d'un traitement inducteur de l'ovulation par gonadotrophines exogènes, en optimisant donc la phase folliculaire et le processus ovulatoire. De nouvelles perspectives se profilent avec l'optimisation du signal FSH intercycle.

Stimulation de l'ovulation hors FIV

En stimulation simple, la phase lutéale est optimisée par les gonadotrophines et par conséquent un soutien lutéal n'apparaît pas nécessaire. Les anomalies endométriales rapportées avec l'utilisation du citrate de clomifène ne semblent pas être améliorées par une supplémentation progestéronique en phase lutéale.

Après insémination intra-utérine, l'intérêt du soutien de la phase lutéale n'est pas clairement établi. Il n'en demeure pas moins que son utilisation est très largement répandue et fait appel à la progestérone micronisée intravaginale. L'administration répétée d'hCG n'améliore pas le taux de grossesses mais augmente significativement le risque de SHO.

Stimulation de l'ovulation en FIV

Il a été démontré que les analogues de la GnRH sont responsables d'une chute du taux d'œstradiol et de progestérone à partir du 8^e jour post-hCG avec une diminution du taux de grossesses en l'absence de supplémentation de la phase lutéale. Ce déficit lutéal peut s'expliquer :

- par la déplétion en LH endogène induite par les analogues contribuant à diminuer la stimulation du corps jaune ;
- par l'hyperœstrogénie induite par la stimulation qui est potentiellement lutéolytique ;
- le bénéfice d'un soutien de la phase lutéale a été clairement démontré, avec une efficacité identique de l'hCG et de la progestérone micronisée.

L'utilisation de l'hCG en injections répétées est associée à une incidence plus élevée de SHO. Avec l'administration de progestérone naturelle, ce risque est nettement diminué (22).

Les protocoles de traitement de la phase lutéale en FIV sont donc adaptés en fonction du risque de SHO (taux d'œstradiol très élevés le jour du déclenchement, ponction ovocytaire incomplète, ovaires micropolykystiques). Une situation à haut risque de SHO incitera à recourir à la progestérone micronisée plutôt qu'à l'hCG. Quoi qu'il en soit, aucune étude ne montre de supériorité et donc d'intérêt à l'hCG qui est pourvoyeur d'un grand nombre de SHO iatrogène.

L'intérêt d'une supplémentation en œstradiol pourrait sembler séduisant. En effet, une chute de l'œstradiolémie entre le jour du déclenchement et j8 après l'injection d'hCG apparaît peu favorable à une implantation embryonnaire probablement par effet délétère sur l'endomètre. L'influence de ce delta d'E2 semblerait être prédictif du taux d'implantation. Aucune étude n'a démontré l'intérêt de la supplémentation en œstradiol (23).

L'aspirine à faible dose, également, semblait dans certains cas améliorer l'implantation. Cependant

à nouveau, aucune étude n'a fait la preuve de son efficacité (24).

Ainsi, seule la progestérone a un intérêt indiscutable en FIV. Le seuil nécessaire et suffisant n'est pas connu. La dose journalière va de 200 mg à 1 200 mg en fonction des équipes avec une moyenne autour de 400 à 600 mg par jour.

Conclusion

Il est important de bien connaître les différentes thérapeutiques et de maîtriser quelques protocoles de base pour pouvoir se lancer dans des stimulations allant de l'induction de l'ovulation simple aux HOC en vue d'une ponction ovocytaire. L'apprentissage autant de la maîtrise des protocoles mais surtout de leurs suivis au cours du monitoring se fait par l'expérience et le compagnonnage dans un centre d'AMP.

Le soutien de la phase lutéale est aujourd'hui réduit à la prescription de progestérone en FIV ou ICSI, les autres médicaments n'ont soit pas fait la preuve de leurs efficacités, soit entraînent des complications sans amélioration des résultats.

Les nouvelles technologies, et en particulier la proéomique, vont probablement entraîner dans le domaine des traitements de l'infertilité, une amélioration et un changement radical autant sur la forme des traitements (oral par exemple) que sur leur efficacité voire leur coût.

En attendant, il est nécessaire de privilégier l'efficacité *i.e.* l'efficacité au moindre « coût ». La notion de « coût » faisant ici référence aux pertes de chances soit par perte de temps, soit par inadéquation entre le terrain, la cause de l'infertilité et le traitement, soit par absence de remise en question.

Il faut retenir qu'il n'existe pas de « petite stimulation », ainsi il ne doit jamais y avoir :

- de prise en charge sans un bilan minimum du couple au préalable ;
- de choix de techniques et de thérapeutiques sans réflexion par rapport au terrain et aux résultats obtenus lors du bilan ;
- de traitements de stimulation sans une surveillance rigoureuse ;
- de répétitions des traitements en cas d'échec sans réévaluation.

La médecine redevient un art aujourd'hui quand les fondamentaux sont acquis, c'est aussi vrai en AMP.

Références

1. Eibschitz I, Belaisch-Allart J, Frydman R (1986) In vitro fertilization management and results in stimulated cycles with spontaneous LH discharge. *Fertil Steril* 45: 231-4
2. Rizk B, Smitz J (1992) Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using LH-RH agonists for IVF and related procedures. *Hum Reprod* 7: 320-7
3. Albano C, Smitz J, Camus M *et al.* (1997) Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 67: 917-22
4. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P *et al.* (1995) Scheduled administration of GnRH antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in vitro fertilization cycles: a pilot study. *Hum Reprod* 10: 1382-6
5. Kousta E, White Dm, Franks S (1997) Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Human Reprod Update* 4: 358-65
6. Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D *et al.* (2008) Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 23: 310-5
7. Bosch E, Vidal C, Labarta E, Simon C, Remohi J, Pellicer A (2008) Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists-a randomized study. *Human Reproduction* 23: 2346-51
8. Rongières C (2006) Monitoring ovarian stimulation: are hormonal assessments necessary? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 35: 2S39-2S41
9. Kwan I, Bhattacharya S, Mcneil A, Van Rumste MME (2008) Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI) (Review) *Cochrane Data Base* 2: CD005289
10. Hugues JN, Barlow DH, Rosenwaks Z *et al.* (2003) Improvement in consistency of response to ovarian stimulation with recombinant human follicle hormone resulting from a new method for calibrating the therapeutic preparation. *Reprod Biomed Online* 6: 185-90
11. Kosmas IP, Tatsioni A, Kolibianakis EM *et al.* (2008) Effects and clinical significance of GnRH antagonist administration for IUI timing in FSH superovulated cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril* 90: 367-72
12. Isikoglu M, Ozdem S, Berkkanoglu M, Jammal H, Senturk Z, Ozgur K (2007) Single-dose depot leuprolide is as efficient as daily short acting leuprolide in ICSI cycles. *Hum Reprod* 22: 1657-61
13. Hugues JN (2002) Contribution of exogenous LH during ovarian stimulation: for a targeted indication *Gynecol Obstet Fertil* 30: 79-83.
14. Surrey ES, Schoolcraft WB (2000) Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 73: 667-76
15. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schröder Ak, Löning M, Weiss JM (2002) Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective, randomized study. *Hum Reprod* 17: 2842-5
16. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K (2001) Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 265: 175-82
17. Rongières-Bertrand C, Olivennes F, Righini C *et al.* (1999) Revival of the natural cycles in in vitro fertilization with the use of a new GnRH antagonist (Cetrorelix): a pilot study with minimal stimulation. *Human Reprod* 14: 683-8
18. Kolibianakis em (2005) GnRH antagonists in IVF. *RBM Online* 10: 705-12
19. Abdalla HI, Ah-Moye M, Brinsden P, Howe DI, Okonofua F, Craft I (1987) The effect of the dose of hCG and the type of gonadotropin stimulation on ovocyte recovery rate in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 48: 958-63

20. Empereire JC, Parneix I, Broussin B, Ruffie A (1998)Triggering ovulation with different doses of human chorionic gonadotropin (hCG) in stimulated cycles. *Fertil Steril* 70 (Suppl. 1)

21. De Ziegler D, Bulletti C, De Monstier B, Jääskeläinen AS (1997) The first uterine pass effect. *Ann NY Acad Sci* 828: 291-9

22. Aboulghar M (2009) Luteal support in reproduction: when, what and how? *Curr Opin Obstet Gynecol* 21: 279-84

23. Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Diedrich K, Tarlatzis BC, Griesinger G (2008) Estrogen addition to progesterone for luteal phase support in cycles stimulated with GnRH analogues and gonadotrophins for IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23: 1346-54

24. Poustie VJ, Dodd S, Drakeley AJ (2007) Low-dose aspirin for in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 17 : CD004832

Abréviations	
AMM : autorisation de mise sur le marché	HCG : <i>human chorionic gonadotrophin</i>
AMP : assistance médicale à la procréation	HMG : <i>human menopausal gonadotrophin</i>
CC : citrate de clomifène	HOC : hyperstimulation ovarienne contrôlée
CFA : compte des follicules antraux	ICSI : <i>intra cytoplasmic spermatozoa injection</i>
FIV : fécondation <i>in vitro</i>	IUI : insémination intra-utérine
FSH : <i>folliculotropin stimulating hormone</i>	LH : <i>luteinizing hormone</i>
GnRH : <i>gonadotrophin releasing hormone</i>	SHO : syndrome d'hyperstimulation ovarienne
	SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

Annexe I – Antiœstrogènes et gonadotrophines

Spécialités	Principe actif	Présentation	Laboratoire
Clomid®	Citrate de clomifène	Cp boîte de 5	Marion Merrell
Pergotime®	Citrate de clomifène	Cp boîte de 5	Merk Serono
Gonal F® (filled by mass)	FSH recomb.	300 stylo	
		450 stylo	
		900 stylo	
Pergoveris®	FSH-LH recomb.	Amp. 150 U de FSH et 75 U de LH	
Luveris®	LH recomb.	1 amp. 75 U	
Ovitrelle®	HCG recomb.	1 amp.	Ferring
Menopur®	HMG urinaire	5 amp. de 75 U	
Lutrelif®	Acétate de gonareline	1 flacon 0,8 1 flacon 3,3	
Gonapeptyl®		Flacon 3 mg	
Fostimon®	FSH urinaire	1 amp. de 75 U	Genévrier
		5 amp. de 75 U	
		5 amp. de 150 U	
Puregon®	FSH recomb.	Cartouche pour stylo 300 U	Schering Plough
		Cartouche pour stylo 600 U	
		Cartouche pour stylo 900 U	
Gonadotrophine chorionique®	HCG urinaire	1 500 U : 1 boîte de 6	
		5 000 U	
Décapeptyl®	Triptoréline	1 flacon 3 mg	Ipsen
		0,1mg	
Suprefact®	Busérliline	Flacon 0,6 mL	
Enanthone®		3 mg	
Lucrin®		0,1 mg	Wyeth

R. Wainer

Insémination intra-utérine avec sperme du conjoint

Historique de l'insémination

Les premières inséminations mentionnées dans la littérature semblent remonter au ^xe siècle où des tribus arabes utilisaient l'insémination pour féconder leurs juments, en multipliant ainsi les possibilités de procréation d'un même étalon. Paracelse semble au début du ^{xvi}e siècle avoir tenté, sans succès, des expériences d'insémination artificielle dans l'espèce humaine.

Mais c'est en 1780 que l'abbé Lazzaro Spallanzani a tenté et réussi la première insémination artificielle (officiellement reconnue) d'un mammifère, une chienne qui a « mis bas toute une portée de chiots parfaitement constitués ».

Enfin, c'est en 1790, que la première insémination dans l'espèce humaine est décrite par John Hunter qui conseille à un homme porteur d'un hypospadias, d'injecter, à l'aide d'une seringue chauffée, son propre sperme à l'intérieur du vagin de sa femme. Cela fait donc plus de deux siècles que cette technique d'assistance médicale à la procréation (AMP) a été officiellement décrite pour la première fois.

D'abord réalisée sous la forme d'une insémination intravaginale, elle est ensuite proposée, à la fin du ^{xix}e siècle, en intracervicale par James Marion Sims et en intra-utérine par Fabien Gigon d'Angoulême. Ces premières inséminations intra-utérines (IIU) réalisées avec un petit volume de sperme entier furent à l'origine d'infections et d'importantes contractures utérines.

Et il fallut attendre la deuxième moitié du ^{xx}e siècle, et les procédés de « lavage » du sperme permettant de séparer les spermatozoïdes des sécrétions séminales pour voir cette technique se développer. L'IIU devenant à la fin du ^{xx}e siècle, avec la sophistication des techniques de préparation spermatique contemporaines des progrès réalisés en fécondation *in vitro* (FIV), une technique d'AMP à part entière.

Principe de l'insémination intra-utérine avec sperme du conjoint

Le but de l'insémination intra-utérine avec sperme du conjoint (IIUc) est d'optimiser la rencontre des

gamètes mâles et femelles dans le tractus génital féminin.

Cette optimisation est obtenue :

- d'une part, par une synchronisation de l'ovulation et de l'insémination ;
- d'autre part, par une augmentation de la concentration de spermatozoïdes mobiles sur le site de fécondation.

Indications de l'IIUc

Les indications sont exposées dans ce chapitre, puis discutées au chapitre « facteurs pronostiques ».

Étiologie cervicale

Elle représente l'indication la plus logique de l'IIUc et se caractérise par la répétition de tests de Huhner négatifs (tests post-coïtaux). En effet, l'IIUc conduit à « shunter » le col utérin où, dans ces cas, l'ascension spermatique n'est pas satisfaisante. Ces tests de Huhner négatifs peuvent être la conséquence d'une glaire cervicale insuffisante (par ex. : antécédent de conisation), impénétrable (par ex. : patiente présentant une mutation du gène *CFTR*) ou d'une insuffisance qualitative spermatique. Dans tous les cas, il est recommandé de réaliser, avant le passage à l'IIUc, un traitement d'estrogénothérapie ou une induction simple qui peuvent parfois suffire à optimiser la glaire et à positiver le test de Huhner.

Étiologie spermatique

L'IIUc est indiquée en cas « d'insuffisance spermatique modérée ». Les critères spermatiques conditionnant le pronostic des IIU sont, encore à ce jour, discutés. Cependant, certains paramètres comme le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (NSMI) et le pourcentage d'atypies morphologiques de ces spermatozoïdes semblent influencer sur les chances de grossesses (cf. Facteurs pronostiques de l'IIU). Il est donc indispensable d'avoir fait réaliser un test de migration survie des spermatozoïdes

(TMS), avant d'envisager l'IIUc et de connaître les seuils décisionnels de ces paramètres pour le laboratoire considéré.

Étiologie inexpliquée

Bien que cette indication fasse encore aujourd'hui l'objet de controverses (cf. Facteurs pronostiques de l'IIU et Le rapport coût-efficacité), la grande majorité des études publiées à ce jour conclut à une supériorité statistiquement significative des taux de grossesses après induction de l'ovulation + IIUc par rapport aux rapports sexuels programmés avec ou sans induction de l'ovulation.

Troubles de l'éjaculation

L'insuffisance du volume spermatique, les anomalies d'abouchement du méat urétral, voire certains troubles sexuels, peuvent représenter des indications rares de l'IIUc.

Étiologie immunologique

La présence d'anticorps antispermatozoïde d'origine masculine, ou de façon plus exceptionnelle et controversée d'origine féminine, va entraver la mobilité spermatique et la progression des spermatozoïdes dans le canal cervical. L'IIUc par la préparation spermatique et la mise en contact rapide des gamètes peut favoriser la survenue de grossesse, cependant la fécondation *in vitro* avec micro-injection obtient dans ce contexte des résultats favorables plus constants.

D'autres indications sont à ce jour encore mal évaluées

Les endométrioses à trompes saines, les trompes perméables uniques, les échecs d'induction de l'ovulation.

Cadre légal et réglementaire, bilan pré-IIU

En 1885, le jury de thèse de la Faculté de Médecine de Paris a non seulement refusé la thèse sur l'insémination artificielle que s'appropriait à soutenir un étudiant du nom de Jules Gérard, mais a également veillé à la destruction des 1 200 exemplaires de cette thèse, ainsi que le manuscrit et les épreuves corrigées. L'insémination étant alors accusée « des conséquences les plus désastreuses pour la famille, la société et l'État ». Un siècle plus tard, l'IIUc fait partie des techniques d'assistance médicale à la procréation, et à ce titre,

est régie en France par la loi dite de bioéthique du 29 juillet 1994. Seuls les biologistes, qui ont obtenu un agrément pour le recueil et la préparation des spermatozoïdes en vue d'une IIU, sont autorisés à participer à la réalisation d'inséminations. Les cliniciens n'ont pas besoin d'un agrément pour induire l'ovulation et pratiquer l'IIU, cependant, ils doivent se plier à la loi. L'homme et la femme formant le couple doivent être vivants au moment de l'acte, mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans. Le couple doit disposer d'un délai minimum d'un mois à l'issue de la 1^{re} consultation et confirmer son accord après ce délai, par écrit. Le consentement doit être renouvelé avant chaque insémination.

L'arrêté du 12 janvier 1999, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP, a défini les règles de sécurité sanitaire avant IIU : les sérologies des hépatites B et C, du sida HIV₁ et HIV₂ (voire HTLV pour les populations à risques) et de la syphilis doivent être réalisées chez l'homme et la femme avant la première IIU et répétées pour les tentatives suivantes, si le délai depuis la dernière détermination dépasse douze mois. De plus un test de préparation des spermatozoïdes est obligatoire avant toute IIUc. Enfin, il est nécessaire d'avoir une spermoculture négative de moins de 6 mois avant de réaliser une IIUc (arrêté du 11 avril 2008, paru dans le JO du 23 mai 2008, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation).

Le bilan pré-IIU doit comporter :

- pour les deux membres du couple : un interrogatoire soigneux à la recherche des antécédents familiaux, personnels et des habitudes. Un examen clinique attentif ;
- un bilan féminin avec une courbe thermique sur deux ou trois cycles, des sérologies complémentaires (rubéole, toxoplasmose), des dosages hormonaux plasmatiques à j3 (en particulier FSH, estradiolémie, LH, prolactinémie et si possible AMH), une hystérosalpingographie, complétée en cas d'anomalies les justifiant, d'une coelioscopie ou d'une hystéroscopie, un test de Huhner. Un bilan gynécologique récent avec des frottis cervicaux et éventuellement une mammographie ;
- un bilan masculin avec spermogramme, spermocytogramme, spermoculture et test de migration survie (TMS).

Technique

Stimulation avant insémination

Elle a pour but non seulement de corriger un éventuel trouble de l'ovulation, mais aussi de synchro-

niser ovulation et insémination et d'obtenir, si on le souhaite, une double ovulation. Le monitoring de cette induction d'ovulation repose sur les dosages plasmatiques d'estradiol et de LH et sur l'échographie folliculaire.

Plusieurs méta-analyses ou revue de la littérature (1-5) et études prospectives randomisées (6-9) ont clairement démontré l'intérêt d'une stimulation précédant l'IIUc. En l'absence d'une stimulation de l'ovulation, le taux moyen de grossesse par cycle avec l'IIUc reste inférieur à 5 %. Avec une stimulation de l'ovulation par citrate de clomiphène seul, ce taux moyen reste inférieur à 8 %. Enfin, l'utilisation d'HMG ou FSH prescrits seuls ou en association avec le citrate de clomiphène permet d'obtenir des taux moyens de grossesse par cycle significativement supérieur, de l'ordre de 13 %.

L'immense majorité des stimulations de l'ovulation précédant les IIUc est réalisée avec le citrate de clomiphène et les FSH/HMG utilisés seuls ou associés.

Cependant, d'autres types de stimulations sont envisageables.

Ainsi, les antiaromatases tels que le létrozole ont montré une efficacité au moins équivalente à celle du citrate de clomiphène (10), cependant cette classe de médicaments n'a pas reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans cette indication, jusqu'à présent.

L'utilisation d'agonistes de LHRH + FSH/HMG (11, 12) permet d'obtenir des taux de grossesse supérieurs à ceux de la FSH/HMG seuls, mais au prix d'une élévation du risque de grossesses multiples. Enfin, l'utilisation d'antagonistes de LHRH + FSH/HMG (13, 14) a l'avantage d'éviter les pics de LH inadéquats, de diminuer le nombre de cycles annulés pour hyperstimulation chez les patientes présentant des ovaires micropolykystiques et de permettre de retarder le jour de l'insémination pour des raisons d'organisation (éviter les IIUc du dimanche, attendre le retour de voyage du mari...) sans altérer les taux de grossesse.

Ces nouvelles thérapeutiques présentent dans tous les cas l'inconvénient d'élever sensiblement le coût de l'induction d'ovulation.

Monitoring de l'ovulation

L'association des dosages hormonaux plasmatiques (estradiolémie-LH) et de l'échographie folliculaire est la seule méthode de surveillance de la stimulation ovarienne qui soit efficace et prudente. Les dosages hormonaux seuls ne permettent pas de se garantir contre une stimulation plurifolliculaire. L'échographie folliculaire seule ne peut détecter les pics de LH prématurés. Le premier dosage hormonal est généralement réalisé vers j8 du cycle et la

1^{re} échographie vers j10. Cette surveillance assez peu contraignante est en général bien acceptée par les patientes. Un dosage de progestéronémie peut parfois être associé, à la recherche d'une lutéinisation précoce.

Fenêtre d'insémination

La rupture folliculaire survenant environ 36 heures après l'injection déclenchante d'HCG, et l'ascension des spermatozoïdes dans l'utérus et les trompes étant rapide, il est recommandé de faire l'injection d'HCG en début de soirée et de prévoir l'insémination le surlendemain matin (15).

Lorsqu'un pic de LH survient avant l'injection d'HCG, il est recommandé de réaliser l'insémination 24 heures après la découverte de ce pic.

Nombre d'inséminations dans le cycle

Certains auteurs proposent de réaliser deux inséminations au cours du même cycle avec des délais variant de 16 à 60 heures après l'injection d'HCG. Cependant il n'a pas été retrouvé, dans les plus grandes séries et dans les méta-analyses de différences significatives dans les taux de grossesse entre les cycles à inséminations uniques ou doubles (16-18). Il semble donc efficace et moins contraignant de proposer une seule insémination par cycle.

Préparation spermatique

Il est recommandé de respecter un délai d'abstinence de 3 jours avant l'IIU.

Les techniques de préparations du sperme ont évolué au fil du temps, les deux techniques les plus utilisées dans le monde sont la migration ascendante et la centrifugation sur gradient de densité (19).

La préparation spermatique a pour but de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal, d'éliminer les débris cellulaires et les cellules rondes et de concentrer la suspension en spermatozoïdes mobiles et normaux aptes à féconder l'ovocyte.

La préparation actuelle du sperme dans notre équipe s'effectue de la façon suivante : après liquéfaction du liquide séminal obtenue en 30 minutes à la température de la pièce, le volume, le PH, la numération spermatique et la mobilité progressive sont évalués selon les critères de l'organisation mondiale de la santé (OMS). La concentration spermatique est déterminée au moyen d'un hémocytomètre sur deux préparations différentes de l'échantillon spermatique (dilution 1/20 dans une solution de Ringer). La classification de la mobilité spermatique est déterminée par l'évaluation d'au

moins cinq champs microscopiques contenant au moins 200 spermatozoïdes (grossissement $\times 400$). Quatre catégories de mobilité sont ainsi déterminées :

- mobilité (a) rapide et progressive ($\geq 20 \mu\text{m/s}$ à 20°C) ;
- mobilité (b) lente et progressive ;
- mobilité (c) non progressive ($< 5 \mu\text{m/s}$ à 20°C) ;
- immobilité (d).

Les spermatozoïdes mobiles sont sélectionnés par un gradient de « pure sperm » en deux couches. La fraction des spermatozoïdes mobiles est « lavée » deux fois par centrifugation et les spermatozoïdes récupérés sont remis en suspension dans 0,35 mL d'un milieu capacitant dépourvu d'albumine.

Les spermatozoïdes sont ensuite comptés et la mobilité progressive est évaluée pour déterminer le nombre total de spermatozoïdes mobiles inséminés (NSMI).

La morphologie spermatique est évaluée à partir d'étalement provenant, d'une part, de la fraction éjaculée totale et, d'autre part, de la fraction mobile sélectionnée. Nous utilisons la procédure de marquage à l'haematoxyline de Schorr et Harris. Le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux et de ceux présentant des anomalies morphologiques variées est évalué au grossissement $\times 1\,000$ et rendu sur 100 spermatozoïdes selon la méthode décrite par David (20) et modifiée par Jouannet (21).

Réalisation de l'IIU

Après un simple nettoyage du col, sans utilisation d'antiseptique, l'insémination est réalisée au moyen d'un cathéter semi-souple monté sur une seringue de 1 mL. Le volume injecté est d'environ 0,3 mL. L'insémination s'effectue lentement et le cathéter n'est pas retiré immédiatement permettant ainsi de diminuer les possibles reflux. La patiente reste allongée une dizaine de minutes (22), puis elle peut reprendre une activité normale.

Certaines équipes proposent (23) un « soutien » de la phase lutéale par de la progestérone intravaginale ou par des injections intramusculaires d'HCG, bien que l'intérêt d'une telle pratique n'ait pas été démontrée (24).

Un test de grossesse est réalisé 14 jours après l'insémination.

En l'absence d'une grossesse, une nouvelle insémination peut être réalisée.

La technique d'IIU n'étant pas très contraignante pour le couple, quatre IIU peuvent être réalisées en un semestre.

La technique de la perfusion tubaire spermatique (PTS ou en anglais *fallopian tube sperm perfusion*, FSP) : cette technique a été décrite pour la première

fois en 1992 par J. A. Kahn (25-28). Elle consiste à injecter sous pression 4 mL d'une préparation spermatique dans l'utérus au moyen d'une sonde particulière, en tentant d'éviter les reflux cervicaux. Les dernières méta-analyses (29) comparant l'efficacité de la PTS et de l'IIU ne montrent pas de différence significative dans les résultats obtenus. Le coût supplémentaire et la technique plus mal aisée de la PTS conduisent à préférer l'IIU.

Combien d'IIU faut-il réaliser ?

Bien que les données de la littérature à ce sujet fassent débat, il semble que la plupart des grossesses en IIU soient obtenues au cours des trois ou quatre premiers cycles de traitement (1, 30-37). Un taux de grossesse encore satisfaisant ($> 10\%$) est obtenu au cinquième cycle d'IIU, au-delà les chances de grossesse s'amenuisent, cependant certains auteurs proposent de réaliser jusqu'à neuf cycles d'IIU (38).

Le nombre de cycles réalisés doit tenir compte de l'existence d'une grossesse antérieure, de l'âge de la patiente et de sa réserve ovarienne, de l'indication de l'IIU, du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (39, 40).

Facteurs pronostiques de l'IIU

Étiologies et facteurs pronostiques

L'étiologie cervicale caractérisée par plusieurs tests de Huhner négatifs, non améliorés par l'estrogénothérapie ou l'induction simple, obtient les meilleurs scores avec un taux de grossesse par cycle d'environ 20 % (33,41-44). On peut cependant noter qu'une récente revue de la littérature (45, 46) concluait que, malgré le très grand nombre de publications sur ce sujet, l'insuffisance des méthodologies utilisées ne permettait pas de conclure sur l'efficacité de l'IIU en cas d'étiologie cervicale. Enfin, une controverse existe pour ces patientes sur l'utilité ou non de réaliser une hyperstimulation ovarienne contrôlée. Si certains auteurs l'estiment nécessaire (47), d'autres n'observent pas de différence significative des chances de grossesse pour les IIU avec ou sans stimulation ovarienne, mais accusent cette stimulation d'aboutir à de nombreuses grossesses multiples, en particulier dans cette indication (48).

L'étiologie masculine, en cas de « d'insuffisance spermatique modérée », est d'assez bon pronostic, avec des taux de grossesse par cycle de l'ordre de 15 % (31, 33, 35, 39). Les études de la Cochrane data base (49, 50) sont à nouveau critiques sur les

méthodologies utilisées mais concluent à l'efficacité de l'IIU dans cette indication.

En cas de stérilité inexplicée, trois méta-analyses (3, 51, 52) regroupant environ 10 000 cycles, concluaient à la fin des années 1990 à la supériorité de l'IIU en fonction des rapports sexuels programmés. Cependant une étude prospective randomisée et une méta-analyse récente (53, 54) concluent à l'absence d'intérêt de l'IIU par rapport à l'abstention thérapeutique en cas de stérilité inexplicée. Il est donc plus que jamais nécessaire dans cette indication de tenir compte de l'ensemble des critères de pronostic avant d'orienter les couples vers une AMP (IIU ou FIV).

Rang de la tentative et facteurs pronostiques

La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que les meilleurs taux de grossesse sont obtenus dans les premiers cycles de traitement (35-37, 55, 56). Il est habituellement recommandé, comme nous l'avons vu, de réaliser trois ou quatre IIU avant de passer en FIV.

Âge et la durée d'infertilité

L'âge de la patiente est un facteur pronostique essentiel comme dans toutes les techniques d'assistance médicale à la procréation (33, 35, 57-59). Si certains auteurs ont trouvé une relation pratiquement linéaire et inversement proportionnelle à l'âge (57) d'autres observent des taux de succès qui se maintiennent jusqu'à 40 ans, avant de chuter au-delà (39).

L'allongement de la durée d'infertilité est un facteur de mauvais pronostic pour la majorité des auteurs (35, 42, 55), cependant pour d'autres (58, 33), les taux de succès semblent peu influencés par la durée de l'infertilité.

Dosages hormonaux féminin à j3 du cycle

Si certains auteurs (60) observent une diminution des chances de grossesse avec l'élévation de la FSH et de l'estradiolémie, la plupart n'attribue pas de valeur pronostique aux dosages hormonaux pour les IIU, contrairement à ce qui se passe pour les FIV. Dans une étude à paraître, nous montrons que l'AMH n'est pas non plus un facteur pronostique de l'issu de l'IIU.

Caractéristiques de la stimulation

Une étude récente de la Cochrane data base (61) n'a pas mis en évidence la supériorité d'un protocole de stimulation de l'ovulation.

Le nombre de follicules ≥ 16 mm est un des facteurs pronostiques essentiels (33, 35, 42, 55, 57, 62-64), en effet, les chances de grossesse par cycle d'IIU augmentent parallèlement au nombre de follicules matures visibles en échographie. En revanche, les mêmes auteurs observent une augmentation, elle aussi parallèle au nombre de follicules, des grossesses multiples.

Certains auteurs (64) attribuent une valeur pronostique aux taux d'estradiol obtenus en fin de stimulation, mais cette valeur est moins fiable que l'aspect échographique des ovaires.

Si la survenue d'un pic de LH en fin de stimulation a été considérée, par certains (34), comme un facteur pronostic défavorable, la plupart des auteurs (33, 65) n'ont pas mis en évidence de différence dans les chances de succès, que le déclenchement soit en rapport avec un pic de LH ou induit par une injection d'HCG.

Nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés

De nombreux auteurs considèrent le NSMI comme un des facteurs pronostiques essentiels (31, 39, 66-71). Si l'on prend en compte l'association des mobilités a + b, le seuil du NSMI au dessus duquel les résultats sont optimisés est, pour la plupart des auteurs européens, de 5×10^6 . Certains auteurs, en particulier nord-américains, préconisent un seuil à 10×10^6 (72, 73).

Dans tous les cas, un NSMI $\leq 1 \times 10^6$ doit directement faire orienter les couples vers la FIV, voire l'ICSI.

Pour des valeurs intermédiaires de NSMI entre 1 et 5×10^6 , le recours au double recueil spermatique permet en moyenne de doubler la valeur du NSMI initial et d'optimiser les taux de grossesse par cycle (résultats à paraître).

La technique de l'IIU avec double recueil est simple et bien acceptée : elle consiste à faire réaliser un second recueil une heure après le premier. Les deux recueils sont ensuite « poolés » et la préparation spermatique est réalisée sur l'ensemble.

Il faut noter cependant que certains auteurs n'ont pas atteint la signification statistique pour le paramètre NSMI (74).

Pour notre part (39), nous avons pu coupler le NSMI et le rang de la tentative et montrer que : si le NSMI est $\geq 5 \times 10^6$, le taux cumulatif de grossesses continue à progresser jusqu'à la tentative de rang 5, alors que ce taux stagne à partir de la tentative de rang 3 si le NSMI est $< 5 \times 10^6$ (fig. 1).

Morphologie spermatique

Les méta-analyses et revues de littérature récentes sur ce sujet (75, 76) montrent qu'il est difficile

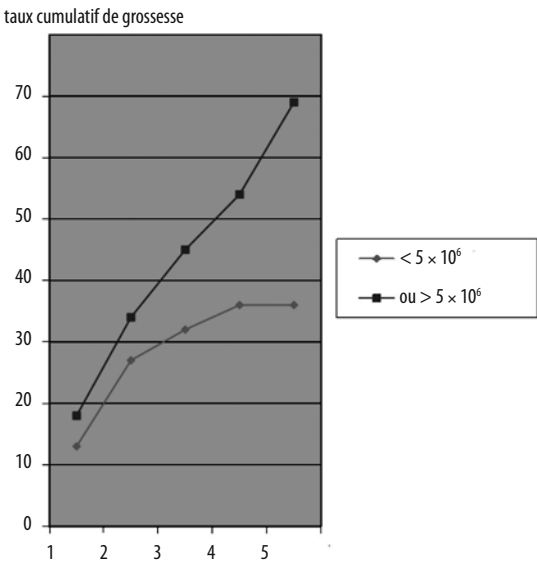


Fig. 1 – Taux cumulatif de grossesse en fonction du NSMI et du rang de la tentative.

de donner des seuils universellement applicables des critères spermatisques ; et cela en raison d’une absence de standardisation des analyses spermatisques. Cependant ces études confirment que la morphologie spermatisque utilisant des critères stricts et le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminables (NSMI), après préparation, sont les deux paramètres influençant le plus les résultats des IIU. D’autres études, utilisant l’analyse en régression logistique multivariable ou les courbes de sensibilité/spécificité de ROC (66, 68, 76, 77, 78) aboutissent aux mêmes conclusions. Si l’on utilise l’étude morphologique des spermatozoïdes, selon les critères stricts de Kruger, il semble que le seuil en dessous duquel les résultats s’effondrent est de 4 % (63, 79). Si l’on utilise l’étude morphologique selon les critères stricts de David et Jouannet, ce seuil se situe vers 20 %. Nous avons pu montrer (38) que l’augmentation quantitative du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés pouvait compenser pour partie l’altération qualitative du sperme (tableau I).

Tableau I – Influence du NSMI sur le taux de grossesses évolutives en fonction du pourcentage d’atypie spermatisque (39).

TMS de bilan	Spz de forme typique < 30 %	Spz de forme typique ≥ 30 %
NSMI	Grossesses évolutives/cycle	Grossesses évolutives/cycle
N < 5 x 10 ⁶	5/92 (5,43 %)	66/577 11,41 %
	p = 0,008	
N ≥ 5 x 10 ⁶	14/76 (18,42 %)	208/1 493 (13,93 %)

Modèles pronostiques

Différents auteurs (80-83) ont tenté d’établir des scores de prédiction d’une grossesse spontanée parmi les couples infertiles. Ces scores, bien que discutables, peuvent améliorer la pertinence de nos choix thérapeutiques.

Cas particulier des patientes présentant une seule trompe perméable

Ce cas particulier a été peu étudié dans la littérature (84), cependant il semble que les résultats obtenus en IIU soient plutôt satisfaisants en cas d’obstruction tubaire proximale. En revanche, les patientes présentant une obstruction tubaire distale doivent plutôt être dirigées vers la coelioscopie (± plastie tubaire) ou la FIV d’emblée. En cas d’IIU chez une patiente présentant une seule trompe perméable, l’utilisation d’antagonistes de LHRH au cours de la stimulation ovarienne peut retarder le déclenchement de l’ovulation et permettre ainsi le développement d’un follicule mature du côté de la trompe perméable.

Complications de l’IIU

Syndrome d’hyperstimulation ovarienne sévère

Ce syndrome semble heureusement peu fréquent dans les IIU qui font appel à des stimulations « douces ». La surveillance par dosages hormonaux et par échographies ovariennes doit être rigoureuse en particulier lors du premier cycle de traitement et chez une patiente présentant un ovaire micropolykystique (OMPK). En cas de réponse excessive à la stimulation, il ne faut jamais hésiter à interrompre la stimulation et à reprendre au cycle suivant avec une stimulation plus douce.

Syndromes infectieux pelviens

Ces syndromes peuvent être liés à la présence de germes dans l’éjaculat, à une contamination au cours de la préparation spermatisque dans le laboratoire ou à une ascension de germes cervico-vaginaux par le cathéter d’insémination. Les manifestations cliniques sont variables, de la simple réaction fébrile passagère à la salpingite, à l’abcès ovarien, voire à un tableau sévère de pelvi-péritonite. Dans la littérature, ce risque, vraisemblablement sous-estimé, est évalué à 0,2 % (85, 86). Ces complica-

tions justifient la réalisation d'une spermoculture récente et le nettoyage du col avant l'IIU.

La *transmission d'un virus* lors de l'IIU est possible. Elle concerne tous les virus mais plus particulièrement HIV, hépatites B et C. Les modes de transmission pourraient être nosocomiaux ou liés à la persistance de virus dans le sperme après la préparation. Le dépistage des sujets virémiques est donc un préalable indispensable à toute IIU.

Les pathologies gravidiques : Si les taux de grossesses extra-utérines et de fausses couches ne semblent pas influencés par la réalisation d'IIU, le taux de grossesses multiples demeure aujourd'hui la principale complication de ce type d'AMP. Ce taux varie selon les séries de 8 à 32 % (31, 32, 87-90), avec des taux de grossesses multiples de haut rang pouvant atteindre 6 % (91). Ces grossesses multiples de haut rang sont responsables d'une importante élévation de la mortalité et de la morbidité périnatale et sont assorties d'importantes conséquences économiques (92, 93).

Or, la survenue d'une grossesse multiple de haut rang est directement liée au nombre de follicules préovulatoires en fin de stimulation ovarienne. Le taux de grossesses multiples de haut rang dépend donc de la rigueur avec laquelle la stimulation ovarienne sera menée. Les règles permettant de réduire ce risque sont simples (94, 95) : utiliser des doses modérées d'inducteur de l'ovulation, savoir annuler le cycle s'il existe plus de deux follicules pré-ovulatoires en tenant compte de tous les follicules dont le diamètre est ≥ 12 mm. Il est ainsi possible de maintenir des taux de grossesse par cycle de l'ordre de 15 % en moyenne tout en maintenant des taux de grossesse multiple de haut rang de l'ordre de 1 %.

Rapport coût/efficacité

Il doit tenir compte du coût du bilan préthérapeutique, de l'ensemble du traitement et de ses complications éventuelles, du déroulement obstétrical et des complications pédiatriques éventuelles. Par ailleurs, le délai nécessaire à l'obtention d'une grossesse, les complications éventuelles et la pénibilité de la méthode doivent aussi être pris en compte.

Ainsi, les études réalisées concluent toutes à un coût par accouchement trois à quatre fois moins élevé en IIU qu'en FIV (1, 58, 68, 96-98).

Enfin, quatre cycles d'IIU peuvent être réalisés en six mois, alors qu'une seule ponction ovocytaire pour FIV est réalisée dans le même délai. Cette possibilité de répéter rapidement les tentatives d'IIU aboutit à un taux cumulatif de grossesses élevé dans une période donnée.

Certaines études (99) ont cherché à connaître la préférence des couples face au choix IIU *versus* FIV

et concluent à un choix préférentiel des couples vers l'IIU du moins sur les six premiers cycles.

Il faut cependant noter que, récemment (100), des modèles mathématiques et économiques remettent en question l'avantage de l'IIU en termes de rapport coût/efficacité quant à la FIV, en particulier en cas de stérilité inexplicée. Des études prospectives randomisées sont nécessaires dans ce domaine pour pouvoir efficacement conclure (101).

Conclusion

L'insémination intra-utérine est une technique d'assistance médicale à la procréation de réalisation facile, qui ne demande pas une infrastructure lourde.

Sa pénibilité et les contraintes qui lui sont associées sont limitées.

Son efficacité est reconnue pour les indications cervicales, plus controversée en cas d'infertilité masculine modérée et en cas d'infertilité inexplicée.

Dans ces deux dernières indications, il faudra d'autant plus savoir tenir compte des facteurs pronostiques (âge, durée d'infertilité, rang de la tentative, NSMI, morphologie spermatique) et réaliser les trois ou quatre cycles d'IIU dans un temps limité, de l'ordre de six mois.

Pour ces deux dernières indications, l'appréciation du rapport coût/efficacité de l'IIU par rapport à la FIV nécessite des études complémentaires.

Le seul risque majeur de l'IIU est représenté par le risque accru de grossesses multiples. Mais ce risque peut être considérablement limité par une gestion adéquate de la stimulation ovarienne.

Références

1. Ombelet W, Puttemans P, Bosmans E (1995) Intrauterine insemination: a first step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. *Hum Reprod* 10 (supp 11): 90-102
2. Crosignani PG, Walters DE, Soliani (1991) A The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report *Hum Reprod* 6: 953-8
3. Hughes EG (1997) The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod* 12: 1865-72
4. O'Donovan PA, Vandekerckhove P, Lilford RJ *et al.* (1993) Treatment of male infertility: is it effective? Review and meta-analysis of published randomized controlled trials. *Hum Reprod* 8: 1209-22
5. Wainer R, Merlet F (1998) Indications des inséminations intra-utérines intraconjugales en cas d'oligo-asthénospermie. Les traitements actuels de la stérilité masculine. Paris, John Libbey :103-121
6. Nan PM, Cohlén BJ, Te Velde ER *et al.* (1994) Intrauterine insemination or timed intercourse after ovarian stimulation for male subfertility. *Hum Reprod* 9: 2022-6

7. Chaffkin LM, Nulsen JC, Luciano AA, Metzger DA (1991) A comparative analysis of the cycle fecundity rate associated with combined human menopausal gonadotropin (hMG) and intrauterine insemination (IUI) versus HMG or IUI alone. *Fertil Steril* 55: 252-7
8. Karlström PO, Bergh T, Lundkvist O (1993) A prospective randomized trial of artificial insemination versus intercourse in cycle stimulated with human menopausal gonadotropin or clomiphene citrate. *Fertil Steril* 59: 554-9
9. Nulsen JC, Walsh S, Dumez S, Metzger D (1993) A randomized and longitudinal study of human menopausal gonadotropin with intrauterine insemination in the treatment of infertility. *Obstet Gynecol* 82: 780-6
10. Requena A, Herrero J, Landeras J *et al.* (2008) Use of letrozole in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 14: 571-82
11. Fanchin R, Righini C, Giatras C *et al.* (1994) Induction de l'ovulation en 1994 : l'intérêt des inséminations intra-utérines. *Ref Gynecol Obstet* 2: 171-8
12. Gagliardi CL, Emmi AM, Weiss G, Schmidt CL (1991) Gonadotropin-releasing hormone agonist improve the efficiency of controlled ovarian hyperstimulation/intrauterine insemination. *Fertil Steril* 55: 939-44
13. Lambalk CB, Leader A, Olivennes F *et al.* (2006) Treatment with the GnRH antagonist ganirelix prevents premature LH rises and luteinisation in stimulated intrauterine insemination: results of a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Hum Reprod* 21: 623-9
14. Ertunc D, Tok EC, Savas A *et al.* (2010) Gonadotropin-releasing hormone antagonist use in controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination cycles in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 93: 1179-84
15. Ragni G, Somigliana E, Vegetti W (2004) Timing of intrauterine insemination: where are we? *Fertil Steril* 82: 25-6
16. Ransom MX, Blotner MB, Bohrer M *et al.* (1994) Does increasing frequency of intrauterine insemination improve pregnancy rate significantly during superovulation cycles? *Fertil Steril* 61: 357-61
17. Zeyneloglu HB (2004) Single versus double intrauterine insemination: are outcomes affected? *Curr Opin Obstet Gynecol* 16:251-6
18. Polyzos NP, Tzorias S, Mauri D, Tatsioni A (2010) Double versus single intrauterine insemination for unexplained infertility: a meta-analysis of randomized trials. *Fertil Steril* (in press)
19. Dodson WC, Moessner J, Miller J *et al.* (1998) A randomized comparison of the methods of sperm preparation for intrauterine insemination. *Fertil Steril* 70: 574-5
20. David G, Bisson JP, Czyglik F *et al.* (1975) Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain .1. Proposition pour un système de classification. *J. Gynecol Obstet Biol Reprod* 4: 17-36
21. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A (1988) Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples .1. Study and sperm characteristics. *Int J Androl* 11: 379-384
22. Saleh A, Tan SL, Biljan MM, Tulandi T (2000) A randomized study of the effect of 10 minutes of bed rest after intrauterine insemination. *Fertil Steril* 74: 509-11
23. Erdem A, Erdem M, Atmaca S, Guler I (2009) Impact of luteal phase support on pregnancy rates in intra uterine insemination cycles: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 91: 2508-13
24. Costello ME, Emerson S, Lukic J *et al.* (2004) Predictive value of mid luteal progesterone concentration before luteal support in controlled-ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 44: 51-6
25. Kahn JA, Von Doring V, Sunde A *et al.* (1992) Fallopian tube sperm perfusion: first clinical experience. *Hum Reprod* 7 (suppl 1): 19-24
26. Gregoriou O, Pyrgiotis E, Konidaris S *et al.* (1995) Fallopian tube sperm perfusion has no advantage over intrauterine insemination when used in combination with ovarian stimulation for the treatment of unexplained infertility. *Gynecol Obstet Invest* 39: 226-8
27. Karande VC, Rao R, Pratt DE *et al.* (1995) A randomized prospective comparison between intrauterine insemination and fallopian sperm perfusion for the treatment of infertility. *Fertil Steril* 65: 638-40
28. Nuoja-Huttunen S, Tuomivaara L, Juntunen K *et al.* (1997) Comparison of fallopian tube sperm perfusion with intrauterine insemination in the treatment of infertility. *Fertil Steril* 67: 939-42
29. Cantineau AE, Cohlen BJ, Heineman MJ (2009) Intrauterine insemination versus fallopian tube sperm perfusion for non-tubal infertility. *Cochrane Database Syst Rev* 15: CD001502
30. Comhaire F, Milingos S, Liapi A *et al.* (1994) The effective cumulative pregnancy rate of different modes of treatment of male infertility. *Andrologia* 27: 217-21
31. Wainer R, Merlet F, Bailly M *et al.* (1996) Facteurs pronostiques des inséminations intra-utérines avec sperme du conjoint. *Contracept Fertil Sex* 24: 897-903
32. Lelannou D (1994) L'insémination intra-utérine, indications et résultats. *Contracept Fertil Sex* 22: 361-9
33. Merviel P, Heraud MH, Grenier N *et al.* (2010) Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril* 93: 79-88
34. Plosker S, Amato P (1994) Predicting and optimizing success in an intrauterine insemination stimulation program. *Hum Reprod* 9: 2014-21
35. Nuoja-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R *et al.* (1999) Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod* 14: 698-703
36. Aboulghar M, Mansour R, Serour G *et al.* (2001) Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials. *Fertil Steril* 75: 88-91
37. Zadehmodarres S, Oladi B, Saeedi S *et al.* (2009) Intrauterine insemination with husband semen: an evaluation of pregnancy rate and factors affecting outcome. *J Assist Reprod Genet* 26: 7-11
38. Custers IM, Steures P, Hompes P *et al.* (2008) Intrauterine insemination: how many cycles should be performed? *Hum Reprod* 23: 885-8
39. Wainer R, Albert M, Dorion A *et al.* (2004) Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod* 19: 2060-65
40. Yang JH, WU MY, Chao KH *et al.* (1998) Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination in subfertility. How many treatment cycles are sufficient? *J Reprod Med* 43: 903-8
41. Farhi J, Valentine A, Bahadur G *et al.* (1995) In vitro cervical mucus-sperm penetration tests and outcome of infertility treatments in couples with repeatedly negative post-coital tests. *Hum Reprod* 10: 85-90
42. Tomlinson MJ, Amissah-Arthur JB *et al.* (1996) Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): Statistical model for success. *Hum Reprod* 11: 1892-6
43. Steures P, van der Steeg JW, Verhoeve HR *et al.* (2004) Does ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination for cervical factor subfertility improve pregnancy rate? *Hum Reprod* 19: 2263-6
44. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PGA *et al.* (2007) (Collaborative effort for clinical evaluation in Reproductive Medicine) Effectiveness of intrauterine insemination in subfertile couples with an isolated cervical factor: a randomized clinical trial. *Fertil Steril* 88: 1692-6

45. Helmerhorst FM, Van Vliet HA, Gornas T *et al.* (2005) Intrauterine insemination versus timed intercourse for cervical hostility in subfertile couples. *Cochrane Database Rev* 19: CD002809
46. Helmerhorst FM, Van Vliet HA, Gornas T *et al.* (2006) Intrauterine insemination versus timed intercourse for cervical hostility in subfertile couples. *Obstet Gynecol Surv* 61: 402-14
47. Gallot-Lavallée P, Ecochard R, Mathieu C *et al.* (1995) Clomiphène citrate or HMG: which ovarian stimulation to chose before intrauterine insemination? A meta-analysis. *Contracept Fertil Sex* 23: 115-21
48. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PGA *et al.* (2007) The additional value of ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination for couples with an abnormal postcoital test and a poor prognosis: a randomized clinical trial. *Fertil Steril* 88: 1618-24
49. Cohlen BJ, Vandekerckhove P, te Velde ER, Habbema JD (2000) Timed intercourse versus intrauterine insemination with or without hyperstimulation for subfertility in men. *Cochrane database Syst Rev*: CD000360
50. Bendsdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ, Vandekerckhove P (2007) Intrauterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000360
51. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD *et al.* (1998) Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 70: 207-13
52. Zeynoluglu HB, Arici A, Olive DL, Duleba AJ (1998) Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis. *Fertil Steril* 69: 486-91
53. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG *et al.* (2006) Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial. *Lancet* 368: 216-21
54. Snick HK, Collins JA, Evers JL (2008) What is the most valid comparison treatment in trials of intrauterine insemination, timed or uninfluenced intercourse? A systematic review and meta-analysis of indirect evidence. *Hum Reprod* 23: 2239-45
55. Erdem A, Erdem M, Atmaca S *et al.* (2008) Factors affecting birth rate in intrauterine insemination cycles with recombinant gonadotrophin stimulation. *Reprod Biomed Online* 17: 199-206
56. Dovey S, Sneringer RM, Penzias AS (2008) Clomiphene citrate and intrauterine insemination: analysis of more than 4,100 cycles. *Fertil Steril* 90: 2281-6
57. Bronte A, Stone PD, Ringer AL, Stein AL, Marrs RP (1999) Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcome of 9963 consecutive cycles. *Obstet Gynecol* 180: 1522-64
58. Goverde A, McDonnell, Vermeiden R *et al.* (2000) Intrauterine insemination or in-vitro fertilization in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost effectiveness analysis. *Lancet* 355: 13-18
59. Harris ID, Missmer SA, Hornstein MD (2010) Poor success of gonadotropin-induced controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for older women. *Fertil Steril* (in press)
60. Mullin CM, Virji N, Saketos M, San Roman G (2005) Day 2 Follicles stimulating hormone (FSH) and estradiol (E2): could these values be used as markers to predict pregnancy outcomes in women undergoing ovulation induction (OI) therapy with intrauterine insemination (IUI) cycles? *Fertil Steril* 84: S162
61. Cantineau AE, Cohlen BJ, Heineman MJ (2007) Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonist/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 18: CD005356
62. Van Rumste MM, Custers IM, van der Veen F *et al.* (2008) The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 14: 563-70
63. Guven S, Gunalp GS, Tekin Y (2008) Factors influencing pregnancy rates in intrauterine insemination cycles. *J Reprod Med* 53: 257-65
64. Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Plachot M (1999) Intrauterine insemination. *Contracept Fertil Sex* 27: 616-21
65. Jakus S, Spandorfer S, Rosenwaks Z (2005) Natural cycle and timing of intrauterine insemination: HCG versus spontaneous LH surge. *Fertil Steril* 84: 366-7
66. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD *et al.* (2002) Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology* 60: 497-501
67. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K *et al.* (2001) Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2,473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80: 74-81
68. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE *et al.* (2001) Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 75: 661-8
69. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M (2009) Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 91: 777-81
70. Huang HY, Lai YM (1996) The impact of the total motile sperm count on the success of intrauterine insemination with husband's spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 13: 56-63
71. Sakhel K, Schwarck S, Ashraf M, Abuzeid M (2005) Semen parameters as determinants of success in 1,662 cycles of intrauterine insemination after controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 84: 248-9
72. Dickey RP, Lu PY, Taylor SN, Rye PH (1999) Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. *Fertil Steril* 71: 684-9
73. Horvath PM, Shelden RM, Kemmen E (1989) The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 52: 288-94
74. Haim D, Leniaud L, Porcher R *et al.* (2009) Évaluation prospective de l'impact des paramètres spermatozoaires sur le succès des inséminations intra-utérines. *Gynecol Obstet Fertil* 37: 229-35
75. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E *et al.* (2003) Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 7: 485-92
76. Van Weert JM, Repping S, Van Voorhis *et al.* (2004) Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. *Fertil Steril* 82: 612-20
77. Yalti S, Gurbuz B, Sezer H, Celik S (2004) Effects of semen characteristics on IUI combined with mild ovarian stimulation. *Arch Androl* 50: 239-46
78. Burr R, Sieberg C, Matthews C, Flaherty S (1996) The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril* 65: 127-32
79. Hauser R, Yogev L, Botchan A *et al.* (2001) Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia* 33: 13-7
80. Comhaire FH (1987) Simple model and empirical method for the estimation of spontaneous pregnancies in couples consulting for infertility. *Int J Androl* 10: 671-80
81. Eimers JM, te Velde ER, Gerritse R *et al.* (1994) The prediction of the chance to conceive in subfertile couples. *Fertil Steril* 61: 44-52

82. Collins JA, Burrows EA, Willan AR (1995) The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril* 64: 22-28
83. Snick HK, Snick TS, Evers JL, Collins JA (1997) The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod* 12: 1582-8
84. Farhi J, Ben-Haroush A, Lande Y, Fish B (2007) Role of treatment with ovarian stimulation and intrauterine insemination in women with unilateral tubal occlusion diagnosed by hysterosalpingography. *Fertil Steril* 88: 396-400
85. Sacks PC, Simon JA (1991) Infectious complications of intrauterine insemination: a case report and literature review. *Int J Fertil* 36: 331-9
86. Kolb BA, Mercer L, Peters AJ, Kazer R (1994) Ovarian abscess following therapeutic insemination. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1: 249-51
87. Yovich JL, Matson PL (1988) The treatment of infertility by the high intrauterine insemination of husband's washed spermatozoa. *Hum Reprod* 3: 939-43
88. Dodson WC, Haney AF (1991) Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 55: 457-67
89. Dickey RP, Olar TT, Taylor SN *et al.* (1991) Relationship of follicle number, serum estradiol and other factors to birth rate and multiparity in human menopausal gonadotropin induced intruterine insemination cycles. *Fertil Steril* 56: 89-92
90. Shelden R, Kemmann E, Bohrer M, Pasquale S (1988) Multiple gestation is associated with the use of high sperm numbers in the intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 49: 607-10
91. Tur R, Barri PN, Coroleu B *et al.* (2001) Risk factors for high-order multiple implantation after ovarian stimulation with gonadotrophins: evidence from a large series of 1,878 consecutive pregnancies in a single centre. *Hum Reprod* 16: 2124-29
92. Yudin MH, Asztalos EV, Jefferies A *et al.* (2001) The management and outcome of high order multifetal pregnancies: obstetric, neonatal and follow up data. *Twin Res* 4: 4-11
93. The ESHRE Capri Workshop Group (2000) Multiple gestation pregnancy. *Hum Reprod* 15: 1856-64
94. Massin N, Cedrin-Durnerin I, Hugues JN (2004) Intrauterine insemination: a spontaneous or medically-assisted ovulation? *Gynecol Obstet* 32: 898-903
95. Dicket RP (2009) Strategies to reduce multiple pregnancies due to ovulation stimulation. *Fertil Steril* 91: 1-17
96. Comhaire F (1995) Economic strategies in modern male subfertility treatment. *Hum Reprod (suppl 11)*: 103-6
97. Van Voorhis BJ, Sparks AET, Allen BD *et al.* (1997) Cost-effectiveness of infertility treatments: a cohort study. *Fertil Steril* 67: 830-6
98. Van Voorhis BJ, Stovall DW, Allen BD, Syrop CH (1998) Cost-effective treatment of the infertile couple. *Fertil Steril* 70: 995-1005
99. Van Weert JM, van den Broek J, van der Steeg JW *et al.* (2007) Patients' preference for intrauterine insemination or in vitro fertilization. *Reprod Biomed Online* 15: 422-7
100. Pashayan N, Lyratzopoulos G, Mathur R (2006) Cost effectiveness of primary offer of IVF versus primary offer of IUI followed by IVF (for IUI failures) in couples with unexplained or mild male factor subfertility. *BMC Health Serv Res* 23: 80
101. Royère D (2004) Intrauterine insemination: state-of-the-art in humans. *Gynecol Obstet Fertil* 32: 873-9

P. Clément

Impacts morphologiques et moléculaires de la qualité ovocytaire en assistance médicale à la procréation

Introduction

Les techniques biologiques d'assistance médicale à la procréation (AMP) telles que la fécondation *in vitro* (FIV) avec et sans micromanipulation nous ont permis d'examiner les gamètes, notamment les ovocytes et d'essayer de trouver des critères permettant d'évaluer leurs qualités ; la principale étant de donner un embryon apte à un développement précoce et à une implantation permettant une grossesse évolutive. Les premiers critères utilisés pour évaluer la qualité ovocytaire ont été des critères morphologiques. Ces observations restent souvent relativement subjectives et peu de critères morphologiques semblent être très prédictifs du devenir de la tentative d'AMP. D'autres approches, plus invasives, ont été utilisées, comme par exemple pour évaluer l'aneuploïdie ovocytaire, une cause majeure des échecs de développement embryonnaire. Actuellement, de nouvelles approches se mettent en place, utilisant des méthodes de biologie moléculaires qui permettent d'avoir des évaluations plus objectives de la qualité des ovocytes. Ces méthodes, encore du domaine de la recherche, permettront certainement dans le futur de sélectionner les ovocytes les plus aptes à fusionner avec le spermatozoïde fécondant et à permettre un développement embryonnaire précoce et optimal. Si la qualité ovocytaire n'est pas le seul critère de qualité permettant d'améliorer nos résultats en assistance médicale à la procréation, elle reste un élément très important surtout dans les situations où nous ne pouvons pas congeler d'embryons (soit par refus du couple, soit par interdiction réglementaire) car, dans ces cas, le choix des « meilleurs » ovocytes devient encore plus une nécessité.

Aspects morphologiques de l'ovocyte

Dans l'évaluation morphologique des ovocytes, nous pouvons nous attacher à chercher des critères de qualité à différents niveaux de structure et pour cela il peut être utile, pour simplifier, de séparer les critères cytoplasmiques des critères extracytoplasmiques.

Caractéristiques morphologiques extracytoplasmiques

Complexe cumulo-ovocytaire

Les relations extrêmement étroites qui existent entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent, cellules de la corona radiata et du cumulus, suggèrent que l'appréciation morphologique du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) peut nous donner une indication sur la maturité de l'ovocyte.

Dans le cas d'une FIV classique (sans micro-injection du spermatozoïde), les cellules du cumulus entourant l'ovocyte ne sont pas enlevées avant la mise en fécondation. La qualité ovocytaire ne pourra être évaluée qu'indirectement à travers la structure du CCO. L'évaluation de la maturité nucléaire ovocytaire par la présence du premier globule polaire ne pourra se faire que le lendemain de la mise en fécondation après décoronisation. En effet, dans la majorité des cas, la présence des cellules du cumulus empêche de bien visualiser les caractéristiques morphologiques de l'ovocyte.

Dans le cas d'une FIV avec micro-injection du spermatozoïde (ICSI), la décoronisation (ou dénudation) des cellules du cumulus de l'ovocyte avant l'injection du spermatozoïde permet de visualiser la présence du premier globule polaire et de connaître la maturité nucléaire de celui-ci.

La FIV sans micro-injection est donc une situation où l'évaluation de la qualité morphologique du complexe cumulo-ovocytaire peut présenter un intérêt. Son évaluation a été proposée dès le début des techniques de FIV afin de voir s'il y avait une relation entre la morphologie de ce complexe et les suites de la FIV (fécondation, développement embryonnaire) (1, 2).

Un cumulus expansé et des cellules de la corona radiata de bonne qualité seraient associés à la présence d'un ovocyte ayant une bonne maturité nucléaire (fig. 1). À l'inverse, un cumulus absent ou peu expansé est signe d'une immaturité ovocytaire (fig. 2).

Par la suite, une étude (3) faite au cours de cycles d'ICSI sur l'évaluation de la morphologie du complexe cumulo-ovocytaire au moment de la ponction a montré qu'à peu près 60 % des ovocytes attendus comme immatures sur l'aspect du complexe



Fig. 1 – Complexe cumulo-ovocyttaire de bonne qualité (collection privée du Dr Pierre Boyer).

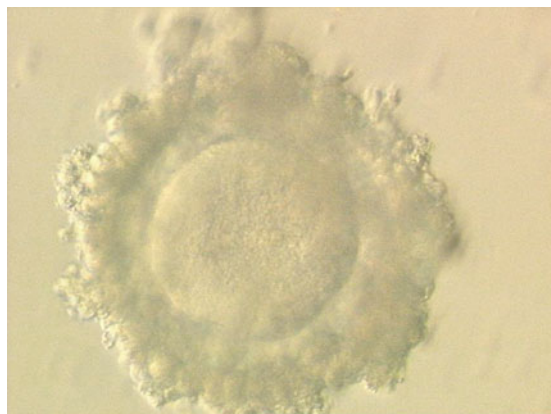


Fig. 2 – Complexe cumulo-ovocyttaire de mauvaise qualité (collection privée du Dr Pierre Boyer).

cumulo-ovocyttaire étaient en fait matures sur la plan nucléaire (en métaphase II) et qu'à l'opposé approximativement 8 % des ovocytes attendus comme matures sur ce même critère ne l'étaient pas.

Une étude prospective (4) a étudié la valeur pronostique de la maturité et de la qualité ovocyttaire et l'évolution de la tentative d'AMP à partir de la morphologie du complexe cumulo-ovocyttaire. Le CCO a été évalué selon une classification allant d'un grade 1 où la corona radiata est bien visible avec un cumulus expansé laissant voir l'ovocyte, jusqu'au grade 4 où la corona radiata est très compacte avec un cumulus peu expansé ne laissant pas voir l'ovocyte. Dans les CCO de grade 1, on retrouve plus de 90 % d'ovocyte en métaphase II. À l'inverse, pour les CCO de grade 4, seuls 25 % des ovocytes sont matures sur le plan nucléaire. En revanche, il n'est pas retrouvé de corrélation entre le grade du CCO et la présence ou l'absence d'anomalies morphologiques cytoplasmiques ou extracytoplasmique (cf. infra) de l'ovocyte. Ceci est en accord avec le fait que les cellules de la corona radiata ont un rôle essentiel sur la maturation ovocyttaire et que cette évaluation peut être un critère intéressant à prendre en compte. Cette même étude a montré également que la présence de caillots sanguins à l'intérieur du CCO retrouvés dans 15 % des cas, et généralement pour les CCO de grade 4, est un élément péjoratif pour la qualité de l'ovocyte avec un nombre significativement augmenté de cas où l'ovocyte était absent.

Néanmoins, l'évaluation de la qualité du CCO reste limitée car elle est dans certains cas assez subjective et dépendante de l'observateur.

L'utilisation du critère morphologique du CCO comme critère de maturité et de qualité de l'ovocyte est donc difficile à utiliser en pratique au laboratoire, d'autant plus que les cohortes d'ovocytes pour une même ponction montrent des qualités de CCO très variables et que son évaluation est très observateur-dépendante (5).

L'observation du CCO peut être objectivement utilisée comme un critère de qualité ovocyttaire, soit dans les cas de CCO présentant des critères morphologiques parfaits (critère de bonne qualité ovocyttaire), soit au contraire de CCO extrêmement compactes avec ou sans caillots sanguins (critère de mauvaise qualité ovocyttaire). Ce critère est en fait peu utile lorsque tous les ovocytes sont mis en fécondation en FIV sans micro-injection car, dans ce cas, ce sont surtout les critères des zygotes et des embryons qui seront pris en compte, ni dans le cas des FIV avec micro-injection où le critère morphologique de l'ovocyte peut être directement évalué. Ainsi, la seule situation où ce critère peut être utile correspond à une FIV sans micro-injection où l'on ne peut pas mettre tous les CCO recueillis à la ponction en fécondation (exemple : en cas de refus de congélation du couple).

Morphologie globale de l'ovocyte

Une fois décoronisée en vue d'une ICSI, la forme globale de l'ovocyte peut être observée au microscope ou à la loupe binoculaire. Celui-ci doit montrer une forme ronde, une zone pellucide régulière, un espace périvitellin homogène avec un globule polaire.

Forme

Dans certains rares cas (moins de 1 %), il est possible d'observer des ovocytes de grandes tailles (ovocytes géants de 200 μ m), témoins d'une anomalie de méiose avec obtention d'ovocytes diploïdes (6). Certains ovocytes présentent une forme ovoïde éventuellement témoin d'une anomalie de la structure protéique de la zone pellucide. Ces anomalies peuvent entraîner une anomalie de la morphologie embryonnaire avec, dans certains cas, une diminution de la jonction entre les blastomères de l'embryon et une altération de la cinétique de développement embryonnaire et un délai augmenté d'obtention des blastocystes (7).

Zone pellucide et espace périvitellin

Il est difficile d'évaluer de manière objective l'influence des aspects morphologiques de la zone pellucide et de l'espace périvitellin sur le devenir du développement embryonnaire en dehors de certaines anomalies franches.

De Sutter *et al.* (8) ont montré que même certaines anomalies assez franches, comme la présence d'une zone pellucide foncée et d'un large espace périvitellin, n'étaient pas corrélés au taux de fécondation et au développement embryonnaire précoce après ICSI.

Pour certains auteurs (9), l'observation des différentes couches de la zone pellucide avec un microscope à polarisation permet d'évaluer la qualité de la structure protéique de celle-ci et ainsi d'isoler certains ovocytes présentant un défaut de structure qui pourrait être dû au « stress » de la dénudation mécanique des cellules du cumulus. L'altération de cette structure protéique serait péjorative pour le développement embryonnaire précoce.

D'autre part, la présence de débris au sein de l'espace périvitellin pourrait être un signe d'une administration trop importante de gonadotrophine au moment de la stimulation (10), mais ceci ne semble pas être péjoratif pour la fécondation et le développement embryonnaire précoce (11) (fig. 3).



Fig. 3 – Ovocyte avec débris dans l'espace périvitellin (collection privée du Dr Pierre Boyer).

Globule polaire

La présence du globule polaire est fondamentale sur le plan morphologique dans la mesure où cela signe la maturité nucléaire de l'ovocyte (preuve que l'ovocyte est en métaphase de deuxième division méiotique) donc son aptitude à être fécondé par un spermatozoïde. Sa présence est un des signes morphologiques utilisés en ICSI, après décoronisation, pour sélectionner les ovocytes qui vont être micro-injectés.

En FIV sans micro-injection, la présence et la qualité des deux globules polaires (le deuxième étant expulsé au moment de la fécondation par le sper-

matozoïde) ne peuvent être évaluées que le lendemain au moment de l'évaluation de la qualité du zygote.

La question de la relation entre la qualité morphologique du globule polaire et les capacités de développement embryonnaire précoce a été posée et une classification de la morphologie du globule polaire a été proposée par Ebner *et al.* (12).

Ces auteurs ont montré qu'une mauvaise qualité morphologique du premier globule polaire était certainement la preuve d'une augmentation du risque d'aneuploïdie de l'ovocyte et qu'il y avait dans cette situation une diminution du taux d'obtention de blastocystes par rapport à des ovocytes montrant une bonne qualité morphologique du globule polaire (13) (fig. 4).

D'autres études ne vont pas dans le même sens et montrent que la morphologie du premier globule polaire n'est pas prédictive de la qualité ovocytaire (14, 15), y compris en ce qui concerne le contenu chromosomique (16).

Il est possible que la fragmentation du premier globule polaire (fig. 5) soit directement liée à la technique d'AMP elle-même, soit au moment de la dénudation de l'ovocyte avant la micro-injection,



Fig. 4 – Ovocyte avec un globule polaire d'aspect normal (collection privée du Dr Pierre Boyer).



Fig. 5 – Ovocyte avec un globule polaire fragmenté (collection privée du Dr Pierre Boyer).

soit pendant la période au cours de laquelle l'ovocyte reste en culture avant la fécondation. En effet, il semble que le pourcentage de globules polaires fragmentés augmente en fonction du délai d'observation de l'ovocyte après la dénudation (16).

Bilan des anomalies extracytoplasmiques

Les anomalies précédentes étant rarement isolées, certains auteurs (17) ont essayé de réaliser un score des anomalies extracytoplasmiques de l'ovocyte (globule polaire, espace périvitellin, etc.). Au total, les anomalies extracytoplasmiques ne semblent pas avoir d'influence significativement négative sur les taux de fécondation, ni sur le développement embryonnaire précoce.

Il faut toutefois noter qu'en cas de répétition d'anomalies extracytoplasmiques chez une même patiente, et bien que ces anomalies ne soient pas forcément identiques d'une tentative à une autre, il semble qu'il y ait une diminution des taux d'implantation et des taux de grossesses (18), dès lors que ces anomalies touchent plus de 50 % de la cohorte ovocytaire.

Caractéristiques morphologiques cytoplasmiques

Comme pour les anomalies extracytoplasmiques, l'impact des anomalies cytoplasmiques sur l'évolution des tentatives d'AMP est controversé.

Fuseau méiotique

Au moment de l'expulsion du premier globule polaire, le fuseau méiotique est présent au sein de l'ovocyte bloqué en métaphase de deuxième division méiotique et l'évaluation de son aspect pourrait être un signe de la qualité ovocytaire.

L'observation du fuseau méiotique ne peut être réalisée qu'avec un microscope équipé d'un polariseur (lumière polarisée assisté par un ordinateur). Comme pour l'observation du globule polaire, le fuseau méiotique peut être observé le jour du prélèvement ovocytaire uniquement pour les tentatives d'ICSI, les ovocytes étant débarrassés de leurs cellules périovocytaires.

Cette technique est principalement utilisée par des équipes étrangères, comme italiennes, suite à la loi interdisant la congélation d'embryons, et qui cherchent à avoir le maximum d'information sur la qualité ovocytaire pour ne mettre en fécondation qu'un nombre limité d'ovocytes, présentant *a priori* les meilleurs critères de fécondation et de développement embryonnaire.

L'absence de fuseau méiotique est un critère de mauvais pronostic puisqu'il a été observé une forte diminution des taux de fécondation (19). Dans cette étude, 9 % des ovocytes (sur une série de 532

ovocytes analysés) n'ont pas de fuseau méiotique visible après dénudation malgré la présence du premier globule polaire. Ces ovocytes sont associés à des anomalies de fécondation avec obtention de zygote à un seul pronucléus, ou au contraire avec plus de deux pronucléi.

Un autre critère important dans l'évaluation du fuseau méiotique est la déviation par rapport à l'emplacement du globule polaire (20). Dans les cas où l'angle entre la position du fuseau et du globule polaire dépasse 90°, on observe une augmentation des anomalies de fécondation avec une fréquence plus élevée de zygotes présentant trois pronucléi suite à une absence d'expulsion du deuxième globule polaire. Cette anomalie semble être secondaire au mécanisme de dénudation des cellules périovocytaires. En effet, lorsque les ovocytes sont recueillis et dénudés au stade de métaphase I, puis maturés *in vitro*, le fuseau méiotique est dans 100 % des cas juste en face du globule polaire. Ce critère d'angulation entre le globule polaire et le fuseau méiotique est également utilisé par ces équipes pour sélectionner les ovocytes qui vont être micro-injectés en ICSI.

Enfin, l'observation d'une structure anormale du fuseau méiotique peut entraîner la formation d'embryons à blastomères multinucléés, éléments péjoratifs de la qualité de l'embryon (21).

Une autre étude (22) a confirmé l'impact de l'emplacement du fuseau méiotique par rapport au premier globule polaire sur le clivage lors de la première division embryonnaire et sur la qualité de la morphologie embryonnaire.

Au total, la structure du fuseau méiotique semble donc être un élément important dans l'évaluation de la qualité ovocytaire, mais nécessite un équipement particulier.

Aspect du cytoplasme : inclusions cytoplasmiques, viscosité cytoplasmique et vacuoles

La présence d'inclusions cytoplasmiques est, pour certaines équipes, un élément péjoratif de la qualité ovocytaire (17) mais par pour d'autres (23). Cette notion controversée est difficile à évaluer en routine car la notion de cytoplasme granuleux est un élément morphologique assez subjectif.

Néanmoins, les inclusions cytoplasmiques ovocytaires semblent augmenter si l'on compare les ovocytes d'une population de patientes âgées de moins de 35 ans et d'une population de patientes âgées de plus de 35 ans (11).

Mais la notion de granulations homogènes ou non est un élément qui doit être pris en compte de manière différente. S'il semble que c'est surtout la présence de nombreuses granulations de couleur foncée, accumulées au centre de l'ovocyte (ovocytes dits en « œil de bœuf », fig. 6) qui soit pour



Fig. 6 – Ovocyte en « œil de bœuf » (collection privée du Dr Pierre Boyer).

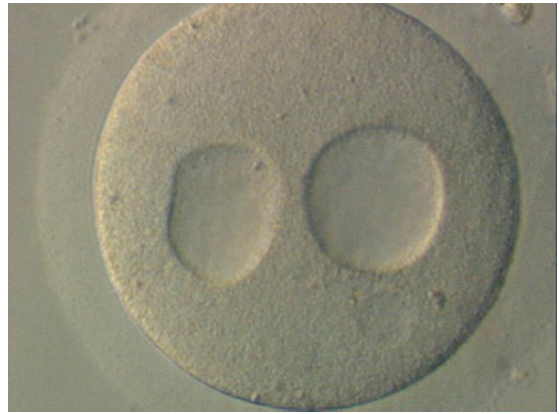


Fig. 7 – Ovocyte avec vacuoles cytoplasmiques (collection privée du Dr Pierre Boyer).

certain un élément réellement défavorable de la qualité ovocytaire, d'autres équipes ne trouvent pas de corrélation entre cette anomalie assez rare et une diminution des taux de fécondation en ICSI, ou une diminution de la qualité embryonnaire obtenue (24).

Viscosité du cytoplasme

La viscosité cytoplasmique, évaluée au moment de l'injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI) en observant le retour à la forme normale du cytoplasme (disparition de l'invagination cytoplasmique) immédiatement après avoir retiré la pipette de micro-injection, est aussi un élément qui doit être pris en compte dans l'évaluation de la qualité ovocytaire (25). Un retour trop lent à la forme normale de l'ovocyte après la micro-injection semble être en faveur d'une anomalie de la structure cytoplasmique pouvant se traduire par une diminution du développement embryonnaire précoce. Mais, là encore, cette évaluation reste assez subjective.

Vacuoles

La présence de vacuoles cytoplasmiques (fig. 7) semble, pour certains auteurs, être un élément important à noter dans l'évaluation de la qualité ovocytaire (18, 23).

Les vacuoles peuvent être de différentes origines (invaginations cytoplasmiques, accumulation de réticulum endoplasmique, nécrotiques) et peuvent varier en nombre et en taille.

La présence de vacuoles de grandes tailles ou en quantité importante est un élément péjoratif par les modifications qu'elles entraînent sur le cytosquelette de l'ovocyte (26).

Certains types de vacuoles, quand elles sont analysées par un microscope à transmission d'électrons, sont caractérisés comme ayant une structure de réticulum endoplasmique lisse (REL). Ces vacuoles peuvent être visibles au microscope inversé quand

elles sont de tailles suffisantes, mais elles sont bien visualisées uniquement au microscope électronique quand elles sont de petites tailles. Elles sont différentes des vacuoles nécrotiques observables classiquement au microscope inversé.

Les auteurs (27) obtiennent avec ces ovocytes présentant des vacuoles de type REL, des taux de fécondation identiques à ceux obtenus avec des ovocytes qui en sont dépourvus, mais des taux de grossesses inférieurs ; ces vacuoles étant plus fréquentes dans les ovocytes des populations de patientes plus âgées ainsi que dans les cas où le taux d'œstradiol est le plus élevé au moment du déclenchement de l'ovulation. À partir du moment où dans une cohorte ovocytaire, il existe des ovocytes présentant ces accumulations de REL, même en transférant des embryons obtenus à partir d'ovocytes ne présentant pas cette anomalie, les taux de grossesses restent faibles, bien qu'il n'y ait pas de modification des taux de fécondation, ni de clivage embryonnaire après ICSI. Parmi les 10 % de cycles présentant des accumulations de REL, on trouve en moyenne 30 % des ovocytes atteints.

Ces anomalies sont visualisées uniquement dans les ovocytes en MII, jamais dans ceux en métaphase I, ni au stade de vésicule germinative, et pour les cycles avec un taux d'œstradiol significativement plus élevé.

La présence d'accumulations anormales de REL pourrait entraîner des perturbations du métabolisme du calcium, élément stocké dans ces organites cellulaires et dont la libération dans le cytoplasme (flux calciques) est fondamentale dans les mécanismes de fécondation et des premières phases du développement embryonnaire précoce.

La présence de vacuoles de ce type fait partie de différentes anomalies de structures décrites pour l'ovocyte (granulations sombres, regroupement d'organelles, accumulation de réticulum endoplasmique lisse, régions nécrotiques) qui pourraient être corrélées à un taux d'aneuploïdies augmenté

des mêmes ovocytes (28, 29) ; ces anomalies devant être analysées dans leur ensemble. Bien que certaines études ne montrent pas d'influences de la morphologie de l'ovocyte sur les taux de fécondation en ICSI, ni sur le développement embryonnaire précoce (8), il semble que les dysmorphies ovocytaires sévères soient en cause dans des taux d'implantation et de grossesses plus bas (18, 23) et dans des taux de fausses couches spontanées plus élevées (30, 31), et ceci même si certaines anomalies comme par exemple les vacuoles n'ont pas forcément la même origine (32).

Ovocyte d'aspect normal

En pratique quotidienne, nous pouvons essayer de retenir certains critères pour définir un ovocyte dit « normal » ou « idéal » (fig. 8). Une étude multicentrique (33) avait ainsi retenu les éléments suivants : forme ronde de l'ovocyte, cytoplasme clair, homogène et réfringent, globule polaire intact (non fragmenté), rond ou légèrement ovale, espace périvitellin réduit et sans débris, zone pellucide claire. Cette étude, sur près de 1 900 ovocytes, a montré qu'en fonction des centres, entre 5 et 60 % des ovocytes étaient « normaux ». Étant donné qu'il est difficilement envisageable qu'il y ait réellement une telle différence de qualité ovocytaire entre les équipes suite à de fortes différences de recrutement des patientes, il est probable que la variation inter-centres soit liée à la subjectivité de l'observation des biologistes et des techniciennes, montrant ainsi de façon indirecte que la qualité morphologique ovocytaire est un critère difficile à évaluer.

Plutôt que d'essayer de reconnaître l'ovocyte idéal, il est peut être préférable de faire un score des anomalies (extracytoplasmiques et cytoplasmiques) et de voir si l'on peut établir une corrélation entre ce score et les taux de fécondation et la qualité du

développement embryonnaire précoce. Différentes études ont montré que ce sont principalement les anomalies morphologiques cytoplasmiques qui peuvent être corrélées à une diminution des taux de fécondation et de la qualité embryonnaire (17), les anomalies extracytoplasmiques n'ayant que peu d'influence sur la suite du développement embryonnaire après ICSI (11, 34). Néanmoins, la répétition d'anomalies spécifiques au cours de différents cycles de stimulations successifs semble être plutôt péjorative (18).

Afin de confirmer ou non l'impact des ces anomalies ovocytaires, il a été réalisé une évaluation de la qualité ovocytaire et ses répercussions sur le taux de fécondation et la qualité embryonnaire sur un groupe de 160 donneuses fertiles d'ovocytes (35) de moyenne d'âge à $26,3 \pm 4,3$ ans. L'analyse de plus de 1 600 ovocytes en métaphase II a donc permis d'évaluer la qualité ovocytaire sur des critères extracytoplasmiques (espace périvitellin, présence de débris périvitellin, forme ovocytaire, intégrité de la zone pellucide, aspect fragmenté ou non du 1^{er} globule polaire) et des critères cytoplasmiques (granularité du cytoplasme, couleur du cytoplasme, présence ou non de vacuoles). 94,5 % des ovocytes en métaphase II présentaient au moins une anomalie morphologique, mais parallèlement aucune de ces anomalies, y compris les anomalies cytoplasmiques, n'avait d'influence sur le taux de fécondation, ni sur la qualité du développement embryonnaire précoce. Cette différence avec les études réalisées sur des populations infertiles montrant une influence des anomalies cytoplasmiques (notamment la présence de vacuoles) peut être expliquée par l'âge moyen plus bas des donneuses.

L'évaluation de la qualité est donc difficilement objectivable d'un point de vue morphologique, et une approche à un niveau, génétique et/ou moléculaire peut certainement apporter des arguments plus fiables.



Fig. 8 – Ovocyte d'aspect morphologiquement normal (collection privée du Dr Pierre Boyer).

Aspects cytogénétiques et génétiques de l'ovocyte

L'aneuploïdie de l'ovocyte, définie comme la présence d'un nombre anormal de chromosomes, est à l'origine de la constitution d'un embryon aneuploïde qui, dans la majorité des cas, ne se développera pas au-delà de quelques jours, ou entraînera la survenue d'une fausse couche.

Durant une méiose normale, le patrimoine génétique d'un ovocyte I est constitué de 46 chromosomes (2 par paires) à 2 chromatides. Au cours de la division réductionnelle, il y a division de ce patrimoine et obtention de 2 cellules symétriques

du point de vu chromosomique (et non cytoplasmique), l'ovocyte II et le 1^{er} globule polaire, les deux possédant 23 chromosomes à 2 chromatides. Puis, il y a la division équationnelle de l'ovocyte II, suite à la fécondation permettant l'obtention de 2 cellules, l'ovule fécondé (zygote) et le 2^e globule polaire, possédant chacun 23 chromosomes à une chromatide.

Les anomalies chromosomiques du fœtus sont principalement liées à des anomalies méiotiques d'origine ovocytaires (36) puisque 93 % des trisomies 18, 95 % des trisomies 21 et 100 % des trisomies 16 sont d'origine maternelle (37), même si une origine paternelle est présente dans certains cas (38).

L'augmentation de l'aneuploïdie des ovocytes est également liée principalement à l'âge de la patiente et secondaire à des anomalies du fuseau méiotique (15).

Différentes études utilisant des ovocytes humains après échecs de fécondation montrent que les aneuploïdies ovocytaires sont principalement secondaires à des anomalies de la première partie de la méiose et plus particulièrement à des anomalies de séparation des chromatides sœurs (39, 40). Ce type d'anomalie de non-disjonction des chromosomes entraîne une séparation prématurée des chromatides sœurs au cours de l'anaphase de la première division méiotique et secondairement une ségrégation aléatoire des chromatides libres au cours de la deuxième division méiotique (fig. 9).

L'étude de la cytogénétique des ovocytes, de façon indirecte par l'analyse du 1^{er} ou des 2 globules polaires ou de l'embryon, au cours de certains protocoles de FIV permet donc de sélectionner les ovocytes euploïdes mais permet aussi de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des échecs de développement embryonnaire (41, 42) (voir « Diagnostic préconceptionnel » du présent ouvrage).

En plus des femmes âgées de plus de 35 ou de 38 ans identifiées comme à haut risque d'aneuploïdie ovocytaires (43), d'autres populations ont été identifiées comme à risque accru : les femmes en échecs d'implantation (44) ou les femmes ayant des fausses couches à répétition (45).

Certaines équipes ont essayé de sélectionner les embryons euploïdes afin d'augmenter les chances de développement embryonnaire précoce et de grossesses évolutives. Ces essais de « screening » des embryons euploïdes n'ont pas donné les résultats attendus en termes d'amélioration du taux de grossesses à tel point que beaucoup d'équipes qui avaient mis en place cette approche ont arrêté ces pratiques (46).

En dehors du fait que la biopsie de deux cellules est certainement délétère pour le développement embryonnaire précoce, il est aussi certain que la qualité ovocytaire dont dépend en partie la qualité embryonnaire ne peut pas se résumer à la notion d'embryon euploïde donc d'ovocyte et de spermatozoïde euploïdes pour former cet embryon.

La qualité d'un ovocyte est globalement considérée comme la possibilité qu'à celui-ci de prendre en charge le spermatozoïde fécondant, de permettre la fusion des noyaux et un bon développement embryonnaire précoce. Or, jusqu'au stade j3 chez l'Humain, l'embryon utilise les réserves protéiques et les réserves en ARN de l'ovocyte puisque l'activation du génome embryonnaire s'effectue seulement à partir du troisième jour. Les mécanismes très complexes du développement embryonnaire précoce sont donc directement liés aux capacités moléculaires de l'ovocyte, différents gènes étant par exemple décrits (47) comme impliqués dans les phénomènes d'insuffisance ovarienne précoce : gènes *FMR1* (48), *BMP15* (49), *FOXL2* (50)...

Grâce aux nouvelles technologies utilisées en biologie moléculaire, on peut s'intéresser aujourd'hui au processus de maturation de l'ovocyte et surtout des gènes qui pourraient être impliqués dans ces phénomènes.

Aspects moléculaires de l'ovocyte

L'ovocyte est une cellule très hautement spécialisée au sein de laquelle les mécanismes moléculaires sont complexes.

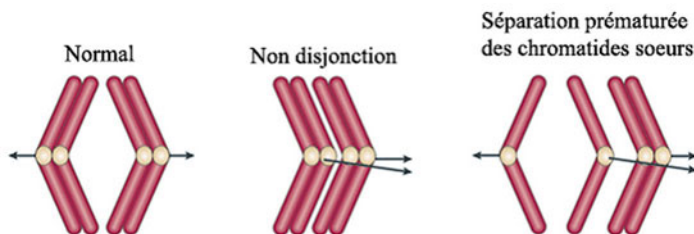


Fig. 9 – Ségrégation méiotique normale et anomalies de ségrégation : non-disjonction classique aboutissant à la présence de deux chromosomes homologues dans la métaphase II ou séparation prématurée des chromatides sœurs aboutissant à la présence d'une (ou de deux) chromatide(s) libre(s) dans la métaphase II.

Dès le 7^e mois de vie fœtal, le cortex ovarien contient le stock de follicules primordiaux dans lesquels se trouvent des ovocytes bloqués en prophase de première division méiotique (prophase I) au stade de vésicule germinative. Les ovocytes vont rester ainsi bloqués pendant plusieurs années (de 10 à 50) jusqu'à ce que le follicule primordial qui le contient soit recruté et entre dans une phase de croissance. L'ovocyte reprend alors le mécanisme de la méiose et atteint le stade de métaphase de deuxième division méiotique avec expulsion du premier globule polaire (51).

Pendant cette phase de recrutement et de croissance folliculaire, sous l'influence des hormones gonadotropes, l'ovocyte est le siège de nombreuses manifestations et modifications moléculaires. Ainsi, après avoir passé plusieurs années dans une phase de quiescence en prophase I, l'ovocyte doit, en une quinzaine de jours, modifier son profil moléculaire afin de pouvoir prendre en charge la fécondation par un spermatozoïde et le développement embryonnaire précoce (voir chapitre « Ovogenèse » du présent ouvrage). Différents phénomènes importants ont lieu pendant cette phase : modification de la structure de la chromatine (condensation), répression de la transcription, modification de l'empreinte génomique par modification du profil de méthylation de l'ADN, modification de la structure des histones, production de glutathion S peroxydase, compétence à la reprise de méiose, modification des microtubules du cytosquelette, réarrangement des centrosomes avec des mécanismes de phosphorylation, compétence à mise en place des oscillations calciques, et au relargage des granules corticaux, etc. (52).

Tous ces mécanismes sont extrêmement importants pour la prise en charge de la fécondation par le spermatozoïde et du développement embryonnaire précoce et comme nous l'avons vu plus haut, ils sont difficilement corrélés à la qualité morphologique de l'ovocyte, en dehors de la présence du 1^{er} globule polaire qui signe la maturité nucléaire.

L'analyse moléculaire de l'ovocyte n'étant actuellement pas possible en pratique clinico-biologique, afin de connaître l'ovocyte qui pourrait avoir le meilleur potentiel pour un développement embryonnaire ultérieur de bonne qualité, de nouvelles approches diagnostiques utilisent les cellules du cumulus entourant cet ovocyte. Les analyses de ces cellules en utilisant par exemple des techniques d'hybridation génomique comparative ou de puces d'expression génomique permettent d'analyser les modifications d'expression de nombreux gènes en cause dans la viabilité de l'ovocyte et la compétence de celui-ci (53).

Ces nouvelles méthodes diagnostiques ont montré que les profils d'expression des gènes issus de

cellules du cumulus de différents ovocytes sont différents en fonction de la qualité embryonnaire obtenu, et que l'expression de certains gènes comme *BCL2L11*, *PCK1* et *NFIB* pouvaient être proposés comme biomarqueurs de la qualité ovocytaire (54).

Ces méthodes permettront peut-être dans le futur de s'affranchir des critères morphologiques subjectifs de qualité ovocytaire.

L'utilisation des puces d'expression de gènes a d'ailleurs permis d'expliquer certains défauts complets de fécondation par la mise en évidence de déficit d'expression de gènes nécessaires à l'activation de l'ovocyte en métaphase II (55).

Dans notre pratique quotidienne, une des causes importantes de ces augmentations d'échecs des tentatives est liée à l'âge et aux problèmes chromosomiques (augmentation des aneuploïdies des ovocytes). À partir de 30 ans, chaque année supplémentaire pourrait se traduire par une diminution importante (11 %) de chances d'obtenir une grossesse évolutive (56).

Des études chez l'animal ont montré que différents mécanismes moléculaires régulant les phénomènes de méiose ovocytaire sont altérés avec l'âge. On note par exemple une altération des protéines de régulation de la méiose I (*MAD2*, *SMCbeta1*, etc.) entraînant un blocage au stade de vésicule germinative et une désynchronisation nucléo-cytoplasmique (57) ; une altération des kinases comme le *maturation promoting factor* (MPF), ou le *mitogene activated protein kinase* (MAPK) régulant la reprise de méiose II (58) ; une altération des télomères (partie terminale des chromosomes) entraînant une dérégulation de la ségrégation chromosomique (59) ; et surtout une altération des cohésines (protéines permettant le maintien des chromatides) entraînant une séparation prématurée des chromatides sœurs (60).

Ces anomalies métaboliques expliquent l'augmentation des anomalies chromosomiques de l'ovocyte avec l'augmentation de l'âge de la patiente. Mais les anomalies chromosomiques ne sont pas les seules responsables de la diminution des taux de grossesses dans ces situations. D'autres mécanismes métaboliques sont altérés quand l'âge augmente, comme la vascularisation folliculaire ou la qualité des fonctions mitochondriales.

La vascularisation du follicule est altérée avec l'âge, entraînant une diminution de l'apport en oxygène au follicule (61) et une altération du métabolisme ovocytaire (62). Une étude du profil d'expression génique (ARN) sur des ovocytes non fécondés en FIV a montré que l'expression de différents gènes ayant une fonction majeure dans le métabolisme ovocytaire (régulation du cycle cellulaire, structure du cytosquelette, profil énergétique de la cellule, contrôle de la transcription, réponse au stress

oxydatif) est directement fonction de l'âge de la patiente (63).

De plus, la qualité des fonctions mitochondriales, fondamentale à la formation des molécules d'ATP, et donc nécessaire au bon fonctionnement énergétique de la cellule ovocytaire est également altérée avec l'augmentation de l'âge (64-66) et principalement par le stress oxydatif. Différents moyens de défense sont mis en place par la cellule pour se défendre contre ce stress oxydatif (superoxyde dismutase, catalase, glutathion S peroxydase, etc.) mais l'efficacité de ces moyens de défenses diminue avec l'âge de toute cellule (67), y compris dans l'ovocyte et les cellules périovocytaires (68).

Ces différentes anomalies moléculaires montrent que la qualité de l'ovocyte que nous obtenons en FIV ne doit pas se résumer à une maturité nucléaire (présence du premier globule polaire), mais aussi à une maturation « cytoplasmique » ou plutôt moléculaire, faisant intervenir de nombreux phénomènes biologiques, et dont les altérations avec l'augmentation de l'âge expliquent en grande partie la baisse de nos résultats de grossesses chez les patientes plus âgées. Il est clair, dans ces conditions, que nos procédures actuelles d'assistance médicale à la procréation ne peuvent être qu'une réponse très partielle à ces problèmes.

Influence de la stimulation sur la qualité ovocytaire

Nous ne pouvons pas terminer ce chapitre sans parler de la particularité des ovocytes que nous analysons en AMP puisque ce sont des ovocytes qui ont été soumis à une forte stimulation hormonale.

Il est très probable que ces ovocytes soumis à de fortes doses de gonadotrophines ne présentent pas les mêmes caractéristiques que les ovocytes venant d'une ovulation spontanée.

Sur le plan chromosomique, l'étude de Baart (69) montre que le fait de diminuer les doses de gonadotrophines (FSH) au cours de la stimulation pendant un processus d'AMP permet d'obtenir un taux d'embryons euploïdes plus important.

Ces données sont à mettre en relation avec le fait que la FSH a une action directe sur le fuseau méiotique (70) et qu'une augmentation du taux de FSH pourrait entraîner une augmentation de l'aneuploïdie ovocytaire (71).

Les technologies de biologie moléculaires citées plus haut et utilisant les cellules du cumulus montrent aussi qu'en fonction des traitements de stimulation utilisés, les profils protéiques de ces cellules sont différents (72).

Il est également possible que les protocoles de stimulation ovarienne entraînent dans certains cas

des modifications des mécanismes d'empreintes génomiques pour les ovocytes qui sont soumis à ces protocoles. Dans l'ovogenèse, les mécanismes de modifications de l'empreinte de certains gènes (*IGF2R*, *SNRPN*, *PEG1*, *PEG3*, etc.) sont effectués au moment où l'ovocyte est arrêté en prophase I et pendant la transition entre le follicule primordial et le follicule antral (73), période au cours de laquelle l'ovocyte est soumis aux fortes doses de FSH. Or, une étude récente (74) analysant la méthylation de quatre gènes soumis à empreinte (*PEG1*, *LIT1* et *ZAC* et *H19*) a montré qu'en cas de stimulation ovocytaire, il y a dans l'ovocyte des modifications des profils de méthylation par rapport à une situation naturelle, sans stimulation. La stimulation ovarienne pourrait donc entraîner des changements d'expression de gènes (comme par exemple *DNMT3* qui synthétise la DNA méthyltransférase) qui sont nécessaires à la régulation de l'empreinte génomique effectuée pendant la maturation ovocytaire. Ces résultats demandent à être confirmés sur d'autres séries pour confirmer l'impact d'une forte dose de gonadotrophines sur la qualité ovocytaire.

Conclusion

L'amélioration des résultats des tentatives d'AMP passe par une meilleure évaluation de nos pratiques et l'utilisation de critères qualités fiables afin d'essayer de reconnaître les embryons les plus aptes à donner une grossesse évolutive. Parmi ces critères, la qualité ovocytaire est fondamentale puisque l'ovocyte est le gamète qui prend en charge le développement embryonnaire jusqu'au stade de l'activation du génome embryonnaire (au troisième jour post-fécondation chez l'Humain). Les critères d'évaluation de l'ovocyte peuvent être des critères morphologiques dont certains gardent une pertinence, mais malheureusement beaucoup restent assez subjectifs et peu prédictifs du devenir de la tentative. Les critères morphologiques ovocytaires doivent donc s'associer aux critères morphologiques du spermatozoïde et de l'embryon dans l'évaluation globale de la tentative et dans le choix du ou des embryons à transférer.

Des méthodes plus invasives comme la biopsie du globule polaire peuvent avoir un intérêt pronostique dans certaines situations et être ainsi utilisées pour mieux choisir l'embryon à transférer pour améliorer les chances de grossesses évolutives. Les nouvelles méthodes diagnostiques de biologie moléculaire permettront probablement, à travers l'analyse des profils génomiques ou protéomiques, notamment des cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte, d'avoir une évaluation plus objective de la qualité ovocytaire.

Ces méthodes nous permettront peut-être dans l'avenir, en pratique clinico-biologique, de mieux sélectionner les ovocytes, gage d'une bonne qualité de développement embryonnaire et de meilleurs taux de grossesses évolutives et ainsi d'améliorer la prise en charge des couples, notamment dans les situations où la congélation embryonnaire n'est pas réalisée, soit par choix du couple, soit par interdiction réglementaire.

Références

1. Veeck LL (1990) The morphological assesment of human oocytes and early concepti. In: Keel BA, Webster BW Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. CRC Press Boca Raton, Boston: 353-69
2. Veeck LL (1999). The human oocyte. In: Veeck LL, ed. An Atlas of Human Gametes and Conceptus. Parthenon Publishing, New York, London, p 19-24
3. Rattanachaiyanont M, Leader A, Léveillé MC (1999) Lack of correlation between oocyte-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 71: 937-40
4. Ebner T, Moser M, Shebi S *et al.* (2008) Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. *Reprod Biomed Online* 16: 801-7
5. Hammitt DG, Syrop CH, Van Voorhis BJ (1992) Prediction of nuclear maturity from cumulus coronal morphology: influence of embryologist experience. *J Assist Reprod Genet* 9: 439-46
6. Rosenbusch B, Schneider M (2002) Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod* 17: 2388-93
7. Ebner T, Moser M, Tews G (2004) Intracytoplasmic sperm injection in zona-free oocytes. *J Turkish German Gynecol Assoc* 5: 294-8
8. De Sutter P, Dozortsev D, Quian C *et al.* (1996) Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11: 595-7
9. Shen Y, Stalf T, Mehnert C *et al.* (2005) High magnitude of light retardation by zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 20: 1596-606
10. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D *et al.* (1998) Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13: 3425-30
11. Basak Balaban BS, Bulent Uman. (2006) Effect of morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 12: 608-15
12. Ebner T, Moser M, Yaman C *et al.* (1999) Elective transfert of embryos selected on the basis of first polar morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 72: 599-603
13. Ebner T, Moser M, Sommergruber M *et al.* (2002) First polar body and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 17: 2415-8
14. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM *et al.* (2004) First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod* 19: 2334-9
15. De Santis L, Cino I, Rabellotti E *et al.* (2005) Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online* 11: 36-42
16. Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N *et al.* (2003) Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online* 7: 336-41
17. Xia P (1997) Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusion with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 2: 1750-5
18. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S *et al.* (2001) Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycle. *Hum Reprod* 16: 2118-23
19. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F (2003) Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 18: 1289-93
20. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M. (2004) Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 10: 192-8
21. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S (2004) Occurrence of maternal and paternal spindles in unfertilized human oocytes: possible relationship to nucleation defects after silent fertilization. *Reprod Biomed Online* 8: 454-9
22. Cooke S, Tyler JP, Driscoll GL (2003) Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 11: 2397-405
23. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A *et al.* (1997) Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 1267-70
24. Kahraman S, Yakin K, Dönmez E *et al.* (2000) Relationship between granular cytoplasm of oocyte and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15: 2390-93
25. Ebner T, Moser M, Sommergruber M *et al.* (2003) Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 18: 1294-8
26. Van Blerkom J (1990) Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organisation in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Tech* 16: 324-46
27. Otsuki J, Okada A, Morimoto K *et al.* (2004) The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 19: 1591-97
28. Van Blerkom J, Henry G (1988) Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbations in chromosomal organization and complement. *Hum Reprod* 3: 777-90
29. Van Blerkom J, Henry G (1992) Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 7: 379-90
30. Alikani M, Palermo G, Bertoli M (1995) Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 3: 283-8
31. Sathananthan AH (1997) Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 10: 21-38
32. Zamboni L, Thompson RS, Smith DM (1972) Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 7: 425-57
33. Plachot M, Selva J, Wolf JP *et al.* (2002) Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intra cytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. *Gynecol Obstet Fertil* 30: 772-9
34. Ebner T, Yaman C, Moser M *et al.* (2001) A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assisted Reprod Genet* 18: 601-6
35. Ten J, Mendiola J, Vioque J *et al.* (2007) Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 14: 40-8

36. Boué J, Boué J (1974) Chromosomal abnormalities and abortion. *Basic Life Sci* 4: 317
37. Nicolaides P, Petersen MB (1998). Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13: 313-9
38. Martin R. (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 16: 523-31
39. Pellestor F (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86: 283-8
40. Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86: 383-7
41. Vialard F, Pellestor F (2008) Benefits of human gamete cytogenetic: results and perspectives. *Pathol Biol* 56: 388-99
42. Munné S, Ary J, Zouves C *et al.* (2006) Wide range of chromosomes abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online* 12: 340-6
43. Vialard F, Petit C, Bergere M *et al.* (2006) Evidence of high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age. *Hum Reprod* 21: 1172-8
44. Vialard F, Lombroso R, Bergere M *et al.* (2007) Oocyte aneuploidy mechanisms are different in two situations of increased chromosomal risk: older patients and patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 87: 1333-9
45. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L *et al.* (2005) Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 53: 323-36
46. Cohen J, Wells D, Munne S (2007) Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 87: 496-503
47. Rizzio F, Bione S, Sala C *et al.* (2006) Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Hum Reprod* 21: 1477-83
48. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH (2009) A pilot study of premature ovarian senescence: Correlation of triplet CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullarian hormone. *Fertil Steril* 91: 1707-11
49. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L (2004) Hypergonadotrophic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75: 106-11
50. Harris SE, Chand AL, Winship IM *et al.* (2002) Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 8: 729-33
51. Mermillod P (2001) Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. In : Thibault C, Levasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, INRA : 348
52. Albertini DF, Sanfins A, Combelles C (2003) Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 6: 410-5
53. Patrizio P, Fragouli E, Bianchi V *et al.* (2007) Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod Biomed Online* 15: 346-53
54. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K *et al.* (2008) A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 14: 711-9
55. Gasca S, Reyftmann L, Pellestor F *et al.* (2008) Total fertilization failure and molecular abnormalities in metaphase II oocytes. *Reprod Biomed Online* 17: 772-81
56. Wang YA, Healy D, Black D *et al.* (2008) Age-specific success rate for women undertaking their first assisted reproduction technology treatment using their own oocytes in Australia, 2002-2005. *Hum Reprod* 23: 1633-8
57. Cukurcam S, Betzendahl I, Michel G *et al.* (2007) Influence of follicular fluid meiosis-activating sterol on aneuploidy rate and precocious chromatid segregation in aged mouse oocytes. *Hum Reprod* 22: 815-28
58. Tatone C, Carbone MC, Gallo R (2006) Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod* 74: 395-402
59. Keefe DL, Liu L, Marquard K (2007) Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci* 64: 139-43
60. Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R *et al.* (2005) SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 21: 1351-5
61. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R (1997) The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood characteristics. *Hum Reprod* 12: 1047-55
62. Costello F, Shrestha SM, Sjoblom P *et al.* (2006) Power doppler ultrasound assesment of the relationship between age and ovarian perfollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 23: 359-65
63. Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells G (2007) Maternal age related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 14: 700-8
64. Takeuchi T, Neri QV, Katagiri Y *et al.* (2005) Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis. *Biol Reprod* 72: 700-8
65. Dumollard R, Duchon M, Carroll J (2007) The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 77: 21-49
66. Van Blerkom J (2008) Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Biomed Online* 16: 553-69
67. Kregel KC, Zhang HJ (2007) An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects and pathological considerations. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 292: 18-36
68. Tatone C, Carbone MC, Falone S *et al.* (2006) Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutase and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 12: 655-60
69. Baart E, Martini E, Eijkemans M *et al.* (2007) Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 22: 80-8
70. Rossi G, Macchiarelli G, Palmerini MG *et al.* (2006) Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during in vitro maturation of mouse oocytes. *Hum. Reprod* 21: 1765-70
71. Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D *et al.* (2005) Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 72: 107-18
72. Hamamah S, Matha V, Berthenet C *et al.* (2006) Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reprod Biomed Online* 13: 807-14
73. Lucifero D, Mann ERW, Bartolomei MS *et al.* (2004) Gene specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13: 839-49
74. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T *et al.* (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22: 26-35

H. Joris

L'ICSI, d'hier à aujourd'hui

Rappel

Les premières grossesses après ICSI ont été publiées au début des années 1990. Les taux de réussite étaient considérablement plus élevés que les résultats obtenus avec les autres techniques de fécondation assistées utilisées cliniquement jusqu'alors. La technique s'est développée très rapidement dans le monde et de nombreuses études ont confirmé ses effets positifs sur le traitement de l'infertilité masculine. Le nombre d'indications pour lesquelles l'ICSI est utilisée de nos jours augmente et la technique est maintenant pratiquée dans plus de 50 % des cycles de FIV dans le monde.

Le travail effectué en amont pour le développement de l'ICSI, sa situation actuelle et ses possibles améliorations sont discutés.

Introduction

L'introduction de l'hyperstimulation ovarienne dans la fécondation *in vitro* (FIV) humaine a permis le recueil d'un plus grand nombre d'ovocytes pour le traitement de l'infertilité, y compris masculine. Cependant, pour que la FIV traditionnelle soit un succès, un certain nombre de spermatozoïdes fonctionnels sont nécessaires. Rapidement, il a été clair que les taux de succès de la FIV classique étaient largement dépendants de la qualité des spermatozoïdes (1). Pour un certain groupe de patients, la FIV résultait dans un échec de fécondation. Pour d'autres, cette technique n'était pas envisageable pour cause de spermatozoïdes mobiles insuffisants, morphologie anormale, présence d'anticorps anti-spermatozoïdes élevés ou combinaison d'un ou plusieurs de ces facteurs. Développer une méthode permettant le traitement de ces patients a été un challenge important dans les années 1980.

La recherche sur la micromanipulation dans le domaine de la reproduction durant les années 1960 et 1970 portait sur l'injection des spermatozoïdes dans le cytoplasme de l'ovocyte (ISCI). Cela permettait d'étudier les processus de fécondation précoce (2). Les scientifiques, étant concernés par les nombreuses barrières physiologiques si injection directe dans le cytoplasme, évitaient d'injecter directement dans l'ovocyte pendant le développement des procédures de fécondation assistée. Plusieurs techniques de fécondation assistée évitant l'injection directe dans le cytoplasme ont été développées dans différentes espèces (2). Les méthodes les plus connues sont : le *Zona Drilling* (ZD), la *Partial Zona Dissection* (PZD) et la *SUBZonal Insemination* (SUZI). Ces méthodes avaient pour but de permettre au spermatozoïde d'atteindre la membrane plasmique de l'ovocyte sans avoir à passer le cumulus, la corona radiata et la zone pellucide. Quelles que soient les techniques de fécondation assistée utilisées, l'élimination préalable du cumulus et des cellules de la corona est une manipulation supplémentaire nécessaire.

La pratique du ZD ou de la PZD nécessite un nombre relativement important de spermatozoïdes pour pratiquer une insémination après ouverture de la zone pellucide avec l'acide tyrode (ZD) ou après avoir créé une brèche mécanique (PZD). Les résultats cliniques après ZD étaient décevants. Les taux de dégénération, de fécondation et de développement des embryons n'étaient pas acceptables (3). Les résultats après PZD étaient meilleurs en comparaison de la méthode ZD. On a montré que la morphologie des spermatozoïdes affectait plus les taux de réussite que leur mobilité (4). Pour la technique SUZI, un petit nombre de spermatozoïdes était injecté dans l'espace entre la zone pellucide et l'ovocyte (5, 6). Comparé aux techniques ZD ou PZD, cette méthode nécessitait moins de spermatozoïdes. Différentes polémiques débattaient du nombre de spermatozoïdes mobiles à injecter sous la zone pellucide (7, 8).

De la SUZI à l'ICSI

Les résultats cliniques obtenus avec la PZD et la SUZI sont revus par Tarin (9). Les taux de fécondation obtenus étaient d'environ 20 %. C'était déjà un progrès puisque ces patients ne pouvaient auparavant pas être traités avec une FIV traditionnelle. Cependant, les taux de fécondation étaient largement plus bas que ceux obtenus en FIV traditionnelle avec échantillons d'éjaculat normaux. Cette fécondation insuffisante après la SUZI limitait le nombre d'embryons disponibles pour le transfert. Les taux de grossesse étaient également affectés. Au début des années 1990, le remplacement de trois embryons était une pratique habituelle. Après la SUZI, seulement 16,1 % des cas conduisaient à replacer trois embryons (14). Un embryon était disponible dans 60,1 % des transferts et deux dans 23,3 % des cas.

Un autre problème avec les techniques de PZD et de SUZI était le taux relativement élevé de polyspermie (9). La barrière naturelle contre la fécondation polyspermiq ue était outrepassée et la présence de plusieurs spermatozoïdes sous la zone pellucide augmentait le risque d'une fécondation polyspermiq ue.

À la fin des années 1980, un projet de recherche sur la fécondation assistée par SUZI sur ovocytes de souris a été initialisé à la « Vrije Universiteit Brussel ». Le but de cette étude était d'initier la réaction acrosomique dans le spermatozoïde ; d'injecter un seul spermatozoïde sous la zone pellucide et d'évaluer si une possible corrélation entre le taux de réaction acrosomique et la fécondation après SUZI pouvait être établie. Plus de 1 000 ovocytes de souris ont été utilisés pour cette étude. Une claire corrélation entre le taux de réaction acrosomique et la fécondation après injection d'un seul spermatozoïde sous la zone pellucide a été trouvée (10). Fort de ces constatations expérimentales, lorsque le programme clinique à visée humaine de la SUZI a débuté à Bruxelles, il était préalablement pratiqué l'initiation de la réaction acrosomique dans les spermatozoïdes humains.

Différentes procédures d'injection de spermatozoïdes sous la zone pellucide ont été pratiquées. La pénétration de la zone par une fine aiguille fait courir le risque d'endommager l'ovocyte. Pour le réduire, le sucrose était utilisé pour permettre une rétraction de l'ovocyte pendant la procédure (4). Les risques sont moindres quand le volume de l'ovocyte est réduit. D'autre équipes n'utilisaient pas le sucrose mais injectaient les spermatozoïdes d'une autre façon. La zone pellucide était percée à 1 heure ou à 5 heures afin d'éviter l'ovocyte et de minimiser les dégâts.

Un spermatozoïde, après qu'il a subi sa réaction acrosomique, peut s'attacher à la membrane ovo-

cytaire et initier le processus de la fécondation. Durant la SUZI, chez la souris, il a été tenté de mettre la membrane de l'ovocyte et du spermatozoïde en contact pendant la procédure d'injection. La technique était de créer une invagination dans l'ovocyte avec la pipette d'injection après avoir passé la zone pellucide à 3 heures et de placer la tête du spermatozoïde contre la membrane ovocytaire. C'était possible en perçant la zone pellucide avec une aiguille d'injection à 3 heures (10). Cette méthode était très prometteuse chez la souris où les dommages de membrane d'ovocytes étaient extrêmement rares. Cependant, pendant les expériences de SUZI chez la souris, la conséquence de la rupture de la membrane ovocytaire était une lyse immédiate.

Quand le programme clinique de SUZI a débuté, la réaction acrosomique des spermatozoïdes était induite par électroporation ou par incubation dans du liquide folliculaire. Le choix de traitement utilisé était dépendant de la survie des spermatozoïdes après 24 heures d'incubation et du résultat de l'évaluation préliminaire du taux de réaction acrosomique.

Entre deux et cinq spermatozoïdes mobiles étaient injectés sous la zone pellucide de chaque ovocyte en métaphase II (7, 11). La même technique d'injection que pour les souris était utilisée. Pour optimiser les procédures, certains changements furent introduits : le PVP a remplacé la méthylcellulose comme substance visqueuse afin de réduire la mobilité des spermatozoïdes utilisés pour l'injection sous-zonale (12). La forme différente de la tête du spermatozoïde humain pouvait permettre l'utilisation d'une plus petite pipette d'injection.

L'utilisation de la même technique d'injection pour l'humain a rapidement induit des ruptures de membranes d'ovocytes. Contrairement à la souris, la dégénération immédiate de l'ovocyte ne se présentait pas chez l'ovocyte humain. Des dégénération s étaient habituellement observées le matin suivant lors de la vérification de la fécondation (7). Il est arrivé que des spermatozoïdes aient été injectés accidentellement dans le cytoplasme dans des cas avec une rupture de la membrane ovocytaire au moment de l'injection. Ces ovocytes injectés étaient aussi mis en culture et évalués. Des fécondations normales et des développements d'embryons ont été observés pour ces ovocytes injectés par cette technique appelée dès lors *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI). Ces observations confirmaient certaines autres décrites auparavant (12).

Les grossesses obtenues après remplacement des embryons après ICSI ont été publiées en 1992 (13). Les succès initiaux ont encouragés l'utilisation de l'ICSI. Petit à petit, l'ICSI a remplacé la SUZI. Les résultats des 750 premiers cycles de fécondation

assistée consécutive ont été publiés. Un premier rapport sur 300 cycles (11) a été suivi par un deuxième sur 300 cycles (14) et un troisième sur 150 cycles (15). Un bref résumé de ces résultats est présenté en tableau I. Les résultats montrent clairement l'amélioration des taux de fécondation et la baisse des taux de dégénération durant cette période. Puisque les taux de fécondation après ICSI étaient supérieurs à ceux observés après SUZI, la SUZI fut complètement et définitivement remplacé par l'ICSI après comparaison de la fécondation entre SUZI et ICSI sur ovocytes de la même cohorte (15).

Comparé à un taux de fécondation d'environ 20 % après SUZI ou PZD, le taux de fécondation (2 PN) obtenu après ICSI au départ était d'environ 35 % (16). C'était déjà un grand progrès.

Pour la SUZI, les spermatozoïdes mobiles étaient injectés sous la zone pellucide. Les tentatives d'ICSI où un spermatozoïde mobile était injecté involontairement résultaient fréquemment en dégénération d'ovocytes. De ce fait, la sélection de spermatozoïdes immobiles pour l'ICSI semblait une conséquence logique. Pourtant, l'ICSI avec spermatozoïdes immobiles résultait en une baisse de fécondation et augmentait le nombre d'ovocytes à 1 PN (16). Quelques changements de procédures d'injection permirent de réelles améliorations. L'immobilisation des spermatozoïdes mobiles et l'aspiration afin d'empêcher la rupture de membrane augmentait le taux de fécondation après ICSI de 30 à 60 %. À la même période, le taux d'ovocytes à 1 PN chutait à moins de 5 % et le taux d'ovocytes dégénérés de 20 à 10 %. Il semblerait que la réduction de concentration en hyaluronidase utilisée pour la décoronisation ait joué aussi un rôle.

Quand la SUZI a été remplacée par l'ICSI, toutes les procédures de traitement de sperme étaient encore en place. L'initiation de la réaction acroso-

mique incluait un traitement avec un milieu avec une concentration augmentée de calcium. À ce moment, l'hypothèse était que cette concentration contribuait au succès de l'ICSI (17). Une fois que les taux de fécondation furent stables, différents aspects des traitements du sperme furent évalués. Les résultats prouvèrent que ni l'initiation de la réaction acrosomique, ni le prétraitement dans un milieu de concentration augmentée de calcium n'étaient nécessaires (18).

Des démonstrations des procédures en directe à l'hôpital universitaire de la VUB furent présentées à des centaines de participants au cours de différents workshops afin de diffuser la nouvelle technique. Depuis 1994, il a été publié de nombreuses études effectuées par différentes équipes dans le monde entier. Depuis ce temps, l'ICSI a permis le traitement de milliers de couples qui ne pouvaient être pris en charge jusqu'alors.

L'ICSI aujourd'hui

La FIV classique a aussi été tentée en utilisant du sperme épидидymaire. Les taux de fécondation étaient très limités. Rapidement, après que la procédure ICSI a été établie, plusieurs cliniques ont tenté d'utiliser des spermatozoïdes des testicules et de l'épididyme en combinaison de l'ICSI.

De nouveau, de bons taux de fécondation, un bon développement embryonnaire et de bons taux de grossesses ont été obtenus. Au fil des ans, une multitude d'études a démontré l'efficacité de l'utilisation de spermatozoïdes prélevés chirurgicalement. Les succès de ces techniques encouragèrent certaines personnes à avancer d'une étape et à tenter l'ICSI avec des cellules précurseur. Les premiers rapports de grossesses obtenus après injection de

Tableau I – Évolution de SUZI et ICSI dans 750 traitements consécutifs.

	Période	Cycles	SUZI			ICSI		
			Ovocytes injectés	Ovocytes dégénératifs (%)*	Ovocytes fécondés (%)*	Ovocytes injectés	Ovocytes dégénératifs (%)*	Ovocytes fécondés (%)*
Palermo et al. 1993 (11)	10/1990-1/1992	300	2 214	203 (9,2)	357 (16,1)	716	168 (23,5)	240 (33,5)
Van Steirteghem et al. 1993 (14)	1/1992-10/1992	300	1 073	(7,1)	143 (13,3)	1 821	246 (13,5)	803 (44,1)
Van Steirteghem et al. 1993 (15)	10/1992-1/1993	150	-	-	-	1 407	127 (9,0)	830 (59,0)

*: Pourcentage d'ovocytes injectés.

spermatozoïdes ronds (21) ou allongés (22) n'ont pas été confirmés suite au traitement d'un grand nombre de patients (23). L'utilisation de ce type de cellules pour l'ICSI chez les humains a été débattue et ne semble plus être utilisée de nos jours. De plus, contrairement à l'ICSI avec éjaculat, spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaire, des effets possibles sur la santé des enfants nés après utilisation de cellules précurseur ont été rapportés (24).

Initialement, comme pour toutes techniques de fécondation assistée, l'ICSI a été développée pour le traitement de l'infertilité mâle sévère. Progressivement, l'ICSI est devenue la technique choisie pour plusieurs autres indications. Une liste a été présentée dans une revue publiée à l'occasion du 10^e anniversaire de la procédure d'ICSI (25) et elle continue probablement de s'allonger.

De nos jours, l'utilisation de l'ICSI comme procédure de fécondation est en constante augmentation. L'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) rapporte chaque année des résultats publiés par des cliniques européennes. Ils sont disponibles depuis 1997. L'utilisation de l'ICSI est en croissance constante. En 1997, l'ICSI était pratiquée dans environ 40 % des cycles FIV. Cela a été le cas dans 59 % des tentatives en 2004. Récemment, cette constante augmentation a été discutée (26). En Europe comme aux États-Unis, une augmentation identique peut être observée dans les rapports annuels de FIV disponible sur internet (<http://www.cdc.gov/ART>). Dans certains pays, l'ICSI a pratiquement remplacé la FIV (26). Les explications fréquemment données pour l'utilisation de l'ICSI sont essentiellement la crainte d'échec de fécondation avec la FIV traditionnelle et l'augmentation de la fréquence de l'infertilité masculine.

Malgré tout, les échecs de fécondation après ICSI ne peuvent pas être exclus (27). En cas de doute, la division d'ovocytes entre FIV et ICSI peut donner une information valable sur le potentiel fécondant des spermatozoïdes (28). De plus, il a été démontré que la fécondation après ICSI n'est pas meilleure qu'après une FIV traditionnelle chez les patients sans facteur d'infertilité masculine. (29)

Habituellement, le taux normal de fécondation après ICSI avec éjaculat ne devrait pas être inférieur à 65 % et le taux de dommage des ovocytes injectés inférieur à 10 %. Si ces résultats ne sont pas obtenus, cela peut être directement lié à des conditions sous-optimales pendant les procédures de laboratoire, à une technique d'injection mal maîtrisée ou à la combinaison des deux. Il a été suggéré que l'utilisation d'une platine chauffante n'est pas indispensable pour l'ICSI (30). Il faut avoir conscience que la manipulation de l'ovocyte est l'étape la plus sensible dans les procédures de laboratoire (31). Les effets de la température sur

les ovocytes humains ont été clairement démontrés (32), malgré l'énorme capacité de récupération du système humain après exposition à des conditions sous-optimales. D'expérience de l'auteur, optimiser les conditions de laboratoire durant cette phase de traitement permet d'améliorer grandement les résultats.

En plus de la température, le contrôle des conditions physico-chimiques et techniques pendant toutes les étapes de la procédure est crucial et ses effets sur les résultats souvent sous estimés.

Que la procédure d'ICSI en elle-même puisse affecter le développement potentiel de l'ovocyte reste un sujet de débat. Plusieurs études ont essayé de démontrer les effets de la technique d'ICSI (28). Cependant, les conclusions questionnent pour différentes raisons. Certaines études comparent des populations différentes de patients (33) ou incluent de petits nombres de patients (34). Les techniciens peuvent également faire la différence (35). Pour comparer les résultats des techniques de fécondation, une comparaison entre ovocytes d'une même cohorte semble plus appropriée. Van Landuyt *et al.* (36) ont comparé des FIV et ICSI sur ovocytes d'une même cohorte pour des patients avec des paramètres de sperme normaux. Ils n'ont pas trouvé d'effets notables sur la fécondation et le développement des blastocystes. Une autre étude comparant patiente par patient avec des paramètres normaux de sperme n'a pas noté de différence dans les taux de grossesse (37).

L'ICSI a été développée initialement avec un grossissement de $\times 400$. Depuis peu, l'ICSI est aussi pratiquée en $\times 200$. La sélection des spermatozoïdes à $\times 400$ à des limites. Seulement les grosses anomalies peuvent être observées. L'analyse de la morphologie des spermatozoïdes avec une sélection à $\times 400$ montre seulement les effets négatifs d'une grande anomalie (38). Il a été récemment démontré que la sélection avec un fort grossissement permet une meilleure sélection des spermatozoïdes normaux et peut améliorer les résultats. Cette technique est appelée *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection* (IMSI) et est développée en détail dans un autre chapitre de ce livre.

Grâce à l'introduction de l'ICSI, le nombre de patients ne pouvant être traités par FIV a énormément baissé. Cependant, dans certains cas, l'ICSI a ses limites (27). Si une deuxième tentative échoue à féconder les ovocytes (39), d'autres options de traitement doivent être envisagées. Les échecs de fécondation peuvent avoir des causes différentes. L'immobilisation du spermatozoïde avant ICSI endommage la membrane. Cet endommagement permet de libérer un facteur activateur de l'ovocyte (40). L'absence de ce facteur résulte en un échec de fécondation. Par l'injection de spermatozoïdes humains dans des ovocytes de souris, il est pos-

sible d'attribuer l'échec de fécondation soit à l'ovocyte, soit au spermatozoïde (41).

L'activation artificielle des ovocytes peut surmonter les problèmes liés à un défaut de fécondation préalable en ICSI, qu'il soit d'origine ovocytaire ou spermatique (42). Jusqu'à maintenant, l'ionophore de calcium est communément utilisé pour l'activation d'ovocyte assistée. Il a été démontré que les ovocytes activés par courant électrique après ICSI (43) ou après une incubation pendant la nuit (44) peuvent féconder et se développer normalement. Des grossesses après activation électrique d'ovocytes ont été publiées récemment (45).

Dans cette étude, cette technique est comparée à des ICSI normales sur des cohortes d'ovocytes de 241 patients avec faible fécondation ou échec pressentis. Le taux de fécondation après activation électrique a été de 68 % mais a atteint également 60 % dans le groupe contrôle, sans traitement supplémentaire. Des naissances d'enfants en bonne santé ont été reportées. L'activation d'ovocytes assistée peut être une méthode pour baisser au minimum les échecs de fécondation non dus à des problèmes de technique.

Le suivi des enfants nés après ICSI a beaucoup été publié. Les résultats des grossesses, diagnostics prénataux, taux de malformation, et autres aspects du développement des embryons frais ou congelés sont disponibles. Cet aspect de l'ICSI est le sujet d'un autre chapitre.

Depuis son introduction en 1992, la technique ICSI n'a pas radicalement changé. La FIV est une technique complexe. L'ICSI en elle-même implique de nombreux détails qui peuvent avoir des effets sur les résultats. Les systèmes de micromanipulation utilisés sont mécaniques, hydrauliques ou électroniques et les injecteurs qui transfèrent le mouvement à la pipette dans la boîte sont remplis d'huile ou d'air. Les micromanipulateurs sont utilisés utilisant un grossissement de $\times 200$ à $\times 400$ par les techniciens assis au microscope. Les pipettes d'injection diffèrent peu, sauf l'utilisation ou non de spike. Les pipettes de contention diffèrent par leur diamètre et leur ouverture mais n'ont pas une importance capitale pour la réussite.

Malgré un taux de succès élevé en général, les différences entre cliniques et techniciens existent.

Sans parler des conditions de laboratoire qui peuvent être sous-optimales, l'aspect technique peut affecter les taux de succès. Des contrôles qualité internes peuvent minimiser les différences entre techniciens. L'évaluation régulière des taux de fécondation et de dégénération de chaque opérateur dans une clinique peut aider à réduire les variations de résultats. Minimiser les différences entre cliniques serait difficile, mais pourrait être valable. La technologie est de plus en plus importante, même dans le domaine de la FIV. Jusqu'ici, il n'y a

pas eu de changement introduit dans la technique ICSI actuelle. Cependant, la robotisation pourrait standardiser la technique dans le futur. De même que pour la chirurgie, télécommande visuelle ou éventuellement ICSI pratiquée à distance sera possible. En plus de la robotique, une technique d'injection moins invasive contribuerait à augmenter les taux de réussite.

Les ovocytes pour l'ICSI sont manipulés durant la décoronisation et l'étape d'injection. L'évidence du stress mécanique sur les ovocytes pendant la dénudation est prouvée dans des études par la relocalisation du globule polaire (46). La conséquence de la décoronisation mécanique pourrait être l'endommagement des structures internes. Au passage de la zone pellucide avec la pipette d'injection, l'ovocyte est déformé. Le taux de déformation dépend de la force nécessaire au passage. Certains ovocytes semblent être très sensibles à ce stress mécanique (47). Des méthodes pour minimiser ce phénomène ont été tentées (47, 48), mais non utilisées à une grande échelle. Faire de la technique ICSI une méthode moins invasive pourra certainement contribuer à améliorer les résultats.

Remerciements

Je suis très reconnaissant au Pr. A Van Steirteghem et Pr. P Devroey. Ils étaient les responsables du centre pendant la période où l'ICSI s'est développée et ils m'ont offert l'opportunité de travailler dans leur équipe. Sans leurs efforts et leur soutien, il ne m'aurait pas été possible de participer à ce travail. Je voudrais aussi remercier tous mes anciens collègues de l'UZBrussel et particulièrement l'équipe avec laquelle j'ai passé de nombreuses heures dans le laboratoire pour effectuer ce travail passionnant.

Références

1. Tournaye H, Camus M, Khan I *et al.* (1992) Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 years survey. *Hum Reprod* 7: 218-22
2. Iritani A (1991) Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Mol Reprod Dev* 28: 199-207
3. Garrisi GJ, Talansky BE, Grunfeld L *et al.* (1990) Clinical evaluation of three approaches to micromanipulation-assisted fertilization. *Fertil Steril* 54: 671-7
4. Cohen J, Talansky BE, Malter H *et al.* (1991) Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Hum Reprod* 6: 118-23
5. Metka M, Haromy T, Huber J (1985) Micromanipulatory sperm injection – a new method in the treatment of infertile males. *Wien Med Wochenschr* 15: 55-9
6. Ng SC, Bongso TA, Ratna SS *et al.* (1988) Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 8614: 790

7. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van steirteghem AC (1992) Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Hum Reprod* 7: 248-54
8. Fishel S, Timson S, Lisi F, Rinaldi F (1992) Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization in vitro. *Fertil Steril* 57: 840-9
9. Tarin JJ (1995) Subzonal insemination, partial zona dissection or intracytoplasmic sperm injection? An easy decision? *Hum Reprod* 10: 165-70
10. Palermo G, Van Steirteghem A (1991) Enhancement of acrosome reaction and subzonal insemination of a single spermatozoon in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 30: 339-45
11. Palermo G, Joris H, Derde MP *et al.* (1993) Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 59: 826-35
12. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veckl LL *et al.* (1988) A pre-clinical evaluation of pronucleus formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 49: 835-42
13. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van steirteghem AC (1992) Pregnancies after injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 8810: 17-8
14. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H *et al.* (1993) High success rates by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report on a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8: 1055-60
15. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H *et al.* (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8: 1061-6
16. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H *et al.* (1998) Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod* 13 Suppl 1: 76-86
17. Edwards RG, Van Steirteghem AC (1993) Intracytoplasmic sperm injections (ICSI) and human fertilization: does Calcium hold the key to success? *Hum Reprod* 8: 988-9
18. Liu J, Nagy Z, Joris H *et al.* (1994) Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa. *Hum Reprod* 9: 1127-30
19. Silber SJ, Ord T, Balmaceda J *et al.* (1990) Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Engl J Med* 323: 1788-92
20. Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA *et al.* (2004) Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 82: 691-701
21. Tesarik J, Mendoza C, Testart J (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 333: 525
22. Vanderzwalmen P, Lejeune B, Nijs M *et al.* (1995) Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 10: 502-03
23. Ghazzawi IM, Alhasani S, Taher M, Sousa S (1999) Reproductive capacity of round spermatids compared with mature spermatozoa in a population of azoospermic men. *Hum Reprod* 14: 736-40
24. Zech H, Vanderzwalmen P, Prapas Y *et al.* (2000) Congenital malformations after intracytoplasmic injection of spermatids. *Hum Reprod* 15: 699-71
25. Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of 10 years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10: 19-28
26. Nyboe Andersen A, Carlsen E, Loft A (2008) Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries. *Hum Reprod Update* 14: 593-604
27. Esfandiari N, Javed MH, Gotlieb L *et al.* (2005) Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection – analysis of 10 years' data. *Int J Fertil Womens Med* 50: 187-92
28. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C *et al.* (1999) Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 14: 2313-9
29. Van Rumste MM, Evers JL, Farhugur CM (2004) ICSI versus conventional techniques for oocyte insemination during IVF in patients with non-male factor subfertility: a Cochrane review. *Hum Reprod* 19: 223-7
30. Atiye SH, Pool T, Martin J (1995) A simple approach to intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 63: 652-5
31. Lane M, Gardner DK (2007) Embryo Culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21: 83-100
32. Wang WH, Meng L, Hackett RJ *et al.* (2002) Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 77: 1274-7
33. Jones GM, Trounson A, Lolatgis N *et al.* (1998) Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 70: 1022-9
34. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M (2000) Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod* 15: 1592-6
35. Dumoulin JM, Coonen E, Bras M *et al.* (2001) Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI : effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 16: 306-12
36. Van Landuyt L, De Vos A, Joris H *et al.* (2005) Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertil Steril* 83: 1397-403
37. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI *et al.* (1996) Prospective controlled randomized study of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal semen parameters. *Fertil Steril* 66: 753-6
38. De Vos A, Van de Velde H, Joris H *et al.* (2003) Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79: 42-8
39. Vandervorst M, Tournaye H, Camus M *et al.* (1997) Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2429-33
40. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A *et al.* (1997) Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 12: 2792-6
41. Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhondt M (2005) Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 20: 2237-41
42. Heindryckx B, De Gheselle S, Gerris J *et al.* (2008) Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* 17: 662-8
43. Zhang J, Wang CW, Blaszyk A *et al.* (1999) Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72: 509-12
44. Manipalviratn S, Ahnonkitpanit V, Numchaisrika P *et al.* (2006) Results of direct current electrical activation of failed-to-fertilize oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med* 51: 493-9
45. Mansour R, Fahmy I, Taweb NA *et al.* (2009) Electrical activation of oocytes after intracytoplasmic sperm injection : a controlled randomized study. *Fertil Steril* 91: 133-9

-
46. Taylor TH, Chang CC, Elliott T *et al.* (2008) Effect of denuding on polar body position in in-vitro matured oocytes. *Reprod Biomed Online* 17: 515-9
47. Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V *et al.* (2002) Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 17: 2694-9
48. Fishel S, Dowell K, Lisi F, Rinaldi L (1994) Subzonal insemination and zona breaching techniques for assisting conception in vitro. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 8: 65-84

A. Hazout, S. Belloc,
A.M. Junca, M. Dumont,
M. Benkhalifa, Y. Ménéz
et P. Cohen-Bacrie

Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)

Introduction

Depuis quelques années, plusieurs publications ont mis en exergue l'avantage de l'examen du sperme au fort grossissement ($\times 6\,600$), permettant l'évaluation de la morphologie du noyau spermatique et la densité de sa chromatine en temps réel avant micro-injection ovocytaire. Ce procédé est communément appelé *motile sperm organelle morphology examination* (MSOME). La technique d'ICSI est appelée *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection* (IMSI). En reproduction, nous déplorons hélas plus d'échecs que de succès. Les causes des échecs sont multiples, d'origine maternelle mais aussi paternelle. En effet, un sperme inadéquat peut conduire au pire à un défaut de fécondation ou de développement embryonnaire précoce et au mieux à une implantation embryonnaire suivie d'une fausse couche.

En fécondation *in vitro* standard (FIV) ou en ICSI, le biologiste tente de sélectionner le meilleur spermatozoïde possible par des préparations de type « Swim-up » ou gradient de densité après centrifugation. Son observation se fait au microscope traditionnel ($\times 400$) et, parmi les nombreux spermatozoïdes, il est amené à choisir le meilleur avant ICSI sur l'analyse de la tête, du cou et du flagelle. Habituellement, l'évaluation se fait sur la base des critères de la World Health Organization (WHO), (1) ou selon la classification de Kruger (2). Seuls Nagy, en 1995 (3), et Svalander, en 1996 (4), ont rapporté l'absence de corrélation entre la morphologie du sperme et les résultats d'ICSI. Les relativement forts taux de fécondation après ICSI n'avaient pas permis une réelle réflexion sur l'influence de la qualité du spermatozoïde micro-injecté. Tesarik, en 2002 (5), en particulier sur un programme de don d'ovocytes, avait mis l'accent sur les altérations chromosomiques du sperme eu égard aux résultats d'ICSI. Le problème de l'examen minutieux du noyau spermatique a été résolu par Bartoov en 2002 (6), grâce

à l'utilisation d'un microscope à lumière inversée équipé d'un différentiel de contraste optique de haute résolution, dit de Nomarski, permettant un grossissement de $\times 6\,600$. Il a réalisé les premières IMSI avec des résultats spectaculaires. Depuis, cette technique s'est généralisée dans tous les centres de FIV.

Matériel et méthodes

Préparation du sperme pour le MSOME

Le sperme éjaculé après liquéfaction est classiquement préparé par centrifugation sur gradient de densité puis lavage. Un volume variable selon la densité en spermatozoïdes est inséminé dans une goutte de 4 μL de préparation d'acide hyaluronique (SpermSlow®, Medicult®, Jyllinge, Danemark). L'examen a lieu sous huile minérale (Cryobiosystem® IMV, L'Aigle, France) à 37 °C pour les spermes pauvres avec l'adjonction de 6 % d'albumine et à 20 °C pour les spermes plus riches. Bartoov recommandait en 2002 de créer des petits tunnels au bord de la goutte pour mieux repérer les têtes des spermatozoïdes mobiles (6).

Description du microscope

Le matériel utilisé dans notre équipe est un microscope inversé Olympus (I $\times 70$) équipé d'un différentiel de contraste optique de haute résolution type Nomarski. On utilise un objectif 100 à immersion, lequel, avec le sélecteur de grossissement ($\times 1,5$) nous donne un grossissement de $\times 150$ sur le microscope. L'image obtenue au microscope est récupérée par une caméra Sony vidéo couleur de telle sorte que le grossissement final sur la vidéo soit de $\times 6\,600$.

Tableau I – Anomalies morphologiques spécifiques, d’après Bartoov *et al.* (6).

Anomalies	Noyau	Acrosome	Cape	Mitochondrie	Cou	Flagelle
	forme chromatine					
- petite, ovale - grande ovale - étroite (< 2,9 µm) - large (> 3,7 µm) - courte (< 4,2 µm) - désorganisée	- surface vacuolaire > 4 % de la surface du noyau	- absent - partiel - vésiculé	- absente - vésiculée	- absente - partielle - désorganisée	- désaxé - désorganisé - reste cytoplasmique	- absent - enroulé - cassé - multiple - court

MSOME et sélection du sperme avant IMSI

Le principe énoncé par Bartoov consiste à soumettre au MSOME un échantillon de 100 spermatozoïdes mobiles. Six critères sont pris en compte : acrosome, cape post-acrosomique, cou, mitochondrie, flagelle et noyau, décrits de façon arbitraire en fonction des données déjà acquises (7) (tableau I). Le MSOME s’applique sélectivement et seulement aux spermatozoïdes mobiles, qui représentent les meilleurs candidats à l’ICSI : les anomalies sévères sont en fait d’emblée identifiées au microscope standard et écartées.

Un noyau normal est reconnu à sa forme ovale et à son homogénéité, sans extrusion ni invagination et sa chromatine est dense, homogène et ne présente pas de vacuole supérieure à 4 % de sa surface totale. Dans cette configuration, les longueurs et largeurs moyennes sont, selon Bartoov, estimées à $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ et $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$, respectivement. L’acrosome et la cape post-acrosomique sont considérées comme anormaux s’ils sont absents, totalement ou partiellement, ou vésiculés. La mitochondrie peut être totalement ou partiellement absente ou désorganisée. Finalement, un cou désaxé avec des restes cytoplasmiques ainsi qu’un flagelle enroulé, brisé, court ou double sont considérés comme anormaux.

IMSI et assistance médicale à la procréation

Compte tenu des travaux de Bartoov en 2002 (6), de nombreux centres ont convenu de l’utilité d’une observation plus précise, en particulier du noyau spermatique avant ICSI. La première étude prospective randomisée concernait 100 couples candidats à l’ICSI. Le taux de fécondation moyen dans cette étude était de 64,2 %, associé à un taux moyen de spermatozoïdes normaux après MSOME de $3,3 \pm 0,5 \%$ [0-38 %]. Le taux de fécondation après ICSI, au seuil de 60 %, était statistiquement et positivement corrélé ($r = 0,52, p \leq 0,01$) à l’incidence de spermatozoïdes normaux (< 60 %, $n = 53 ; 1,3 \pm 0,3 \%$ vs > 60 %, $n = 47 ; 5,8 \pm 0,6 \%$). Une analyse statistique poussée mesurant l’aire

sous courbe ROC permettait à l’équipe de Bartoov d’établir un seuil discriminant de 2,5 % de spermatozoïdes normaux pour prédire un taux de fécondation inférieur ou supérieur à 60 % après ICSI avec une sensibilité de 81 % et une spécificité de 78 %. Dans cette étude, Bartoov démontrait en outre que seules les anomalies du noyau spermatique après MSOME (forme et structure de la chromatine) influaient sur les taux de fécondation et de grossesses de façon significative. Notion intéressante, aucune grossesse n’a été obtenue pour un sperme présentant moins de 20 % de noyaux spermatiques normaux.

Quand aucun spermatozoïde à noyau normal n’a pu être recueilli, Berkovitz en 2005 (8) a montré qu’en utilisant un deuxième choix des spermatozoïdes les moins altérés, les taux de fécondation et d’embryons de top qualité étaient significativement plus bas. Dans un travail plus récent, le même auteur a démontré que, même avec une forme normale, une large vacuole dans le noyau influençait négativement les taux de fécondation et grossesse (9). De plus, il existait une corrélation directe et significative entre anomalies du noyau et taux de fausses couches spontanées précoces (FCS).

Wittermer, en 2006, (10) a confirmé ces résultats en précisant que le MSOME était un excellent argument de sélection quant au choix de la technique d’assistance médicale à la procréation (AMP). En effet, étudiant 55 couples après échecs d’inséminations passant en FIV-ICSI mixte, elle a montré en fonction des taux de fécondations comparés dans les deux techniques que moins de 8 % de noyaux spermatiques strictement normaux devaient inciter à l’ICSI alors qu’à plus de 8 % une FIV pouvait être proposée.

IMSI et résultats disponibles

Les différentes études, publiées et résumées dans le tableau II, font état d’une nette supériorité de l’IMSI sur l’ICSI conventionnelle.

Bartoov, en 2003 (11), dans une étude comparative entre 50 couples en ICSI conventionnelle et 50 couples en IMSI avec une observation rigoureuse du noyau des spermatozoïdes, a démontré un taux d’implantation et de grossesses significativement

Tableau II – Caractéristiques et résultats en IMSI des principales études publiées.

		Nbre de cycles	Âge femme (ans)	Nbre d'ovocytes injectés	Nbre d'embryons transférés	(%) de fécondation	Top emb. (%)	Implantation (%)	Gross. clin (%)	FCS (%)
Bartoov et al., 2003 (11)	ICSI groupe contrôle	50	30,3 ± 3,4	10,2 ± 5,5	3,5 ± 1,2	65,5 ± 21,5	31,0 ± 19,5	9,5 ± 15,3	30,0	33,0
	IMSI groupe expérimental	50	29,6 ± 3,5	10,6 ± 4,4	3,8 ± 1,1	64,5 ± 17,5	45,2 ± 28,2	27,9 ± 26,4	66,0	9,0
	p-value		NS	NS	NS	NS	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01
Berkovitz et al., 2005 (8)	IMSI groupe péjoratif	38	33,3 ± 4,5	9,2 ± 4,0	3,5 ± 1,4	50,3 ± 24,1	19,4 ± 27,1	5,9 ± 12,9	18,4	57,1
	IMSI groupe favorable	38	32,3 ± 3,3	10,1 ± 4,5	3,3 ± 1,2	71,3 ± 20,8	34,9 ± 31,3	25,0 ± 25,9	52,6	10,0
	p-value		NS	NS	NS	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
Hazout et al., 2006 (12)	ICSI conventionnelle	125	-	9,5 ± 2,7	-	65,2	32,6	0,8	2,4	100,0
	IMSI	125	-	9,4 ± 2,5	-	68,1	42,6	20,3	37,6	15,0
	p-value		-	NS	-	NS	NS	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Berkovitz et al., 2006 (9)	IMSI Groupe contrôle	28	33,5 ± 3,9	8,4 ± 3,2	3,2 ± 0,7	72,8 ± 18,5	27,1 ± 29,4	-	50,0	7,0
	IMSI / groupe expérimental	28	33,4 ± 3,6	8,1 ± 3,6	3,0 ± 1,3	68,7 ± 20,3	23,0 ± 31,1	-	18,0	80,0
	p-value		NS	NS	NS	NS	NS	-	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01
Berkovitz et al., 2006 (13)	ICSI Groupe contrôle	80	33,4 ± 5,6	9,3 ± 5,0	3,1 ± 1,1	69,1 ± 22,6	25,7 ± 28,3	9,4 ± 17,4	25,0	40,0
	IMSI / groupe expérimental	80	32,3 ± 4,8	9,2 ± 5,0	3,1 ± 1,3	67,4 ± 20,8	38,7 ± 31,6	31,3 ± 36,3	60,0	14,0
	p-value		NS	NS	NS	NS	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	IMSI premier choix	70	32,3 ± 4,8	9,5 ± 4,1	3,3 ± 1,3	74,1 ± 20,5	26,7 ± 20,5	26,1 ± 26,8	58,6	9,8
	IMSI second choix	70	32,8 ± 4,7	8,9 ± 3,9	3,2 ± 1,4	62,3 ± 24,3	16,2 ± 26,0	8,3 ± 15,1	25,7	33,3
Antinori et al., 2008 (14)	p-value		NS	NS	NS	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	ICSI groupe	219	31,9 ± 3,3	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,7	94,5	-	11,3	26,5	24,1
	IMSI groupe	227	31,7 ± 3,2	2,9 ± 0,3	2,5 ± 0,7	94,8	-	17,3	39,2	16,9
	p-value		NS	NS	NS	NS	-	p = 0,007	p = 0,004	NS

supérieur en IMSI ($27,9 \pm 26,4\%$ vs $9,5 \pm 15,3\%$, $p \leq 0,01$ et 66% vs 30% , $p \leq 0,01$).

Les critères d'inclusion de cette étude comprenaient :

- au moins deux échecs d'ICSI ;
- un âge de la conjointe < 37 ans ;
- plus de 3 ovocytes en métaphase II recueillis à la ponction.

Le taux de fausses couches a été significativement inférieur en IMSI ($9,0\%$ vs $33,0\%$, $p \leq 0,01$). Le taux d'embryons de top qualité a été supérieur en IMSI, comparé au groupe contrôle ICSI standard ($45,2 \pm 28,2\%$ vs $31,0 \pm 19,5\%$, $p \leq 0,01$) ou aux précédentes ICSI du groupe IMSI ($45,2 \pm 28,2\%$ vs $31,7 \pm 21,6\%$, $p \leq 0,01$). Dans cette étude, il est intéressant de noter l'absence de différence en termes de taux de fécondation.

Hazout *et al.* en 2006 (12), dans une approche similaire, avec les mêmes indications et en ne remplaçant qu'un maximum de deux embryons, ont obtenu un meilleur taux d'implantation et de grossesses ($0,8\%$ vs $20,3\%$, $p < 0,001$ et $2,4\%$ vs $37,6\%$, $p < 0,001$) et de naissances (0% vs $17,6\%$, $p < 0,001$ et 0% vs $33,6\%$, $p < 0,001$) sans augmentation du taux de fécondation et de clivage et sans apparente amélioration significative de la morphologie des embryons.

Forts de leur expérience, Berkovitz *et al.* (13) ont entamé une étude prospective comparative de deux groupes d'IMSI, l'un avec des spermatozoïdes de premier choix dont les noyaux sont strictement normaux ($n = 70$) et l'autre avec des spermatozoïdes de second choix sans aucun noyau strictement normal ($n = 70$). Les taux de fécondation, de top embryons et d'implantation se sont révélés significativement plus élevés dans le premier groupe ($71,3 \pm 20,8\%$ vs $50,3 \pm 24,1\%$, $p \leq 0,01$; $34,9 \pm 31,3\%$ vs $19,4 \pm 27,1\%$, $p \leq 0,03$; $25,0 \pm 25,9\%$ vs $5,9 \pm 12,9\%$, $p \leq 0,01$, respectivement). En outre, le taux de FCS précoces a été significativement plus bas et les taux de grossesses évolutives plus élevés dans le groupe avec les noyaux spermatiques strictement normaux comparativement au groupe de spermatozoïdes de deuxième choix » ($10,0\%$ vs $57,1\%$, $\chi^2 = 9,7$, $p \leq 0,01$; $52,6\%$ vs $18,4\%$, $\chi^2 = 7,1$, $p \leq 0,02$, respectivement).

Les taux de naissances étant diminués dans le second groupe avec des noyaux vacuolés et le taux de fausses couches étant plus important dans ce même groupe, les auteurs en déduisent que la simple anomalie morphologique nucléaire, type large vacuole, témoigne probablement d'une altération sévère de l'ADN spermatique alors que les anomalies de forme ne sont pas incompatibles avec des grossesses normales.

IMSI et infertilité masculine sévère

Si tous les auteurs sont d'accord pour confirmer le bien fondé de l'IMSI dans les cas d'échecs d'ICSI

conventionnelle, qu'en est-il des oligoasthénospermies sévères indépendamment des échecs d'ICSI standard ?

Dans un travail récent de l'équipe d'Antinori (14), 446 couples répondant aux critères suivants : a) oligoasthénotératozoospermie (OAT) sévère confirmée au moins deux fois ; b) 3 ans d'infertilité primaire ; c) femmes âgées de moins de 35 ans ; d) bilan féminin normal, ont été randomisés en deux groupes : ICSI ($n = 219$; groupe 1) et IMSI ($n = 227$; groupe 2).

Les taux d'implantation et de grossesse étaient significativement plus élevés dans le groupe IMSI que dans le groupe ICSI ($17,3\%$ vs $11,3\%$, $p = 0,007$, et $39,2\%$ vs $26,5\%$, $p = 0,004$, respectivement) (tableau II) mais sans différence significative en termes de FCS. En outre, prenant en compte un sous-groupe avec un antécédent de plus de deux échecs d'ICSI, cette équipe constate une réduction de moitié des taux de FCS précoces ($17,4\%$ vs $37,5\%$) dans le groupe IMSI, cependant non significative. Des résultats similaires ont été rapportés par Boldi Cotti *et al.* en 2008 (15).

IMSI et altérations de l'ADN spermatique

Le problème posé par les altérations de l'ADN du sperme a été longtemps ignoré du fait des capacités de réparation de l'ovocyte et en particulier de l'ovocyte des femmes jeunes. Mais, quand les altérations de l'ADN sont importantes, la réparation ovocytaire ne suffit pas et des anomalies génétiques et surtout épigénétiques sont à craindre (16, 17).

Les altérations nucléaires spermatiques sont étroitement liées aux échecs d'ICSI (18, 19) et nous savons aujourd'hui qu'un taux élevé d'ADN fragmenté est plus souvent retrouvé chez des hommes infertiles que chez des hommes fertiles. Cependant, un profil de spermogramme normal n'exclut pas la présence d'ADN fragmenté. Tesarik *et al.* en 2004 (18) avaient noté qu'un effet paternel plutôt tardif mais non précoce sur le développement embryonnaire était lié à la fragmentation de l'ADN du sperme. Plus récemment, Hazout *et al.* en 2006 (12) confirmaient l'effet bénéfique de l'IMSI dans un groupe de femmes déplorant plus de deux échecs d'ICSI (tableau III). Dans la même étude, ils isolaient un sous-groupe de 72 patients dont l'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique par essai TUNEL avait été effectuée. Les résultats de l'IMSI en termes d'implantation et de grossesses dans ce sous-groupe ont été d'autant plus excellents que le degré de fragmentation de l'ADN spermatique était élevé (tableau IV).

Le TUNEL n'a pas été effectué sur le sperme préparé mais sur le sperme brut alors que le MSOME a permis d'écarter de la micro-injection les têtes avec noyaux

Tableau III – Effet bénéfique du MSOME avant ICSI, d'après Hazout *et al.* (12).

	ICSI		p
	Conventionnelle	IMSI	
Nbre transferts embryonnaires	125	125	-
Nbre embryons transférés	265	261	> 0,05
Nbre grossesses	8	51	< 0,001
Nbre grossesses cliniques	3	47	< 0,001
Nbre accouchements	0	42	< 0,001
Nbre sacs gestationnels avec activité cardiaque	2	53	< 0,001
Nbre enfants nés	0	46	< 0,001
Taux de grossesses (%)	6,4	40,8	< 0,001
Taux de grossesses cliniques (%)	2,4	37,6	< 0,001
Taux d'implantation embryonnaire (%)	0,8	20,3	< 0,001
Taux d'accouchements (%)	0	33,6	< 0,001
Taux de naissances (%)	0	17,6	< 0,001

spermatiques vacuolés. La présence de ces vacuoles a reflété pour les auteurs les altérations moléculaires responsables du remodelage anormal de la chromatine pendant la maturation spermatique (20).

Franco *et al.*, en 2008 (21), ont confirmé cette hypothèse en rapportant un fort taux d'ADN fragmenté dans les spermatozoïdes comprenant essentiellement de larges vacuoles intranucléaires comparativement à des spermatozoïdes strictement normaux (29,1 % *vs* 15,9 %, $p < 0,0001$). Garolla *et al.*, en 2008 (22), ont fait la même observation sur des spermatozoïdes et provenant d'hommes présentant de sévères altérations testiculaires. Ces résultats entérinent la coïncidence entre spermatozoïdes vacuolés et altérations sévères de l'ADN justifiant la pratique de l'IMSI.

La présence de larges vacuoles dans le spermatozoïde n'interdit pas pour autant la fécondation et le développement embryonnaire précoce, voire l'obtention d'embryons dits de top qualité, mais les taux de grossesses sont moindres et les taux de FCS sont significativement plus élevés comparativement à un groupe contrôle (18 % *vs* 50 %, $\chi^2 = 6,4$, et 80 % *vs* 7 %, $\chi^2 = 10,9$, respectivement, $p < 0,001$) (9). Ceci valide l'hypothèse d'un effet paternel tardif.

IMSI et développement embryonnaire

Si de larges vacuoles intranucléaires n'influencent pas le développement embryonnaire précoce, plusieurs auteurs ont étudié la capacité du développement jusqu'au stade blastocyste d'ovocytes micro-injectés avec quatre types de spermatozoïdes : a) grade I (absence de vacuoles) ; b) grade II (≤ 2 petites vacuoles) ; c) grade III (> 2 petites vacuoles ou ≥ 1 grande vacuole) ; d) grade IV (grandes vacuoles avec anomalies de forme de la tête ou d'autres anomalies) (9, 23, 24). Petites (< 4 % de la surface de la tête) ou grandes vacuoles ont été identifiées en fonction de la classification de Bartoov (10) établie au grossissement compris entre $\times 6\,000$ et $\times 12\,500$.

À âge maternel égal, les auteurs n'ont pas trouvé de différence entre les quatre groupes de spermatozoïdes quant au nombre de zygotes, d'embryons développés jusqu'à j2/3 (9, 23, 24). En revanche, les résultats ont montré une différence hautement significative en termes de blastocystes de top qualité obtenus ($p < 0,001$). En comparant les groupes un à un, il n'a pas été trouvé de différence statistiquement significative entre les groupes I et II (~ 50 % [~ 30 %] de blastocystes [top] obtenus) et entre les groupes III et IV (~ 10 % [~ 5 %] de blastocystes [top] obtenus), même si la tendance est à la baisse. En comparant les groupes deux par deux, il n'y avait pas de différence entre les deux premiers groupes et les deux derniers en termes de développement embryonnaire jusqu'à j3 alors qu'il y avait une différence significative pour ce qui concerne le nombre et la qualité des blastocystes obtenus (groupe I/II : ~ 45 % [~ 20 %] de blastocystes [top] obtenus ; groupe III/IV : ~ 10 % [~ 3 %] de blastocystes [top] obtenus) (24). Ainsi, les auteurs ont conclu que la taille et le nombre de vacuoles dans le noyau du spermatozoïde ont influé clairement sur le taux de blastocystes obtenus confirmant ainsi les hypothèses des auteurs précédents (17, 18, 25-27).

MSOME : examen de routine avant ICSI ?

Compte tenu des résultats décrits, certains laboratoires proposent un MSOME dans les cas limites de tératospermies avant toute décision d'IMSI (test pré-IMSI) (27). À condition de ne pas le galvauder,

Tableau IV – ICSI/IMSI et taux de fragmentation (TUNEL), d'après Hazout *et al.* (12).

	% spermatozoïdes avec ADN fragmenté					
	< 30 % (n = 51)		30-40 % (n = 11)		> 40 % (n = 10)	
	Implantation (%)	naissances (%)	Implantation (%)	naissances (%)	Implantation (%)	naissances (%)
ICSI standard	0,9	0	0	0	0,7	0
IMSI	23,6	18,9	17,4	17,4	33,3	28,6
p	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01

cet examen est utile lorsque le spermocytogramme classique décompte un nombre d'anomalies de la tête du spermatozoïde élevé. Bien sûr, la présence de grosses vacuoles est péjorative mais certains auteurs minoritaires, sur la base de la classification de Kruger, considèrent que ces grosses vacuoles sont visibles au grossissement standard et qu'il n'est point besoin de magnifier l'observation des spermatozoïdes avant ICSI.

Ces observations remettent en cause les classifications utilisées dans nos laboratoires en sachant qu'elles sont opérateur-dépendantes et que si une grosse vacuole est repérée au grossissement standard, une ou plusieurs petites ne seront pas forcément dépistées à ce même grossissement (fig. 1). De plus, lorsque l'on sait que l'influence de l'effet paternel est plutôt tardive, en remplaçant des embryons précoces, il est difficile d'appréhender le devenir de certains embryons potentiellement porteurs d'anomalies épigénétiques.

Puisque les biologistes tentent de repérer les meilleurs ovocytes, pourquoi se priver de l'observation et de la sélection des meilleurs spermatozoïdes ?

IMSI et manipulation prolongée du sperme

L'observation du sperme au fort grossissement demande du temps et une exposition prolongée des spermatozoïdes à 37 °C, température à laquelle le risque de dégradation de l'ADN spermatique est élevé (28).

Deux heures d'exposition du sperme à 37 °C suffisent à changer la morphologie des spermatozoïdes et le pourcentage de vacuoles nucléaires et quatre heures d'exposition à 37 °C favorisent la dégradation de l'ADN (29). C'est pourquoi il est recommandé, dans cette situation, de manipuler le sperme à 21 °C ou à température ambiante.

Conclusion

Les méthodes de sélection stricte du spermatozoïde sont fondamentales avant ICSI, en particulier quand, pour des raisons religieuses, éthiques ou légales, il n'est pas possible de conserver des embryons surnuméraires. C'est pourquoi l'observation magnifiée des spermatozoïdes s'est imposée à tous les laboratoires d'AMP désireux de potentialiser leurs résultats et surtout d'éviter le grand nombre de fausses couches spontanées précoces rapportées dans les OAT sévères. Les résultats de notre centre sont résumés dans le tableau V.

Plutôt que d'attendre deux échecs d'ICSI standard, il devient évident qu'une sélection rigoureuse du spermatozoïde prêt à être micro-injecté augmente les taux de grossesses évolutives mais prémunit aussi des anomalies épigénétiques qui pourraient menacer la descendance. Si toutes les études répertoriées se sont bornées à mettre en exergue les résultats à partir de spermes très altérés, plusieurs études prospectives et randomisées devraient confirmer

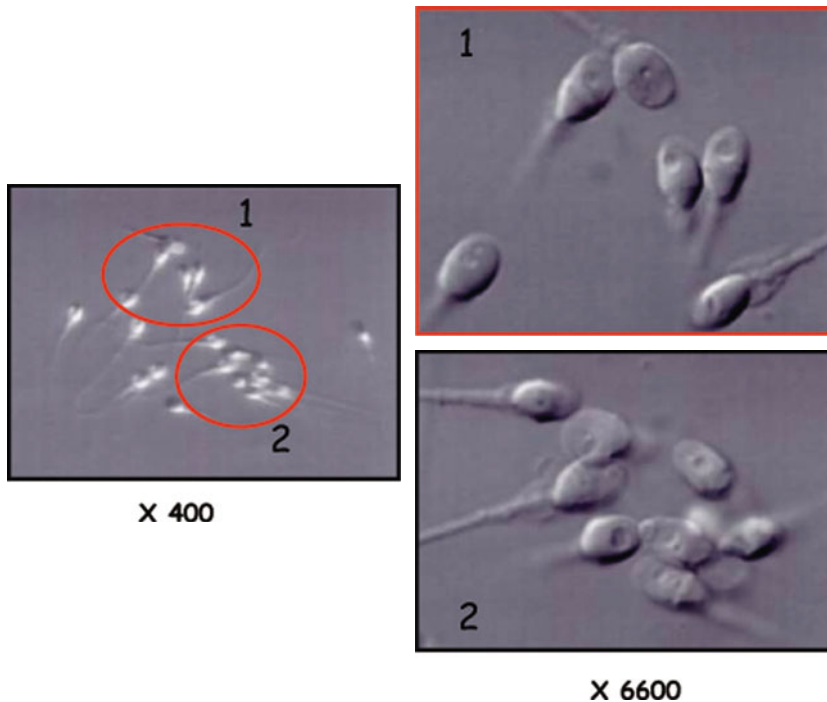


Fig. 1 – Spermatozoïdes au grossissement $\times 400$ (Hoffman) et $\times 6\,600$ (Nomarski).

Tableau V – Résultats d'IMSI (unité AMP EYLAU Unilabs).

2006-2007	ICSI sans IMSI	ICSI avec IMSI
Ponctions (n)	1 852	999
Transferts (n)	1 668	965
Grossesses évolutives (n)	456	283
Taux de grossesses cliniques/ponction (%)	24,6	28,3
Taux de grossesses cliniques/transfert (%)	27,3	29,3

de meilleurs taux de grossesses à partir de spermés *a priori* normaux, pas nécessairement protégés des dégradations de l'ADN par stress oxydatif ou mauvaises conditions environnementales. Tout au moins pourrait-on définir à l'avenir des populations d'hommes infertiles susceptibles de bénéficier de l'IMSI.

Références

- World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF *et al.* (1988) Predictive value of sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49: 112-21
- Nagy ZP, Liu J, Joris H *et al.* (1995) The result of ICSI is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 10: 1123-9
- Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS *et al.* (1996) The outcome of ICSI is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Hum Reprod* 11: 1019-22
- Tezarik J, Mendoza C, Greco E (2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 17: 184-9
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* (2002) Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23: 1-8
- Bartoov B, Eltes F, Pansky M *et al.* (1994) Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 9: 2069-75
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S *et al.* (2005) The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 20: 185-90
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A *et al.* (2006) Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 21: 1787-90
- Wittermer C, Pujol A, Boughali H, Viville S (2006) The impact of high-magnification evaluation of sperm on ART outcome. *Hum Reprod* 21 (Suppl 1):i59-i60
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 80: 1413-9
- Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM *et al.* (2006) High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 12: 19-25
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H *et al.* (2006) How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 12: 634-8
- Antinori M, Licata E, Dani G *et al.* (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 16: 835-41
- Boldi Cotti P, Chigioni S, Galofre Ballesteros GM *et al.* (2008) Advantages of HM-ICSI for the treatment of different fertility disorders. *Hum Reprod* 23 (Suppl 1): i157-i159
- Aitken RJ, De Iuliis GN (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 14: 727-33
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M *et al.* (2008) Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behaviour of adult offspring. *Biol Reprod* 78: 761-72
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19: 611-5
- Tesarik J (2005) Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 10: 370-5
- Cayli S, Jakab A, Ovari L *et al.* (2003) Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 7: 462-8
- Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL *et al.* (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 17: 42-5
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M *et al.* (2008) High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 17: 610-6
- Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC *et al.* (2008) Comparison of day 2 embryo quality after ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Hum Reprod* 23 (Suppl1): i70-i72
- Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P *et al.* (2008) Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 17: 617-27
- Vanderzwalmen P, Bertin-Segal G, Geerts L *et al.* (1991) Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum Reprod* 6: 581-8
- Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 13: 1632-7
- Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM *et al.* (2008) A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 92: 1616-25
- Peer S, Eltes F, Berkovitz A *et al.* (2007) Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? *Fertil Steril* 88: 1589-94
- Hammadeh ME, Strehler E, Zeginiadou T *et al.* (2001) Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Arch Androl* 47: 83-7

R.-C. Chian and J.-H. Lim

***In vitro* maturation of immature human oocytes for clinical application: past, today and tomorrow**

Introduction

The oocyte is a unique cell in the human body, not only in its special structure and function, but also in undergoing meiosis. Meiotic progression in the oocyte is defined as oocyte maturation from reinitiation of the first meiotic division to metaphase-II (M-II), at the same time, accompanying cytoplasmic maturation to prepare the oocyte for subsequent fertilization and early embryonic development successfully (1). *In vivo* meiotic resumption of oocyte is initiated in response to the pre-ovulatory surge of luteinizing hormone (LH). LH surge triggers oocyte maturation from germinal vesicle (GV) stage to M-II stage. Practically for infertility treatment with *in vitro* fertilization (IVF) technology, the patients are given human chorionic gonadotropin (HCG) to induce the completion of oocyte meiosis in the follicles to retrieve M-II oocytes after 36 h of HCG injection. Without HCG injection in IVF treatment, most oocytes retrieved will be at immature GV stage.

Pincus and Enzmann (2) firstly reported that the mammalian oocytes can be matured spontaneously to M-II stage *in vitro* when the immature oocytes are removed from the antral follicles. They reported that the immature human oocyte can be matured *in vitro* following removal from follicles cultured for 12 h as the rabbit oocytes (3). In fact, it is possible to mature immature human oocytes from GV stage to M-II stage *in vitro* following culture for 12 h. The time course for human oocytes maturation *in vitro* was corrected by Edwards (4), indicating that immature human oocytes need to be cultured for more than 24 h to become mature, and most of immature human oocytes from GV stage to M-II stage required more than 36 h of culture *in vitro*.

Although great attempts have been made in the early days with immature human oocytes for *in vitro* maturation (IVM) followed by IVF (5), the

first live birth from IVF was produced from *in vivo* matured oocytes from natural cycle (6), not from *in vitro* matured oocytes, because there was limitation to get immature oocytes from the patients because of oocyte retrieval technique. At the beginning, it seemed very difficult to collect human oocytes, either mature or immature. The development of laparoscopy and endocrinology made it possible to retrieve mature oocytes from the leading or dominant follicles before ovulation occurred. The mature oocytes can be fertilized *in vitro*, and the resulting embryos are used for transfer. However, during early days, IVF technology did not seem very efficient for women with natural cycle IVF treatment because there were many consequences associated with this IVF treatment. During menstrual cycle, normally only one or two follicles develop to dominant follicles, and with natural cycle IVF treatment, this may result in no embryo available for transfer. Therefore, infertility treatment with IVF from natural cycle moved to ovarian stimulation to produce more oocytes for improvement of IVF treatment. Initially, clomiphene citrate was used, which was then combined with human menopausal gonadotropin (hMG) to produce more than one oocyte (7–9). Slowly ovarian stimulation protocols were developed to current 'long and short protocol' to stimulate ovaries, which involved combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist or antagonist with gonadotropins. With different stimulation protocols, normally an average of 10–15 mature oocytes can be obtained from each patient who underwent the stimulation cycle for IVF treatment. It seems that with more mature oocytes retrieved, the chance for pregnancy is increased because there are more embryos available for transfer.

However, some women are extremely sensitive to stimulation with exogenous gonadotropins and are at increased risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), a life-threatening

condition (8). Repeated ovarian stimulation may cause severe side effects (10–13). Therefore, IVM of immature human oocytes interested many scientists and clinicians. IVM of immature oocytes is a reproductive technology that enables maturation of immature oocytes and their fertilization to generate viable embryos and live births. The most beneficial point for IVM of immature human oocytes is avoidance of side effects from ovarian stimulation, apart from the cost for gonadotropins and intensive monitoring during ovarian stimulation. Since the first live birth from IVF treatment (6), more than three decades, more and more questions have been asked regarding the ovarian stimulation protocols. People are interested in mild or no ovarian stimulation, if the similar pregnancy rate can be achieved.

There were different approaches reported during the last 30 years. One of them was IVM technology. The first live birth from IVM oocytes was reported from ovarian follicles donated to another couple during surgery (14) because immature oocyte retrieval technique had its limitation at that time. The first live birth from a woman using her own oocytes following immature oocyte retrieval and IVM was from a woman with polycystic ovary syndrome (PCOS) (15). The immature oocytes were retrieved by using the transvaginal oocyte retrieval technique, which is a routine method for oocyte collection today. The technology available to retrieve immature oocytes from women with PCOS leads IVM technology from the basic research to clinical application. As mentioned previously, regardless of IVF or IVM treatment, at the beginning of the development, the number of collected oocytes related directly to its efficiency.

During the last 10 years, a significant progress has been made to improve pregnancy and implantation rates from *in vitro* matured human oocytes. IVM technology can now serve as a successful option to infertile women with PCOS. Currently it has been estimated that more than 2000 healthy infants have been born following immature oocyte retrieval and IVM. In general, the clinical pregnancy and implantation rates have reached 35–40% and 10–15%, respectively, in infertile women with PCOS (16).

There are many review articles dealing with the mechanism of oocyte maturation, especially its regulatory pathway during oocyte maturation *in vitro*. Most of our knowledge on oocyte maturation is based on *in vitro* studies. However, we have to be aware that sometimes the *in vitro* model may not be applied to *in vivo* condition. In this chapter, we will not discuss the mechanism of human oocyte

maturation *in vitro* or *in vivo*. We will focus on discussing IVM technology and its efficiency for clinical application as well as the potential for further development.

Methodology of IVM

the clinical application of IVM oocytes has come a long way since the first live birth in the early 1990s. The first pregnancy in a woman with anovulatory infertility following IVM of immature oocytes and IVF was reported by Trounson *et al.* (15). Another pregnancy was reported in a group of patients with PCOS treated with IVM combined with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and assisted hatching (AH) (17). Subsequent studies indicated that although immature oocytes recovered from untreated patients with PCOS can be matured, fertilized, and developed *in vitro*, the implantation rate of these cleaved embryos is disappointingly low (18–20). However, recent data indicate that with an alternative IVM treatment in these patients, using priming with follicle-stimulating hormone (FSH) or HCG before immature oocyte retrieval, the clinical pregnancy and implantation rates can be significantly improved (16). There are more than thousands of IVM babies born today, based on various studies worldwide. There is no unique IVM technology applied across the world. However, IVM technology can be divided into the following based on hormone treatment before immature oocyte retrieval: (i) priming with FSH and (ii) priming with HCG.

Priming with FSH

As an alternative approach, a truncated course of ovarian stimulation with FSH before immature oocyte retrieval has been applied, indicating that FSH pre-treatment promotes efficient recovery of immature oocytes and maturation *in vitro* (21). It has been reported that the immature oocytes from stimulated cycles in normal cycling woman without HCG can be matured and fertilized *in vitro* and permitted to attain pregnancy and live birth (22). However, another report indicated that FSH priming with a fixed dose (150 IU/day) for 3 days from day 3 of menstrual cycle does not increase the number of oocytes obtained per aspiration and does not improve oocyte maturation, cleavage rates, or embryo development in women with normal cycling ovaries (23). Furthermore, Suikkari *et al.* (24) reported that although using low-dose FSH priming started from luteal phase improves the efficiency of immature oocyte recovery, matura-

tion, and fertilization rates, the average number of immature oocytes collected and the rates of oocyte maturation and fertilization are not different between women with regular menstrual cycles and women with irregular cycles of PCOS. Nevertheless, it has been reported that priming with rFSH during follicular phase before harvesting of immature oocytes from the patients with PCOS improves the maturational potential of the oocytes and the implantation rate of the cleaved embryos, indicating that significantly higher pregnancy (29%, 7/24) and implantation (21%, 8/37) rates were obtained when priming with FSH before immature oocyte retrieval (25). More recently, Mikkelsen *et al.* (26) also reported that there are no difference in the rates of oocyte maturation, fertilization, cleavage, or implantation between 2 and 3 days that is the time (coasting) interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for IVM when the normal cycling women were primed with 150 IU FSH/day for 3 days started at day 3. It seems that optimizing IVM treatment for different groups of patients is important, and that after individualized IVM treatment the pregnancy and implantation rates per embryo transfer can reach 23% and 14%, respectively (27).

Interestingly, it has been reported that FSH priming with 75 IU/day for 6 days in combination with HCG priming 36 h before immature oocyte retrieval has no additional benefit when women were with PCOS (28). Although these results are conflicting on the benefits of using FSH priming in women with regular menstrual ovaries or irregular menstrual cycles of PCOS, theoretically the use of FSH priming at the beginning of follicular or luteal phases may enhance follicular development and the maturational competence of immature oocytes *in vivo*. However, further studies are required to confirm these benefits of priming with FSH before immature oocyte retrieval from women with regular menstrual cycling normal ovaries or with irregular menstrual cycling with PCOS.

Priming with HCG

A few GV-stage oocytes may be retrieved from the stimulated cycles even 36 h after HCG administration. These immature oocytes are capable of undergoing IVM and then normal fertilization and development. Although successful pregnancies have been established using *in vitro* matured oocytes (29–32), the pregnancy rate was unacceptably low. It has been noticed that morphological and molecular differences exist between the immature oocytes collected from stimulated cycles and those collected from caesarean section (33). In addition,

it has been found that the time course of GV breakdown (GVBD) and oocyte maturation is different between these oocytes, although the final rates of oocyte maturation are not different in the groups (1). It appears that the oocytes retrieved from follicles in women undergoing ovarian stimulation respond to HCG that may promote the initiation of oocyte maturation *in vivo*. It has demonstrated that the time course of oocyte maturation *in vitro* is hastened and the rate of oocyte maturation is increased by priming with 10,000 IU HCG 36 h before retrieval of immature oocytes from women with PCOS (34, 35). Therefore, it is possible that pregnancy rate may potentially be improved by priming with HCG prior to immature oocyte retrieval (36). This hypothesis was confirmed by other reports (28, 37–39).

Lin *et al.* (28) reported that a 36.4% clinical pregnancy rate was obtained from 33 cycles of IVM treatment when priming with HCG before immature oocyte retrieval from women with PCOS, indicating the beneficial effect of HCG priming on IVM treatment. Interestingly, recent findings indicated that in women with PCOS, the time course and maturation rate are different when the GV-stage oocytes were divided into different groups based on the morphology of cumulus cells after HCG priming (40). Therefore, it seems that HCG priming not only enhances maturation of some oocytes from the relatively bigger size of follicles (>10 mm in diameter) to metaphase-I stage but also promotes some GV-stage oocytes from the small follicles to acquire maturational and developmental competence *in vivo*. However, the exact mechanism of HCG priming on those small follicles is still largely unclear. Further researches are required to understand the functional role of HCG priming before immature oocyte retrieval on the small-size follicles in women with PCOS.

Immature oocyte retrieval

Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration has now become the preferred procedure of choice for immature oocyte retrieval in IVM treatment cycles. The same principles applied to IVF oocyte retrieval are also valid for IVM patients. A smaller gauge needle (19G or 20G) is preferable. This causes less pain and less damage to the smaller follicles, thereby allowing greater numbers of immature oocytes to be collected.

Because the intrafollicular pressure is already higher in small follicles, the aspiration vacuum pressure is reduced to 85 mmHg, which is approximately half the conventional IVF aspiration pressure. A

higher aspiration pressure provokes an increase in the number of denuded oocytes. Good ultrasonographic visualization is the key point for successful immature oocyte retrieval. The follicular sizes vary and certain follicles may be difficult to aspirate or, even if they are aspirated, no oocytes may be recovered, especially from the very small size follicles (<4 mm in diameter). Aspirates are collected in 10 mL culture tubes containing approximately 2 mL of heparinized warming medium (usually containing 2 units/mL of heparin). It is possible to use 0.9% saline containing 2 units/mL heparin.

There are two ways to look for and collect immature oocytes from follicular aspirates. (i) Dish search: the follicular aspirates are poured directly into a Petri dish and examined for immature oocytes under a stereomicroscope. (ii) Cell strainer: the follicular aspirates are filled through a cell strainer (70 μ m nylon). After filtering, the collected aspirates can be rinsed with pre-warmed flushing medium and transferred to a Petri dish to search for immature oocytes under a stereomicroscope. All handling procedures should be conducted on warm stages or plates at 37°C.

***In vitro* maturation of immature oocytes**

Human oocytes acquire a series of competences during follicular development (oocyte growth and maturation) that play critical roles in fertilization and subsequent early embryonic development. Oocyte maturation *in vitro* is profoundly affected by culture conditions. Although numerous data have been accumulated from animal studies, the current rationale for choosing a specific medium for IVM of immature human oocytes appears to stem largely from adapting methods developed for culturing other cell types.

Different energy substrates and nutrients can greatly influence oocyte meiotic and cytoplasmic maturation (41, 42). Glucose, pyruvate, and lactate are the main substrates for energy metabolism in somatic cells and oocytes. Glutamine can also serve as an energy substrate to improve *in vitro* nuclear maturation of hamster and rabbit oocytes (43, 44). Oocyte utilization of pyruvate is closely dependent on cumulus cells that can convert glucose or lactate into pyruvate to be used by oocytes (45). Pyruvate or oxaloacetate, but not glucose, lactate, or phosphoenolpyruvate, supports the maturation of denuded mouse oocytes through meiosis to M-II stage (46). It has been confirmed that mitochondrial oxidative metabolism is much more important than anaerobic glucose metabolism for energy production in the mammalian oocytes (47).

Synthesis of pyruvate from glucose in the cumulus cells provides additional evidence that these cells are able to influence the nutritional environment of the maturing oocytes (48). It has been shown that sodium pyruvate in non-serum maturation medium supports and promotes nuclear maturation of bovine cumulus-denuded oocytes (49). However, it has been reported that pyruvate alone is insufficient for oocyte cytoplasmic maturation (50). Nevertheless, it has been indicated that the expression pathway of glycolytic metabolism reflects the presence of different mechanisms involved in gene expression/regulation at the transcriptional and translational level and their accumulation during human oocyte maturation (51). In addition, it has been indicated that metabolism of glucose through the Embden-Meyerhof pathway is important during bovine oocyte maturation *in vitro* (52). There is no direct information about human oocytes.

Spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro*, in either the presence or the absence of meiotic inhibitor, is associated with a decrease in oocyte cAMP levels (53). In mice, glucose treatment of cumulus-oocyte complexes (COCs) produced elevated cAMP levels, which are associated with a decreased incidence of GVBD in hypoxanthine-supplemented medium (54). Pyruvate directly affects nuclear maturation in mouse oocytes (55). Although it has been indicated that glucose may have an inhibitive effect on cumulus-free human oocyte maturation *in vitro* (56), the results from our laboratory indicate that oocyte maturation medium with glucose is beneficial to bovine and human oocyte nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro* with proper concentrations (42, 57).

Essential and/or non-essential amino acids are commonly added to serum-supplemented or serum-free culture media for mammalian embryo development *in vitro*. In many species, it has been known that addition of amino acids to the culture medium is beneficial for embryonic development (58). Apart from the use of amino acids for protein synthesis, they play important roles as osmolytes (59), intracellular buffers (60), heavy metal chelators, and energy sources (61), as well as precursors for versatile physiological regulators, such as nitric oxide and polyamines (62). It has also been shown that the culture medium with amino acids affects glucose metabolism in mouse blastocysts *in vitro* (58). Although it has been shown that amino acids support rabbit (8), hamster (43), porcine (63), and bovine (41) oocyte maturation, amino acid requirements for human oocyte maturation in culture are not fully understood. The data from our laboratory indicate that essential amino acids supplemented to a simple chemically defined medium

are absolutely required for bovine oocyte cytoplasmic maturation to support subsequent embryonic development and non-essential amino acids with essential amino acids have a synergistic effect on oocyte cytoplasmic maturation (64, 65).

It has been reported that the addition of water-soluble vitamins, particularly inositol, to the embryo culture medium enhances the hatching of rabbit and hamster blastocysts (66, 67). Vitamins affect glucose metabolism in mouse (58) and sheep embryos (68). However, there is a paucity of information about the effects of vitamins in culture medium on the maturational and developmental competence of immature oocytes. The results from this laboratory demonstrate that the presence of vitamins in the oocyte maturation medium is important for subsequent bovine embryonic development (69). Based on the animal model study, we have designed a new IVM medium and shown that this IVM medium is beneficial for nuclear and cytoplasmic maturation of immature human oocytes derived from both stimulated IVF and unstimulated cycles (57).

Complex culture media supplemented with various sera, gonadotropins (FSH and LH), and estradiol, have been most widely used in research or the clinical application of human oocytes IVM (19). *In vitro* studies have shown that meiotic resumption in COCs can be induced by adding growth factors into culture media. Furthermore, supplementation of insulin into IVM medium seems to stimulate oocyte maturation and morphologic development of mouse and bovine blastocysts (70, 71).

The immature COCs are cultured in the IVM medium in the incubator and allowed to begin the maturation process for 24–48 h. Twenty-four hours after maturation in culture, all of the COCs are stripped for identification of oocyte maturity. COCs will be denuded using a finely drawn glass pipette following 1 min of exposure to a commercially available hyaluronidase solution. The mature oocytes are then subjected to insemination by either IVF or ICSI after stripping. The remaining immature oocytes (GV and M-I) continue to mature in culture for another 24 h. Forty-eight hours after oocyte retrieval (or oocyte maturation in culture), the remaining stripped oocytes are re-examined, and if any have matured (M-II) at this point, they will be inseminated immediately by either IVF or ICSI.

***In vitro* fertilization of in vitro matured oocytes**

ICSI is recommended for the insemination of *in vitro* matured oocytes because we believe that this

method offers a greater chance of successful fertilization than does IVF. ICSI is a common procedure for this reason. Although it is preferable to prepare sperm fresh before ICSI, it does not appear problematic to use sperm prepared on the day of egg collection or the day after for oocytes matured 48 h after egg retrieval. Commercially available ICSI medium and polyvinylpyrrolidone (PVP) solution can be used to prepare the ICSI dish. It is also appropriate to use the oocyte-washing medium for preparation of the ICSI droplets because the pH of the oocyte-washing medium is quite stable at room temperature and pressure. However, it is important to note that the ICSI dish should be prepared at least 1 h before ICSI and kept at 37°C in the incubator or on warm stage or plate for equilibration. After ICSI, the individual oocyte is transferred into a droplet (20 µL) of the embryo culture medium in a Petri dish for culture in the incubator.

Preparation of endometrium

Preparation of the endometrial lining is also required using progesterone. Two hundred milligrams of intra-vaginal progesterone (Prometrium) is administered to the patient three times daily or progesterone injections are given subcutaneously with instruction starting from the day after egg collection and continuing until the pregnancy test. On the day of embryo transfer (ET), endometrial thickness should be measured by transvaginal ultrasound scan. At this point, the endometrial thickness should be at least ≥ 7.0 mm. If the endometrial thickness is < 7.0 mm, the embryo should be cryopreserved and transferred in a subsequent cycle.

Embryo transfer

It seems that most ET in IVM treatment can be performed on day 2 or 3 after ICSI because no extra benefit is derived by culturing the embryos to blastocyst stage if the available number of embryos is small. In general, ET should be performed on day 2 after ICSI if the number of embryos obtained is ≤ 3 ; ET should be performed on day 3 after ICSI if the number of embryos obtained is ≥ 4 . ET with blastocyst should only be considered if a total of more than four good-quality four-cell-stage embryos are achieved on day 2 of embryo assessment after ICSI.

The scoring of cleavage-stage embryos for transfer is crucial for pregnancy potential. As the oocytes may not be matured and inseminated at the same time following maturation in culture, the developmental stages of embryos may be variable in the

same patient. Therefore, before ET, all embryos for each patient should be pooled and selected for transfer. The final outcome of pregnancy may depend, to a great extent, on the experience of the embryologist. The cleavage speed of embryos and the morphological marker of each cleaved blastomere are usually used for scoring the quality of embryos generated from *in vitro* matured oocytes. It is recommended that a maximum of two embryos be transferred into the uterus, based on the quality of embryos, or if blastocysts are obtained, the number of embryos for transfer should be only one or two. It is not true that transferring a greater number of poor-quality embryos increases pregnancy and implantation rates.

One of the final key contributory factors to a successful pregnancy is embryo transfer. Careful attention must be paid to both the scientific and clinical aspects of this event. A trial or mock transfer prior to the actual transfer provides very useful information to ensure a curved cervical canal and ascertain the position of the uterus and avert any foreseeable problems during the actual transfer. It is important that as much mucus as possible is removed from the cervix with a sterile cotton bud before ET. An abdominal ultrasound-guided ET may be recommended in selected cases to confirm that the embryos with the fluid contents of the catheter are in the uterus.

Clinical outcome

As mentioned above, it is demonstrated that priming of immature oocytes with FSH or HCG prior to immature oocyte retrieval improves oocyte maturation rate and embryo quality as well as pregnancy rates when done in women infertile with PCOS. The size of follicles may be important for the subsequent embryonic development, but the developmental competence of oocytes derived from the small antral follicles seems not to be adversely affected by the presence of a dominant follicle. It has been estimated that there are more than 2000 healthy infants born following immature oocyte retrieval and IVM. In general, the clinical pregnancy and implantation rates per ET have reached approximately 35–40% and 10–15%, respectively, in infertile women with PCOS (16).

Natural cycle IVF/M

In women, although only a single follicle usually grows to the pre-ovulatory stage and releases its

oocytes for potential fertilization, there are many small follicles that also develop during the same follicular phase of the menstrual cycle. It seems that approximately 20 antral follicles are selected and continued through to the pre-ovulatory stages of development during each menstrual cycle (72). Recently, two or three waves of ovarian follicular development have been documented in women during menstrual cycle based on daily transvaginal ultrasonography, challenging the traditional theory that a single cohort of antral follicles grows only during the follicular phase of the menstrual cycle (73, 74). Animal model studies also supported the findings that oocyte quality and early embryonic developmental competence of immature oocytes following maturation *in vitro* are not detrimentally affected by the presence of the dominant follicle in the ovaries (75, 76).

It has been demonstrated in humans that atresia does not occur in the non-dominant follicles even after the dominant follicle is selected in the ovary during folliculogenesis, because immature oocytes retrieved from non-dominant follicles have been successfully matured *in vitro*, fertilized, and have resulted in several pregnancies and healthy live births (77). Therefore, one very attractive possibility for enhancement of the success of natural cycle of IVF treatment is its combination with immature oocyte retrieval and IVM. If the mature oocytes from the dominant follicle together with immature oocytes from the small follicles are collected, the chances of a pregnancy are greatly increased when we manage to mature these immature oocytes and produce several viable embryos. However, it seems very important to prevent ovulation from the dominant follicle caused by a natural LH surge when the patients are treated with natural cycle IVF combined with IVM. Our experience indicates that 10,000 IU HCG can be administered 36 h before oocyte retrieval when the size of the dominant follicle reaches 10–14 mm in diameter. Most oocytes collected from the dominant follicles are at M-II stage. A pilot study indicates that the clinical pregnancy rate can reach approximately 45–50% per ET following natural cycle IVF combined with IVM in a selected group of patients (78). The detail protocol for natural cycle IVF/M is described in Fig. 1.

Literature reports for pregnancy rate per embryo transfer in natural cycle IVF varied between 0% and 30% (79–81). A number of problems arise in natural cycle IVF treatment alone, including an increased risk of empty retrieval during oocyte collection leading to cancellation of treatment cycle. This disadvantage is not in case of the natural cycle IVF/M. It has been shown that more than a half

Natural Cycle IVF/M (Lim-Chian Protocol)

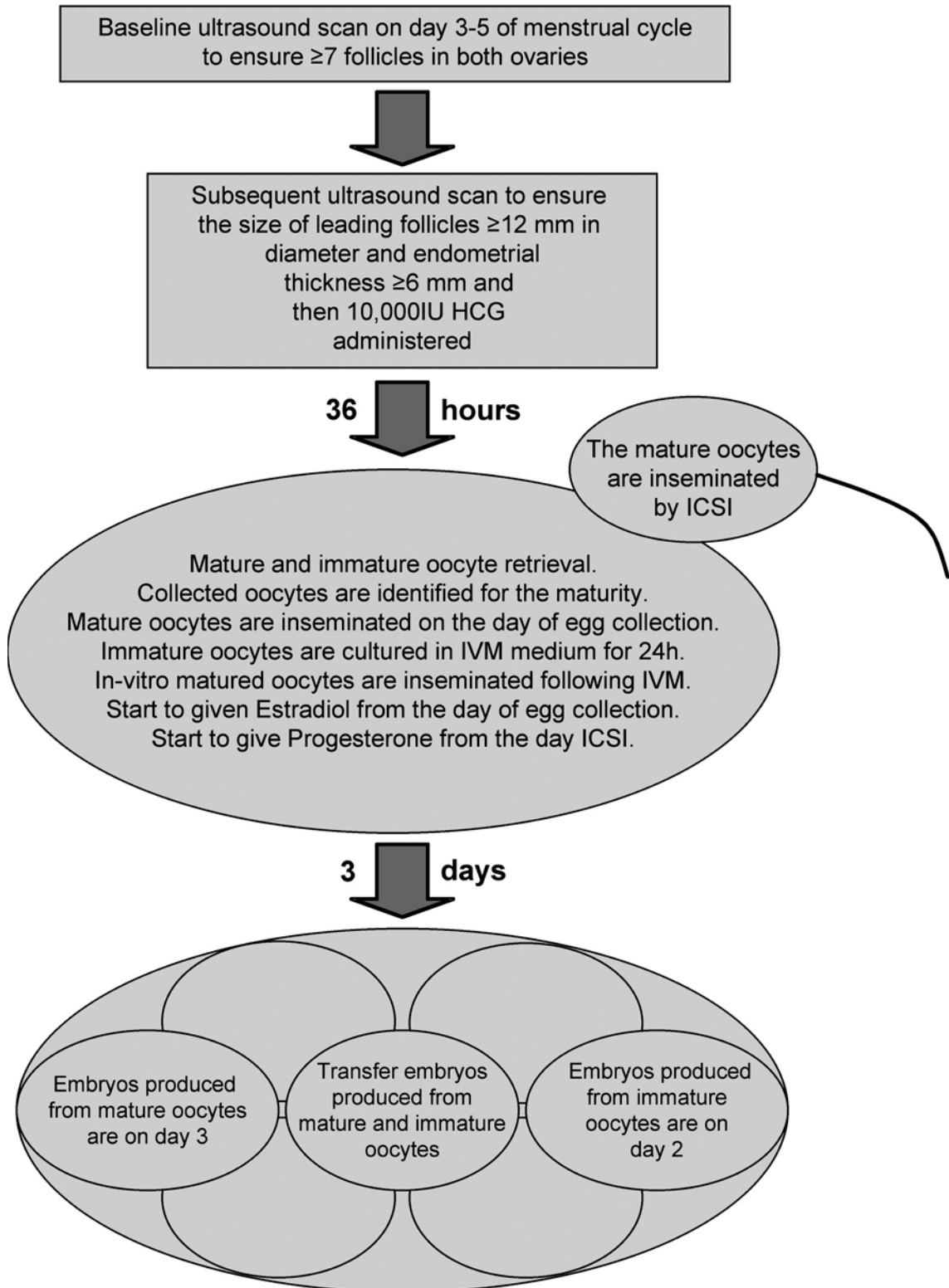


Fig. 1 – Detailed protocol for natural cycle IVF combined with *in vitro* maturation (Lim–Chian protocol). Reprinted with permission from Lim *et al.* (83).

of infertile women who come to infertility clinic for IVF treatment can be treated with natural cycle IVF/M or IVM alone when these treatments have been chosen primarily, and that natural cycle IVF/M is an efficient treatment, especially for women under age of 35 years (Figs 2 and 3). Therefore, it has been clearly demonstrated that natural cycle IVF/M is a more efficient treatment than natural cycle IVF alone.

IVM treatment is offered as a successful option to infertile women with PCOS because there are many antral follicles in the ovaries in this group of patients. PCOS is the most widespread endocrinologic disorder among women of reproductive age as well as the most common cause of anovulatory infertility, and has been shown to exist in approximately 10% of the general population (82). Lim *et al.* (83) further confirm that 15.4% of infertile women are with PCOS and can be treated with IVM alone and that the pregnancy and implantation rates can be as high as 41.3% and 16.6%, respectively (Table 1). This study demonstrated that natural cycle IVF/M together with IVM alone can be used to treat more than a half of population of infertile patients with acceptable pregnancy rate. Therefore, this may be the future direction for infertility treatment with IVM technology.

Conclusions

Priming with FSH or HCG prior to immature oocyte retrieval improves oocyte maturation and pregnancy rates when the immature oocytes are

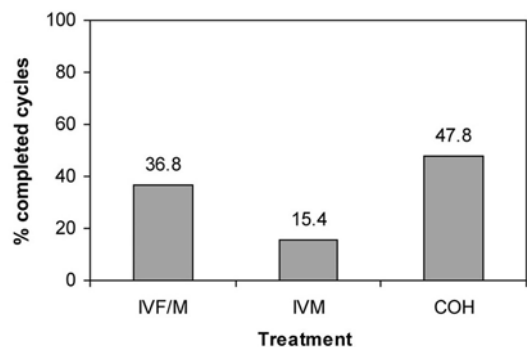


Fig. 2 – The percentages of completed treatment cycles distributed by natural cycle IVF/M, IVM, or COH. A total of 52.2% of cycles were treated by natural cycle IVF/M and IVM. Reprinted with permission from Lim *et al.* (83).

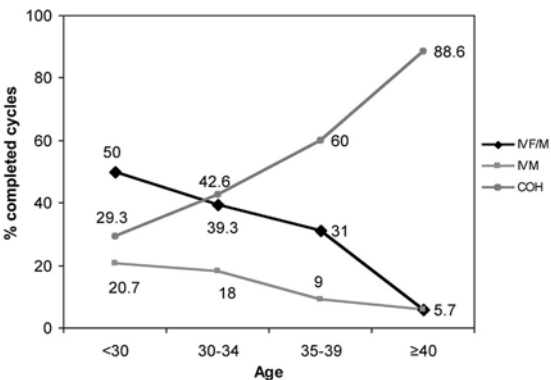


Fig. 3 – The percentages of completed treatment cycles based on age groups distributed by natural cycle IVF/M, IVM, or controlled ovarian hyperstimulation (COH). Under 30 and between 30 and 34 years of age, 70.7% and 57.3% of cycles were treated by natural cycle IVF/M and IVM, respectively. Reprinted with permission from Lim *et al.* (83).

Table I – Comparison of clinical outcome in patients distributed into IVF/M, IVM, or controlled ovarian hyperstimulation (COH) treatment, respectively.

	IVF/M	IVM	COH
No. of cycles started (patients)	153 (140)	63 (56)	201 (182)
No. of cycles completed (patients)	151 (138)	63 (56)	196 (177)
Age (mean ± SD)	31.4 ± 3.7	31.4 ± 4.0	34.4 ± 4.8
No. of oocytes retrieved (mean ± SD)	1826 (12.1 ± 5.6)	1017 (16.1 ± 10.3)	2079 (10.6 ± 6.6)
No. of oocytes matured (%)	1216 (66.6)	658 (64.7)	–
No. of oocytes fertilized (%)	996 (81.9)	519 (78.9)	1485 (79.2)
No. of zygotes cleaved (%)	928 (93.2)	469 (90.4)	1429 (96.2)
No. of embryos transferred (mean ± SD)	462 (3.1 ± 0.8)	210 (3.3 ± 0.6)	513 (2.5 ± 0.4)
No. of clinical pregnancies obtained (%)	61 (40.4)	26 (41.3)	74 (37.8)
No. of embryos implanted (%)	82 (17.8)	35 (16.7)	103 (20.1)
No. of live births (%)	21 (34.4)	8 (30.8)	35 (47.3)
Singleton	18	7	21
Twin	3	1	14
No. of ongoing pregnancies	23 (37.7)	8 (30.8)	21 (28.4)
No. of miscarriages (%)	17 (27.9)	10 (38.5)*	18 (24.3)

Reprinted with permission from Lim *et al.* (83).
*Significantly different compared with other two groups (*P* < 0.05).

retrieved from women with PCOS. The size of follicles may be an important feature for the subsequent embryonic development, but the developmental competence of oocytes derived from the small antral follicles seems not to be adversely affected by the presence of a dominant follicle. Approximately 2000 healthy infants have been born following immature oocyte retrieval and IVM. In general, the clinical pregnancy and implantation rates per ET have reached 35–40% and 10–15%, respectively, in women with PCOS. Therefore, as an option, IVM treatment can be offered to infertile women with PCOS. The combination of natural cycle IVF with immature oocyte retrieval followed by IVM is an attractive treatment for women with all types of infertility without recourse to ovarian stimulation. Natural cycle IVF/M together with IVM alone can be used to treat more than a half of population of infertile patients with acceptable pregnancy rate.

References

1. Cha KY, Chian RC (1998) Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 4:103–120
2. Pincus G, Enzmann EV (1935) The comparative behaviours of mammalian eggs in vitro and in vivo. II. The activation of tubal eggs in the rabbit. *J Exp Med* 62:665–675
3. Pincus G, Saunders B (1939) The comparative behaviours of mammalian eggs in vitro and in vivo. VI. The maturation of human ovarian ova. *Anat Record* 75:537
4. Edwards RG (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 286:926–929
5. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969) Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 221:632–635
6. Steptoe PC, Edwards EG (1978) Successful birth after IVF. *Lancet* 312:366
7. Lopata A, Brown JB, Leeton JF, *et al.* (1978) In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 30:27–35
8. Johnston I, Lopata A, Speir A, *et al.* (1981) In vitro fertilization: the challenge of the eighties. *Fertil Steril* 36:699–708
9. Johnes HW, Jr, Jones GS, Andrews MC, *et al.* (1982) The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 38:14–21
10. Beerendonk CCM, van Dop PA, Braat DDK, *et al.* (1998) Ovarian hyperstimulation syndrome: Fact and fallacies. *Obstet Gynecol Surv* 53:439–449
11. Tarlatzis BC, Grimbizis G, Bontis J, *et al.* (1995) Ovarian stimulation and ovarian tumours: a critical reappraisal. *Hum Reprod Update* 1:284–301
12. Duckitt K, Templeton AA (1998) Cancer in women with infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 10:199–203
13. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, *et al.* (2003) Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Eng J Med* 349:760–766
14. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, *et al.* (1991) Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycle, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 55:109–113
15. Trounson A, Wood C, Kausche A (1994) In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62:353–362
16. Chian RC, Lim JH, Tan SL (2004) State of the art in in vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16:211–219
17. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, *et al.* (1995) Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 10:3243–3247
18. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, *et al.* (1996) Production of embryos from in vitro matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 65:1151–1156
19. Trounson AO, Anderiesz C, Jones GM, *et al.* (1998) Oocyte maturation. *Hum Reprod* 13(Suppl. 3):52–62
20. Cha KY, Han SY, Chung HM, *et al.* (2000) Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 73:978–983
21. Wynn P, Picton HM, Krapez J, *et al.* (1998) Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the number of human oocytes reaching metaphase II by in vitro maturation. *Hum Reprod* 13:3132–3138
22. Liu J, Katz E, Garcia JE, *et al.* (1997) Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertil Steril* 67:566–568
23. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S (1999) In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 14:1847–1851
24. Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, *et al.* (2000) Luteal phase start of low-dose FSH of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 15:747–751
25. Mikkelsen AL, Lindenberg S (2001) Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 122:587–592
26. Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, *et al.* (2003) Time interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for in-vitro maturation: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 16:416–420
27. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, *et al.* (2003). Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod* 18:2131–2136
28. Lin YH, Hwang JH, Huang LW, *et al.* (2003) Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 18:1632–1636
29. Veeck LL, Wortham JW, Jr, *et al.* (1983). Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 39:594–602
30. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, *et al.* (1996) Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 65:1047–1050
31. Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, *et al.* (1997) Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:1056–1058
32. Check ML, Brittingham D, Check JH, *et al.* (2001) Pregnancy following transfer of cryopreserved-thawed embryos that had been a result of fertilization of all in vitro matured metaphase or germinal stage oocytes. Case report. *Clin Exp Obstet Gyn* 28:69–70

33. Chian RC, Park SE, Park EH, *et al.* (1997) Molecular and structural characteristics between immature human oocytes retrieved from stimulated and unstimulated ovaries. In: Gomel V, Leung PCK (eds) *In vitro* fertilization and assisted reproduction. Monduzzi Editore Bologna, pp 315–319
34. Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, *et al.* (1999) Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Eng J Med* 341:1624–1626
35. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, *et al.* (2000) Prospective randomized study of human chorionic gonadotropin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 15:165–170
36. Chian RC, Buckett WM, Too LL, *et al.* (1999) Pregnancies resulting from *in vitro* matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 72:639–642
37. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL, *et al.* (2002) Oocyte donation using immature oocytes from a normal ovulatory woman. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81:274–275
38. Nagle F, Sator MO, Juza J, *et al.* (2002) Successful pregnancy resulting from *in-vitro* matured oocytes retrieved at laparoscopic surgery in a patient with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 17:373–374
39. Son WY, Yoon SH, Lee SW, *et al.* (2002) Blastocyst development and pregnancies after IVF of mature oocytes retrieved from unstimulated patients with PCOS after *in-vivo* HCG priming. *Hum Reprod* 17:134–136
40. Yang S, Son W, Lee S, *et al.* (2001) Expression of luteinizing hormone receptor (LH-R), follicle stimulating hormone receptor (FSH) and epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in hCG-priming IVM/F-ET program. *Fertil Steril* 76(Suppl.):S38–O-100
41. Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD (1998) Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6:285–294
42. Chung JT, Tan SL, Chian RC (2002) Effect of glucose on bovine oocyte maturation and subsequent fertilization and early embryonic development *in vitro*. *Biol Reprod* 66(Suppl.):177
43. Gwatkin RBL, Haidri AA (1973) Requirements for the maturation of hamster oocytes *in vitro*. *Exp Cell Res* 76:1–7
44. Bae IH, Foote RH (1975) Utilization of glutamine for energy and protein synthesis by cultured rabbit follicular oocytes. *Exp Cell Res* 90:432–436
45. Leese HJ, Barton AM (1985) Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 234:231–236
46. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:560–567
47. Gandolfi F, Milanese E, Pocar P, *et al.* (1998) Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 49:168–175
48. Leese HJ, Barton AM (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantational embryos. *J Reprod Fertil* 72:9–13
49. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, *et al.* (2000) Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 63:1730–1734
50. Zheng P, Wang H, Bavister BD, *et al.* (2001) Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development. *Hum Reprod* 16:300–305
51. Mouatassim SEL, Hazout A, Bellec V, *et al.* (1999) Glucose metabolism during the final stage of human oocyte maturation: genetic expression of hexokinase, glucose phosphate isomerase and phosphofructokinase. *Zygote* 7:45–50
52. Krisher RL, Bavister BD (1999) Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev* 53:19–26
53. Downs SM, Daniel SAJ, Bornslaeger EA, *et al.* (1989) Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of camp levels and camp phosphodiesterase activity. *Gamete Res* 23:323–334
54. Downs SM (1995) The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol* 167:502–512
55. Haekwon K, Schuetz AW (1991) Regulation of nuclear membrane assembly and maintenance during *in vitro* maturation of mouse oocytes: role of pyruvate and protein synthesis. *Cell Tissue Res* 265:105–112
56. Cekleniak NA, Combelles CMH, Ganz DA, *et al.* (2001) A novel system for *in vitro* maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 75:1185–1193
57. Chian RC, Tan SL (2002) Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online* 5:125–132
58. Lane M, Gardner DK (1998) Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 13:991–997
59. Biggers JD, Lawwitts JA, Lechene CP (1993) The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 34:380–390
60. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK (1998) Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 13:344–348
61. Bavister BD (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1:91–148
62. Wu G, Morris SM, Jr (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336:1–17
63. Ka HH, Sawai K, Wang, WH, *et al.* (1997) Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod* 57:1478–1483
64. Rezaei N, Abdul-Jalil AK, Chung JT, *et al.* (2003) Role of essential and non-essential amino acids contained in maturation medium on bovine oocyte maturation and subsequent fertilization and early embryonic development *in vitro*. *Theriogenology* 59:497
65. Rezaei N, Chian RC (2005) Effects of essential and non-essential amino acids on *in-vitro* maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. *Iranian J Reprod Med* 3:36–41
66. Kane MT, Bavister BD (1988) Vitamins requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. *Biol Reprod* 39:1137–1143
67. Fahy MM, Kane MT (1992) Inositol stimulates DNA and protein synthesis, and expansion by rabbit blastocysts *in vitro*. *Hum Reprod* 7:550–552
68. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, *et al.* (1994) Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 50:390–400
69. Abdul Jalil AK, Rezaei N, Chung JT, *et al.* (2002) Effect of vitamins during oocyte maturation on subsequent embryonic development *in vitro*. 48th Ann Meeting CFAS:TP-24
70. Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, *et al.* (1993) Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, and

- diolyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. J Exp Zool 266:74–78
71. Ocana-Quero JM, Pinedo-Merlin M, Ortega-Mariscal E, *et al.* (1998) Influence of human and bovine insulin on *in vitro* maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. Arch Zootec 47:85–93
72. Hillier SG (1994) Current concepts of the role of FSH and LH in folliculogenesis. Hum Reprod 9:188–191
73. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA (2003) A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. Fertil Steril 80:116–122
74. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA (2003) Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. Biol Reprod 69:1023–1031
75. Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, *et al.* (1996) Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. J Reprod Fertil 106:193–199
76. Chian RC, Chung JT, Downey BR, *et al.* (2002) Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. Reprod Biomed Online 4:129–134
77. Chian RC, Buckett WM, Abdul Jalil AK, *et al.* (2004) Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. Fertil Steril 82:1675–1678
78. Lim JH, Yang SH, Chian RC (2007) New alternative to infertility treatment for women without ovarian stimulation. Reprod Biomed Online 14:547–549
79. MacDougall MJ, Tan SL, Hall V, *et al.* (1994) Comparison of natural with clomiphene citrate-stimulated cycles in in vitro fertilization: a prospective, randomized trial. Fertil Steril 61:1052–1057.
80. Thornton MH, Francis MM, Paulson RJ (1998) Immature oocyte retrieval: lessons from unstimulated IVF cycles. Fertil Steril 70:647–650
81. Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, *et al.* (2000) In vitro fertilization in a spontaneous cycle: easy, cheap and realistic. Hum Reprod 15:314–318
82. Carmina E, Lobo RA (1999) Polycystic ovary syndrome (PCOS): Arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. J Clin Endocrinol Metab 84:1897–1899
83. Lim JH, Yang SH, Xu Y, *et al.* (2009) Selection of patients for natural cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes. Fertil Steril 91:1050–1055

I. J. Kadoch

Fécondation *in vitro* en cycle naturel

Introduction

La quasi-totalité des fécondations *in vitro* (FIV) effectuées dans le monde sont réalisées après une stimulation ovarienne (FIVs). La FIVs constitue à ce jour le traitement de référence et doit le rester au regard de l'état actuel des connaissances.

La FIV en cycle naturel (FIVn) consiste à réaliser une FIV, en utilisant l'ovocyte issu du seul follicule qui se développe naturellement au cours du cycle menstruel. Le développement d'un programme de FIVn ne doit pas se faire uniquement pour des considérations philosophiques, mais bien parce que cette prise en charge peut avoir un intérêt particulier pour certains couples infertiles.

On peut déplorer que peu de centres offrent la FIVn en routine. De plus, contrairement à la standardisation des protocoles observée en FIVs, chacune de ces équipes possède son propre protocole de FIVn et les résultats sont peu reproductibles d'une équipe à l'autre. La prise en charge élaborée par la clinique OVO de Montréal sera exposée dans cet article (1).

Historique

Il y a près de 30 ans, Edwards et Steptoe obtinrent la première grossesse par FIV dans l'espèce humaine suite au transfert d'un embryon issu d'un cycle naturel. À cette époque, les médecins étaient complètement tributaires de la chronologie naturelle du cycle. Ainsi, le prélèvement ovocytaire se déroulait parfois au milieu de la nuit, sous anesthésie générale puisqu'une laparoscopie était nécessaire pour effectuer le prélèvement ovocytaire (2). À cette époque, aucun médicament n'était disponible pour empêcher une ovulation spontanée prématurée. De ce fait, la rentabilité de ces cycles de FIVn était très faible.

Pour disposer de plusieurs embryons à la fois, il a fallu forcer la nature. Avec l'avènement des traitements de stimulation, la FIVn fut abandonnée dans les années 1980 au profit de la FIVs. Une

logique de nombre s'est imposée : plus on aurait d'ovocytes à mettre en fécondation, plus les chances d'obtenir un nombre satisfaisant d'embryons sélectionnables pour un transfert serait important. Ainsi, les raisons qui ont fait abandonner la FIVn avec un impact positif sur les taux de grossesse sont la meilleure programmation des stimulations sous agonistes de la GnRH et l'amélioration du rendement en termes de nombre d'ovocytes et d'embryons obtenus. Le transfert potentiel d'embryons multiples et la possibilité de cryoconservation d'éventuels embryons surnuméraires sont aussi souvent perçus comme des avantages spécifiques à la FIVs. Cependant, la FIVs nécessite des protocoles contraignants et susceptibles d'entraîner des effets secondaires potentiellement graves. De plus, des études mettent en évidence certaines conséquences néfastes pour l'enfant et la famille en partie liés à la survenue de grossesses multiples. Aujourd'hui, plus de 99 % des cycles de FIV réalisés dans le monde utilise la stimulation ovarienne.

Ces contraintes physiques, psychologiques et financières pour les patientes, mais aussi pour les enfants issus de ces traitements, laissent à penser qu'il est légitime de développer des protocoles visant à réduire les coûts médicaux, sociaux et psychologiques de la FIV en revenant à l'objectif primaire de produire un embryon pouvant être implanté pour aboutir à la naissance d'un enfant en bonne santé. Depuis une dizaine d'années, la FIVn s'inscrit facilement dans le concept novateur de la « *friendly IVF* » décrit initialement par Olivennes et Frydman en 1998 (3). L'utilisation des antagonistes de la GnRH dans le cadre d'une FIV en cycle naturel modifié a donné une seconde jeunesse à cette prise en charge.

On assiste depuis quelques années à une augmentation significative des taux d'implantation expliquée souvent par des laboratoires d'embryologie de plus en plus performants et par une prise en charge clinique soucieuse d'un contrôle stricte de la qualité. De plus, une prise de conscience des coûts et des risques réels ou encore controversés de la stimulation ovarienne font que la FIVn devient pour certains une alternative à considérer. C'est ainsi qu'Edwards en arrive en 2007 à la réflexion que la FIVn pourrait

entre autres remplacer de manière adéquate une prise en charge plus conventionnelle (4).

Terminologie

La réalisation d'une FIV sans stimulation ovarienne a longtemps été dénommée de multiples manières : tantôt « cycle naturel » ou « cycle spontané » pour sous-entendre l'absence de stimulation ovarienne. Le terme « FIVNAT » a parfois été utilisé de manière originale. Pour d'autres, la notion de contrôle médicamenteux du risque d'ovulation prématurée d'un cycle naturel était plus importante et utilisaient les dénominations « FIV en cycle naturel contrôlé » ou encore « FIV en cycle naturel modifié » (5). Enfin, certaines dénominations plus ambiguës telles que « FIV avec stimulation minimale » ou de « FIV semi-naturelle » ont également été proposées.

Finalement, l'International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction (ISMAAR) a statué que le terme « FIV en cycle naturel modifié » serait retenu pour cette approche moderne du cycle naturel impliquant un contrôle du risque d'ovulation prématurée (6).

Principes de la FIVn

Il s'agit de réaliser une FIV, associée éventuellement à une micro-injection de spermatozoïde (ICSI), en utilisant l'ovocyte issu du seul follicule qui se développe au cours du cycle naturel.

Les publications scientifiques ont démontré rapidement que les taux d'implantation remarquablement élevés en FIVn étaient difficilement égalés en FIVs, et ce, au sein d'une même équipe. Le rationnel serait que le corps sélectionne lui-même le meilleur ovocyte disponible pour un cycle donné. L'explication pourrait venir aussi d'une meilleure qualité ovocytaire ou d'un environnement endométrial plus propice à l'implantation expliqués par l'absence de stimulation ovarienne et donc d'une œstradiolémie supra-physiologique. Cette sélection naturelle de l'ovocyte dominant issu de la cohorte de follicules antraux disponibles en phase folliculaire précoce ne pourrait-elle pas être aussi efficace que celle réalisée par l'embryologiste au cours d'une FIVs ? La controverse persiste.

Avantages et inconvénients

La FIVn a été très rapidement supplantée par la FIVs, même si elle présente plusieurs avantages

indéniables. Cependant, l'efficacité de la FIVn reste discutable en raison d'un faible taux de transfert par cycle initié qui s'explique par des risques importants d'annulation lié à des pics prématurés de LH et de ponction blanche.

Avantages

La FIVn constitue une prise en charge très peu invasive et présente de nombreux avantages liés à une utilisation de drogues réduite au maximum. L'absence de désensibilisation hypophysaire et de stimulation ovarienne expliquent l'absence d'effets secondaires liés au traitement et un risque d'hyperstimulation ovarienne nul. Le transfert d'un seul embryon réduit le taux de grossesses multiples à celui des grossesses monozygotes. L'absence d'embryons surnuméraires peut être intéressante pour des raisons d'ordre social, éthique ou légal. Compte tenu de la faible sollicitation de l'organisme féminin, la possibilité de réaliser, en cas d'échec, des cycles consécutifs constitue un avantage spécifique de la FIVn. La diminution des coûts financier et social représente également un atout non négligeable.

Pelinck a démontré récemment que le poids moyen des enfants à la naissance était significativement plus élevé en FIVn, en comparaison avec celui d'enfants nés d'une grossesse unique issue d'une FIVs. Elle en arrive à la conclusion que la stimulation ovarienne pourrait expliquer cette différence (7).

Inconvénients

Les détracteurs de la FIVn lui reproche une surveillance quotidienne très contraignante avec l'angoisse d'une ovulation prématurée, un taux élevé d'annulation, un taux élevé de ponction sans recueil ovocytaire, et enfin, des taux de grossesse faibles par cycle initié. La plupart des publications rapportent une efficacité de la FIVn avec un taux de grossesse clinique par ponction qui varie de 0 à 23 % et un taux de ponction blanche de 15 à 30 %. Les résultats de la clinique OVO sont rapportés dans la figure 1. Au total, 637 cycles chez des patientes de moins de 38 ans ont été réalisés entre décembre 2003 et novembre 2009. Ainsi, près de 43 % des patientes ayant eu un prélèvement ovocytaire ne se rendront pas au transfert embryonnaire. Les résultats restent tout à fait satisfaisants lorsque la FIVn permet l'obtention d'un embryon. En effet, le taux d'implantation dans cette série est de 33,1 %.

Le problème de l'acceptabilité par les patientes se pose concernant la déception liée à l'annulation d'un cycle, l'aboutissement à une ponction blanche

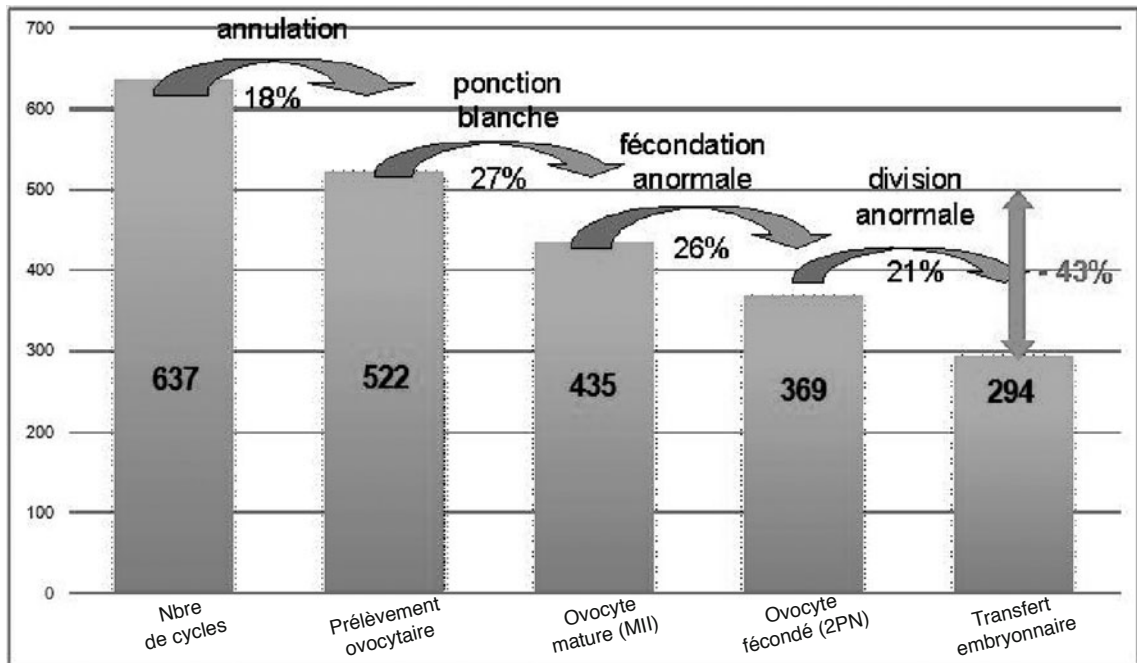


Fig. 1 – Résultats de la clinique OVO.

ou à une absence de transfert. On ne rappellera jamais assez qu'il est important que le couple soit préparé à ces issues possibles. Malgré tout, Pistorius démontre une préférence en faveur de la FIVn de la part des patientes, mais aussi des médecins. La réduction du nombre d'injections semble justifier ses résultats (8). Le faible taux de grossesse par cycle initié constitue souvent une entrave pour les couples qui souhaitent obtenir une grossesse dans les plus brefs délais.

Aussi, on comprend facilement que la compétition entre les différentes cliniques de fertilité et la pression commerciale des compagnies pharmaceutiques peuvent constituer, à tort, des embûches au développement de la FIVn.

La FIVn constitue sans aucun doute la forme de FIV la plus exigeante au plan technique tant pour le clinicien que pour l'embryologiste. Ainsi, seuls les centres ayant des performances remarquables en FIVs ne devraient offrir un programme de FIVn.

Contrôle de l'ovulation spontanée

Monitoring

Historiquement, dans la publication principes d'Edwards en 1980, le monitoring était exclusivement biologique avec un dosage d'œstradiol quotidien et détection urinaire de LH aux trois heures (9).

Même si le monitoring reste habituellement identique à celui pratiqué en FIVs, il peut être plus rapproché dans certains cas. Il implique une surveillance stricte échographique et biologique du follicule dominant avec en particulier dans certains centres, un monitoring répété de la LH sérique ou urinaire afin de dépister la survenue d'un pic prématuré de LH.

À la clinique OVO, le monitoring des cycles de FIVn est exclusivement échographique. La taille du follicule dominant et l'épaisseur de l'endomètre constituent les principaux éléments de substitution de contrôle de la maturité ovocytaire. Toutes les mesures folliculaires sont réalisées avec la technologie 3D qu'offre le SonoAVC afin de réduire le risque de variation inter- et intra-observateur (10).

Contrôle médicamenteux

Déclenchement de l'ovulation

L'hCG a été utilisée depuis longtemps en FIVn dans le but de contrôler le pic naturel de LH. Le follicule dominant reste sélectionné naturellement et l'équipe décide du moment opportun pour déclencher l'ovulation. L'ovulation est ainsi induite avant la survenue du pic spontané de LH, dès que la maturité folliculaire semble atteinte, soit 16 à 18 mm selon les centres. Cependant, l'utilisation de l'hCG pourrait être associée à certains risques. Ainsi, un pic prématuré de LH peut survenir avant l'administration de l'hCG et une injection donnée

trop tôt peut être responsable d'une immaturité ovocytaire.

Quelle que soit la taille folliculaire retenue par un centre pour décider du déclenchement de l'ovulation, on expérimente régulièrement en pratique clinique une hésitation légitime entre déclencher plus tôt pour éviter l'ovulation prématurée et attendre un, voire deux jours de plus, dans le but de réduire les risques d'immaturité ovocytaire et de ponction blanche. L'étude qualitative de la vascularisation périfolliculaire détectée par une mesure du doppler de puissance en 3D pourrait devenir un outil judicieux. Le taux de grossesse clinique évolutive serait significativement plus élevé lorsque l'index de flux (IF) dépasse 30 (11). Avec l'avènement des échographes 3D et 4D, de nouveaux marqueurs de la maturité ovocytaire sont maintenant disponibles. Ainsi, des études sont en cours sur la pertinence de la mesure du volume folliculaire en 3D en remplacement de la classique mesure du diamètre moyen.

Une étude originale de Lenton a récemment comparé deux séries de FIVn dans le but de juger de la pertinence de l'hCG : l'une utilisant un monitoring de la LH pour décider de la ponction ovocytaire et l'autre utilisant l'hCG. De manière surprenante, il observe une altération des résultats en termes de nombre d'ovocytes récupérés et de taux de grossesse clinique dans le groupe utilisant l'hCG (12).

Utilisation des antagonistes de la GnRH

Les antagonistes de la GnRH permettent une gestion simplifiée des cycles en s'affranchissant des pics prématurés de LH. Leurs arrivées ont permis l'élaboration de protocoles permettant de contrôler le risque d'ovulation prématurée, donc d'améliorer le taux de récupération ovocytaire et de réduire le taux d'annulation par leur utilisation. L'étude pilote a été réalisée sur des patientes de bons pronostics par l'équipe de Frydman (13). Cette prise en charge originale permet d'augmenter de manière significative la rentabilité des cycles. Ainsi, la FIVn est modifiée (selon le terme consacré) par l'utilisation des antagonistes de la GnRH.

L'introduction d'un antagoniste de la GnRH entraîne une diminution significative du support en gonadotrophines endogènes au niveau folliculaire et interfère avec la dynamique de croissance folliculaire et la production des stéroïdes. Son usage doit donc systématiquement être associé à un apport exogène en gonadotrophines, afin de prévenir la chute d'œstradiol, maintenir la croissance folliculaire et soutenir la maturation folliculaire (14). Selon les études publiées, la FSH recombinante ou les hMG ont été utilisés, mais notre expérience plaide en faveur des hMG. La dose minimale quotidienne pourrait être de 75 UI mais

la plupart des équipes administrent 150 UI, sans qu'il n'y ait de données validant cette attitude.

En FIVn, le risque d'ovulation sous antagoniste de la GnRH est, pour des raisons qui demeurent obscures, plus important qu'en FIVs. Une posologie quotidienne de 0,25 mg/j de Cetorelix® ou de ganirelix avait été proposée sur des données correspondant aux doses utilisées en FIVs. Afin d'optimiser les résultats en FIVn modifiée, certains ont proposé des solutions tout aussi prudentes qu'onéreuses consistant soit à débiter plus tôt la médication (à un jour fixe, jour 8, ou lorsque le follicule atteint un diamètre de 14 mm), soit de doubler la dose quotidienne d'antagoniste à 0,5 mg (15). Quant à l'utilisation de la forme retard à 3 mg du cetorelix, la possibilité d'un effet propre du produit sur l'endomètre et la rémanence de son action prolongée sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ne plaident pas en sa faveur. Cette crainte de l'ovulation prématurée observée en FIVn est pourtant beaucoup moins perceptible lors du monitoring d'un cycle naturel en vue d'une insémination intra-utérine ou d'un transfert d'embryon congelé.

Indométhacine

Si l'utilisation des antagonistes de la GnRH trouve une bonne indication dans cette situation en réduisant le risque de pic prématuré de LH, le rajout d'indométhacine pourrait réduire le risque d'ovulation prématurée en empêchant les phénomènes inflammatoires précédant la rupture du follicule. Nous avons ainsi démontré que la simple utilisation d'indométhacine pouvait être utilisée concomitamment aux antagonistes de la GnRH. On utilise ainsi deux mécanismes différents mais synergiques pour augmenter le taux de récupération ovocytaire par ponction. L'indométhacine est débutée à la dose de 50 mg TID le même jour que l'antagoniste de la GnRH mais sera poursuivie un jour de plus, soit le lendemain du déclenchement de l'ovulation (16).

Éthinylœstradiol

Dans le cas particulier d'une patiente présentant une déficience ovarienne avérée avec un cycle menstruel d'une longueur inférieure à 26 jours et une FSH de base tonique, qui accélère la croissance folliculaire, le risque d'ovulation prématurée est encore plus important. En effet, le recrutement prématuré d'un follicule de 12 mm en début de phase folliculaire sera certainement associé à un asynchronisme de maturation endométriale. Comme le suggère de Ziegler, il peut parfois être judicieux de ralentir cette croissance folliculaire en prescrivant un contraceptif oral ou des œstrogènes en phase lutéale tardive du cycle précédent pour réduire l'amplitude de la FSH en phase lutéale

tardive (17). Avec cette même logique, à la clinique OVO, nous prescrivons de l'éthinylœstradiol à la dose orale de 4 mg pendant 2 jours en début de phase folliculaire.

Protocole de la clinique OVO

Monitoring (fig. 2)

Un monitoring exclusivement échographique débute au huitième jour du cycle pour une patiente ayant des cycles réguliers de 28 à 30 jours. La patiente sera vue plus tôt si la brièveté de ses cycles le justifie. Une échographie vaginale permettant une étude précise des ovaires et de l'endomètre est réalisée. Une étude du doppler des artères utérines complètera l'examen en cas de discordance entre la taille du follicule dominant et une épaisseur endométriale insuffisante. L'expectative est de mise tant et aussi longtemps que le diamètre folliculaire moyen n'a pas atteint 15 mm. Lorsque le follicule dominant atteint le diamètre moyen de 15 mm et que l'endomètre atteint une épaisseur de plus de 6 mm, on introduit du cetrorelix ou du ganirelix à la dose quotidienne de 0,25 mg associé à 150 UI

quotidiennes d'hMG. L'indométhacine est débutée le même jour que l'antagoniste de la GnRH mais sera poursuivie un jour de plus, soit le lendemain du déclenchement de l'ovulation qui est assuré par une injection de 5 000 UI d'hCG lorsque le follicule atteint le diamètre moyen de 18 mm.

Prélèvement ovocytaire

Des adaptations simples du prélèvement ovocytaire optimisent son rendement. Il a lieu 34 heures après le déclenchement de l'ovulation. Le geste effectué sans anesthésie est bien toléré par les patientes. Un antalgique administré par voie orale et un léger sédatif peuvent être prescrits en préopératoire. L'usage est de vérifier échographiquement la présence du follicule juste avant que la patiente ne se rende en salle d'intervention. En début de procédure, on rappellera systématiquement à la patiente le risque de ponction blanche inhérent à la technique. Un assistant devra maintenir l'ovaire en place en exerçant une pression sus-pubienne qui sera poursuivie le temps que durera la procédure. Afin d'éviter tout choc thermique pour l'ovocyte, on aspirera le contenu d'un tube contenant du milieu de culture (*follicular flush buffer* de Cook, Australie) préchauffé avant de procéder au prélè-

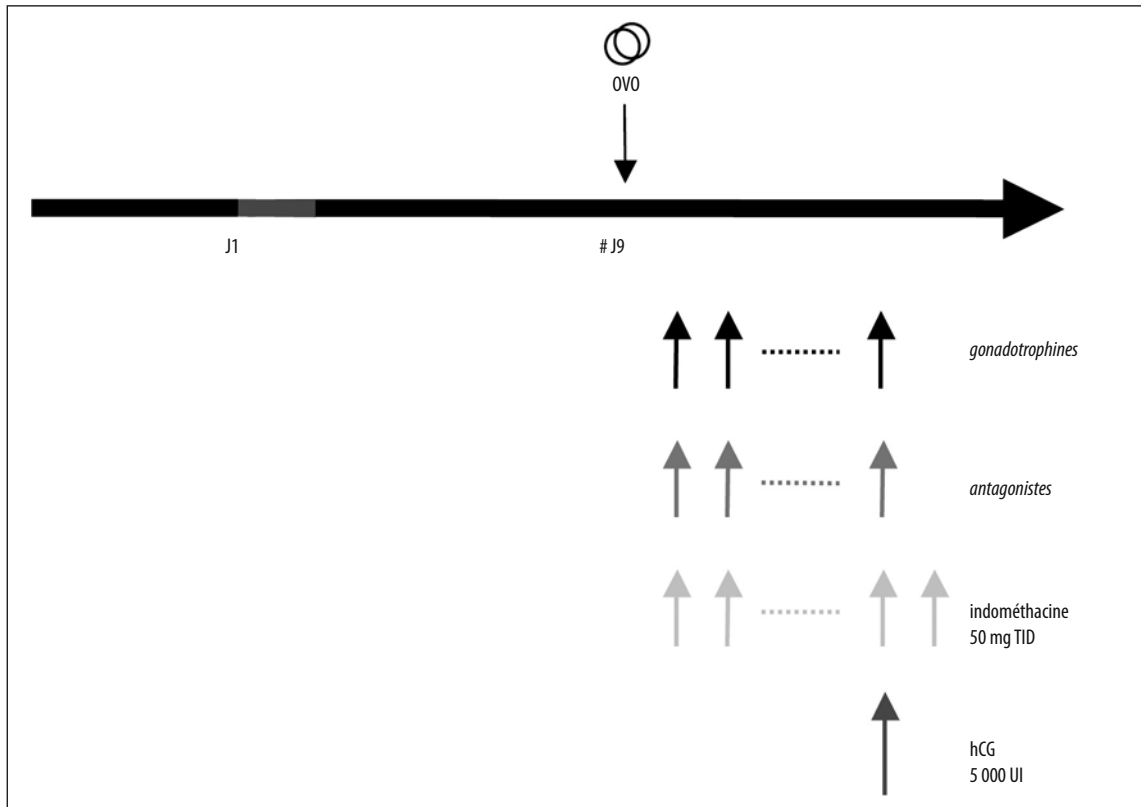


Fig. 2 – Monitoring.

vement. On utilisera une aiguille à double courant plutôt que de simples seringues afin de réduire le risque de mouvement inadéquat de l'aiguille ainsi que le risque de fracture de la zone pellucide lors de la procédure. La ponction avec rinçage dure en moyenne moins de 5 minutes.

La ponction doit être accompagnée d'un rinçage folliculaire et d'un examen extemporané par un embryologiste en contact avec la salle de prélèvement. Un rinçage folliculaire avec du milieu de culture sera poursuivi tant que l'on n'aura pas récupéré l'ovocyte et surtout tant que l'embryologiste retrouve des cellules de la granulosa dans le liquide d'aspiration. Bar-Hava rapporte en moyenne l'obtention du cumulus au deuxième lavage (18). Il n'est pas rare de retrouver l'ovocyte après de multiples rinçages, bien que certaines publications montrent qu'au-delà de quatre rinçages seulement 3 % d'ovocytes soient récupérés (19). En pratique, le prélèvement sera interrompu lorsque le follicule perdra son étanchéité, rendant le rinçage impossible. Les résultats d'une étude originale de Méndez-Lozano confirment l'importance de la pratique du rinçage folliculaire en FIVn. Les ovocytes obtenus dans le liquide de rinçage folliculaire auraient un potentiel reproductif similaire à ceux obtenus dans le liquide folliculaire (20).

Soutien de la phase lutéale

Le soutien de la phase lutéale ne semble pas obligatoire en FIVn puisque les taux de grossesse sont équivalents avec ou sans apport de progestérone (21). Cependant, nous recommandons un apport de progestérone micronisée qui sera poursuivi en

cas de grossesse tout le long du premier trimestre. Une couverture antibiotique et un ajout d'aspirine sont prescrits, sauf contre-indication, à nos patientes en FIVn, bien qu'il n'existe pas d'évidence solide en faveur de leur prescription. Un soutien de la phase lutéale par des œstrogènes sera en revanche fortement déconseillé en FIVn (fig. 3).

Considération particulières en embryologie

Afin d'optimiser le recueil ovocytaire, le liquide folliculaire ainsi que le liquide de rinçage devront être conservés tant que l'ovocyte n'aura pas été récupéré. Au besoin, les échantillons seront vérifiés une deuxième fois avant d'être détruits. Pour Hamamah, une centrifugation pourrait même être réalisée pour faciliter la recherche de l'ovocyte (22).

L'ovocyte sera inséminé de manière conventionnelle ou par ICSI en fonction de l'indication. Nous recommandons cependant l'usage d'une ICSI systématique lorsque l'infertilité est inexplicée. Certains auteurs, comme Morgia, prônent l'ICSI systématique pour limiter le risque de non-fécondation et maximiser les chances d'obtenir un embryon à transférer (23).

En cas d'infertilité masculine, la sélection du spermatozoïde est importante. Des techniques particulières telles que l'IMSI, le *halosperm* permettant une étude de la fragmentation de l'ADN spermatique ou la sélection par biréfringence plaisent à l'esprit. L'évaluation de leur intérêt en FIVn est en cours.

L'embryon obtenu est transféré au deuxième jour après le prélèvement ovocytaire. En effet, dans un

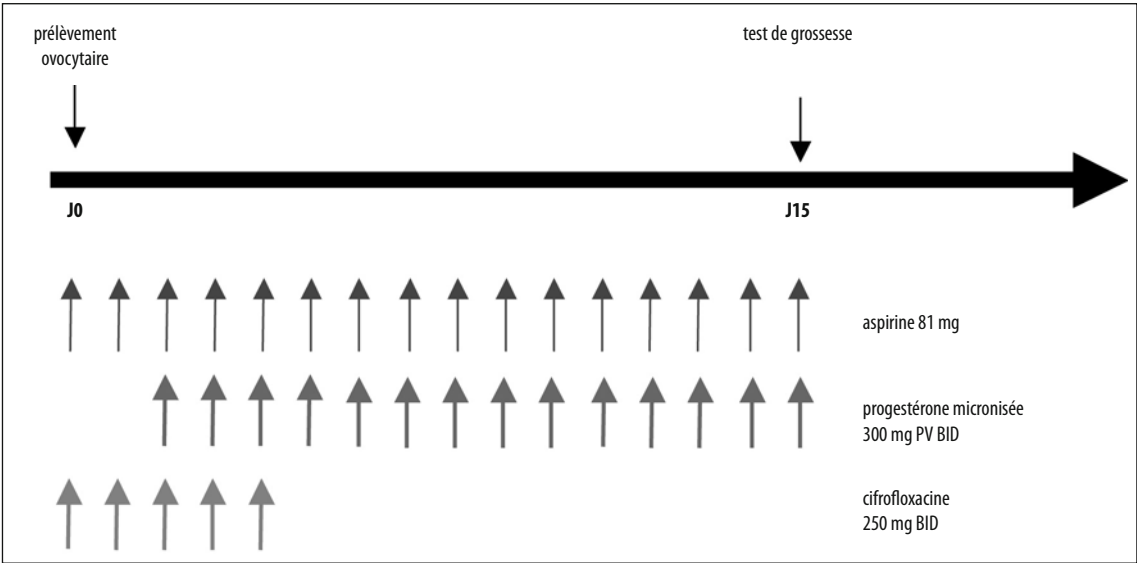


Fig. 3 – Soutien de la phase lutéale.

contexte de FIVn, la notion de sélection embryonnaire au laboratoire disparaît et il est logique d'organiser le transfert le plus tôt possible. L'avis de Trokoudes est différent et il obtient des taux d'implantation remarquables de 53,3 % en transférant des blastocystes issus de FIVn (24). L'éclosion assistée sera effectuée selon les indications retenues par le centre sans spécificité pour la FIVn.

On notera une qualité ovocytaire et embryonnaire souvent meilleure en FIVn qu'en FIVs. L'ovocyte en FIVn est le produit d'une sélection naturelle survenue au cours de la phase de recrutement folliculaire. Le postulat admis et souvent repris sans preuve expérimentale qu'un ovocyte stimulé serait de qualité moindre semble enfin avoir trouvé récemment quelques explications. Ainsi, une augmentation anormale de l'apoptose dans les cellules de la granulosa est retrouvée après une stimulation ovarienne (25). Aussi, des études en cours démontreraient que l'expression génique des cellules de la granulosa serait également plus favorable en FIVn.

Sélection des patientes et indications particulières

Proposée par défaut, au début de l'ère de la FIV, la FIVn a regagné ses lettres de noblesse et demeure une option à considérer en cas d'antécédent de mauvaise réponse. Il faut savoir proposer un cycle de FIVn mais aussi sélectionner les patientes à qui le proposer. La FIVn peut être offerte pour tout

type d'indications mais ouvre aussi de nouvelles perspectives dans des indications particulières.

Importance de l'âge

L'âge constitue un critère de succès essentiel et un facteur pronostique important. Dans la littérature, un âge élevé est associé systématiquement à des résultats plus péjoratifs. Notre expérience retrouve un taux de grossesse de 27 % pour les patientes de moins de 35 ans. Les résultats chutent à 8 % au-delà de ce seuil. En revanche, chez ces patientes âgées de plus de 35 ans, la possibilité de transférer plus d'un embryon en FIVs conduit à des taux de grossesse clinique de 37 %. On remarquera qu'en FIVs, des taux de grossesse de 53 % et de 44 % chez des patientes âgées respectivement de moins de 31 ans et entre 31 et 34 ans, mais au prix de plus de 35 % de grossesses multiples. Cette diminution des taux d'implantation avec l'âge de la femme s'expliquer peut-être par l'augmentation des aneuploïdies (26). Nous déconseillerons donc la FIVn aux patientes de plus de 35 ans (tableaux I et II).

Notons que pour certains auteurs comme Bar-Hava, la FIVn pourrait même être proposée aux patients de plus de 44 ans qui veulent tenter une FIV avec leurs propres ovules plutôt que de recourir au don d'ovocyte (27). Weghofer propose pour les patientes de plus de 40 ans, avec une FSH élevée, une FIVn modifiée comportant l'introduction quotidienne de 0,25 mg de cetrorelix et de 75 UI de rFSH, lorsque le follicule dominant atteint

Tableau I – Résultats de la FIV en cycle naturel contrôlé (FIVn).

	Âge du patient (années)		
	< 31	31–34	35–38
Nombre de cycles	44	90	108
Nombre de transfert embryonnaire	26	49	52
Cycles avec transfert embryonnaire (%)	59	54	48
Cycles sans ovocyte récupéré (%)	23	24	32
Cycles avec échec de fécondation (%)	18	21	19
Nombre de grossesses cliniques	7	13	4
Taux de grossesses cliniques par transfert embryonnaire (%)	27	27	8

Tableau II – Résultats de la FIV en cycle stimulé (FIVs).

	Âge du patient (années)		
	< 31	31–34	35–38
Nombre de cycles	145	225	240
Nombre de transfert embryonnaire	139	216	220
Cycles avec transfert embryonnaire (%)	96	96	92
Nombre de grossesses cliniques	74	94	81
Taux de grossesses cliniques par transfert embryonnaire (%)	53	44	37
Taux de grossesse multiple (%)	38	35	36
Nombre moyen d'embryons transférés	2,1	2,2	2,6

13 mm, jusqu'au déclenchement de l'ovulation par 10 000 UI d'hCG à 18 mm (28).

Choix de bienvenue

La FIVn s'inscrit dans un nouveau paradigme de traitement plus doux avec le souci de diminuer les doses de traitement, de réduire les complications, tout en préservant de réelles chances de grossesse par une approche plus physiologique. Ainsi, la FIVn peut constituer un choix de bienvenue (*welcome choice* des Anglo-Saxons). Elle s'adresse alors à des couples qui la choisissent pour des raisons économiques. Parfois, le couple peut souhaiter une approche la plus naturelle qui soit ou enfin peut vouloir légitimement avoir recours à une technique légère associée à des risques faibles.

Indication médicale

Mauvaises répondeuses

Une mauvaise répondeuse est souvent définie comme une femme de moins de 38 ans ayant eu des antécédents d'annulation malgré un protocole de stimulation ovarienne avec des doses de FSH atteignant 300 UI quotidiennes ou ayant des marqueurs biologiques ou échographiques de déficience ovarienne.

La FIVn est certainement une alternative simple, à bas risque et peu coûteuse, chez les femmes de moins de 35 ans avec une réserve ovarienne extrêmement basse. La FIVn a ainsi l'avantage de procurer un ovocyte de bonne qualité et de permettre un transfert sur un endomètre dont la réceptivité n'a pas été perturbée par les effets délétères d'une stimulation agressive. On obtient des résultats très intéressants en évitant le coût et les désagréments d'une stimulation ovarienne (29, 30).

Échecs d'implantation

De nombreuses équipes retrouvent un taux d'implantation souvent meilleur en FIVn qu'en FIVs. Le rationnel de proposer de manière *a priori* paradoxale une FIVn à une patiente qui a expérimenté plusieurs échecs en FIVs s'appuie sur le principe discuté plus haut d'une sélection naturelle d'un ovocyte de meilleure qualité et de l'amélioration de la réceptivité endométriale. La FIVn supprimerait les effets délétères de la stimulation ovarienne, notamment une avance de maturation endométriale due à des taux supra-physiologiques d'œstradiol et de progestérone. Pour Lédée-Bataille, la FIVn doit être proposée lorsque l'échec d'implantation s'explique par un profil immunologique utérin comportant une trop forte expression en lymphocytes NK CD56 lorsque

l'endomètre est exposé à des doses supraphysiologiques d'œstradiol (31, 32).

Infertilité masculine sévère

La FIVn peut être une alternative judicieuse en cas d'infertilité masculine sévère telle que les cryptozoospermies, situation où l'on craint parfois d'avoir plus d'ovocytes que de spermatozoïdes le jour du prélèvement ovocytaire. La FIVn a aussi une place de choix dans le contexte particulier d'une deuxième union lorsque le conjoint a été vasectomisé. En effet, on est souvent face à un homme qui a déjà conçu antérieurement, plus âgé que sa conjointe et refusant l'idée d'une grossesse gémellaire. La FIVn est alors réalisée avec du sperme prélevé à l'aiguille dans l'épididyme (PESA) (33).

Préservation de la fertilité

La FIVn doit être envisagée par une patiente présentant un cancer hormonosensible ou qui doit subir une chimiothérapie gonadotoxique. Ainsi, plusieurs cycles de FIVn avec une congélation des embryons peuvent être réalisés chez une patiente qui doit attendre une rémission de plusieurs années avant de se voir autoriser une grossesse (34).

Dans la même logique, la FIVn doit être proposée en cas d'indication de FIV chez une patiente porteuse de la prédisposition de type BRCA, ayant un risque génétique de développer un cancer du sein ou de l'ovaire. La FIVn permet d'éviter dans ce contexte toute stimulation inutile (35).

Don d'ovocyte

Dans le but d'éviter une stimulation ovarienne chez une donneuse, la FIVn a été utilisée avec succès. La FIVn pourrait être une solution pour faciliter le recrutement de donneuses dans le contexte de pénurie qui prévaut dans de nombreux pays (36).

Ovaires polykystiques

Les patientes porteuses d'ovaires polykystiques, *a priori*, ne sont pas de bonnes candidates à la FIVn puisque leurs cycles menstruels sont souvent irréguliers, rendant le monitoring plus complexe. Chian propose de réaliser une maturation *in vitro* des ovocytes immatures prélevés au cours d'un cycle de FIVn, mais cette approche particulière semble compliquer de manière inutile une procédure simple (37). En revanche, on peut envisager de convertir un cycle de maturation *in vitro* en FIVn lorsqu'un follicule dominant se développe de manière inattendue (38).

Transfert d'embryons congelés

Kim propose de manière originale de combiner une FIVn à un transfert d'embryons congelés.

Cette solution pourrait être envisagée lorsqu'il ne reste qu'un seul embryon congelé. Dans ce contexte, un double transfert doit être réalisé lorsque l'embryon a été congelé au stade de blastocyste (39).

Expression des résultats

La simplicité relative de la FIVn permet sa répétition sur des cycles consécutifs et oriente vers une expression des résultats en termes de taux de grossesse cumulés. Ainsi, les taux de grossesse cumulés après trois tentatives rejoignent ceux retrouvés après un cycle de FIVs. Pour Nargund (40), les taux de grossesse cumulés en FIVn atteignent un plateau de 46 % avec 32 % de naissances d'enfants vivants après quatre cycles de traitement (fig. 4).

Pour Pelinck, un taux de grossesse cumulé de 44,4 % est obtenu après 9 cycles, sachant que les patientes ont effectué en moyenne 4,1 cycles. Ces résultats sont remarquables, d'autant plus qu'ils sont obtenus avec des taux de grossesse par cycle initié de 7,9 % et par transfert embryonnaire de 20,7 % (41).

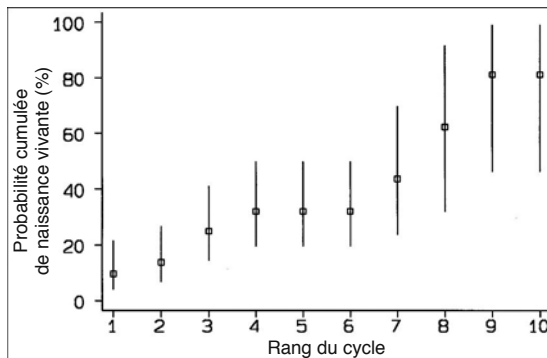


Fig. 4 – Taux de grossesse cumulés en FIVn.

Facteur économique et social

En termes de santé publique, il faut aussi bien intégrer le coût d'une tentative et de la médication associée, mais aussi ceux liés aux risques d'hyperstimulation ovarienne et de grossesses multiples. Les protocoles de FIVs permettent de réduire le nombre de tentatives interrompues, mais ils aboutissent à une augmentation des doses de médicaments utilisés, entraînant une augmentation des effets secondaires, notamment des syndromes d'hyperstimulation ovarienne. En même temps que le recours à la FIV augmente, avec notamment l'élargissement des indications, des questions se

posent sur le coût financier, social et psychologique des différentes techniques ou des différents protocoles proposés. Dans ce contexte, la FIVn pourrait être pour Shahin, une option particulièrement intéressante dans les pays en voie de développement (42).

Pour les mauvaises répondeuses, selon Ubaldi, le coût estimé d'une tentative de FIVn est de 1 550 euros contre 6 050 euros dans le cas d'une FIVs. Selon un modèle hypothétique, il part du postulat d'un taux de grossesses stables sur quatre cycles consécutifs de 12,6 % en FIVn et de 8,4 % en FIVs, et conclut qu'à coût égal, les patientes du groupe FIVn auraient un taux de grossesse cumulé de 40 % contre 8 % dans le groupe FIVs (43).

Il y a de bonnes raisons de croire que le transfert d'un embryon unique devienne la norme internationale dans un futur proche. Cette tendance est clairement visible, notamment dans les pays d'Europe du Nord comme la Belgique et la Suède. Ainsi, la FIVn devient plus judicieuse, à l'heure d'une évolution des pratiques vers des protocoles moins agressifs, et d'une logique de réduction des coûts de santé publique. La place de la FIVn dans ce contexte ne pourra être que plus importante.

L'ensemble de ces arguments plaide donc pour une prise en charge différente des tentatives de FIV selon qu'elle est réalisée en cycle naturel ou avec une stimulation ovarienne. Il paraît logique que les autorités sanitaires acceptent la prise en charge d'une série de trois ou quatre tentatives de FIVn pour une tentative de FIVs. Sinon, on assistera à un nouveau délaissement de la FIVn.

Conclusion

Avec le perfectionnement des milieux de culture, les progrès des techniques et de l'équipement des laboratoires, les résultats ont eu tendance à s'améliorer et ce, probablement, grâce à une qualité embryonnaire meilleure. Ainsi, la FIVn peut désormais faire partie de manière raisonnable de l'arsenal thérapeutique moderne de l'infertilité.

Les indications de la FIVn se précisent. Cette prise en charge pourrait être une alternative judicieuse, entre autres, pour les jeunes patientes souffrant d'une infertilité dans un contexte de réserve ovarienne diminuée prématurément, mais aussi pour celles qui ont vécu des échecs d'implantation multiples en FIVs.

Le protocole idéal de FIV n'est-il pas celui qui permet l'obtention d'un embryon avec un potentiel implantatoire élevé, à l'origine d'une grossesse unique et le tout avec un niveau d'intervention médicale minimal ?

Références

- Phillips SJ, Kadoch IJ, Lapensée L *et al.* (2007) Controlled natural cycle IVF: experience in a world of stimulation. *Reprod Biomed Online* 14: 356-9
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 737-56
- Olivennes F, Frydman R (1998) Friendly IVF: the way of the future? *Hum Reprod* 13: 1121-4
- Edwards RG (2007) IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF – time for a rethink. *Reprod Biomed Online* 15: 106-19
- Phillips SJ, Kadoch IJ (2007) Natural cycle IVF: a question of semantics? *Reprod Biomed Online* 15: 255-6
- Nargund G, Fauser BC, Macklon NS *et al.* (2007) The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IV; Rotterdam ISMAAR Consensus Group on Terminology for Ovarian Stimulation for IVF. *Hum Reprod* 22: 2801-4
- Pelinc MJ, Keizer MH, Hoek A *et al.* (2010) Perinatal outcome in singletons after modified natural cycle IVF and standard IVF with ovarian stimulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 148: 56-61
- Pistorius EN, Adang EM, Stalmeier PF *et al.* (2006) Prospective patient and physician preferences for stimulation or no stimulation in IVF. *Hum Fertil (Camb)* 9: 209-16
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 737-56
- Salama S, Arbo E, Lamazou F *et al.* (2009) Reproducibility and reliability of automated volumetric measurement of single preovulatory follicles using SonoAFC. *Fertil Steril*
- Lozano DH, Frydman N, Levaillant JM *et al.* (2007) The 3D vascular status of the follicle after hCG administration is qualitatively rather than quantitatively associated with its reproductive competence. *Hum Reprod* 22: 1095-9
- Lenton EA (2007) Natural cycle IVF with and without terminal HCG: learning from failed cycles. *Reprod Biomed Online* 15: 149-55
- Rongieres-Bertrand C, Olivennes F, Righini C *et al.* (1999) Revival of the natural cycles in in-vitro fertilization with the use of a new gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix): a pilot study with minimal stimulation. *Hum Reprod* 14: 683-8
- Kettel LM, Roseff SJ, Chiu TC *et al.* (1991) Follicular arrest during the midfollicular phase of the menstrual cycle: a gonadotropin-releasing hormone antagonist imposed follicular-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 644-9
- Frydman R J (2004) GnRH antagonists in natural cycles. *Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 33: 3S46-9
- Kadoch IJ, Al-Khaduri M, Phillips SJ *et al.* (2008) Spontaneous ovulation rate before oocyte retrieval in modified natural cycle IVF with and without indomethacin. *Reprod Biomed Online* 16: 245-9
- De Ziegler D, Fraisse T, de Candolle G *et al.* (2007) Outlook: Roles of FSH and LH during the follicular phase: insight into natural cycle IVF. *Reprod Biomed Online* 15: 507-13
- Bar-Hava I *et al.* (2000) Natural-cycle in vitro fertilization in women aged over 44 years. *Gynecol Endocrinol* 14: 248-52
- Bagtharia S, Haloob AR (2005) Is there a benefit from routine follicular flushing for oocyte retrieval? *J Obstet Gynaecol* 25: 374-6
- Méndez Lozano DH, Fanchin R, Chevalier N *et al.* (2007) The follicular flushing duplicate the pregnancy rate on semi natural cycle IVF. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 36: 36-41
- Pelinc MJ *et al.* (2002) Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 8: 129-39
- Ferrières A, Reyftmann L, Pellestor F *et al.* (2009) Oocyte recovery post human follicular fluid centrifugation in modified natural cycle and achieving embryo. *Reprod Biomed Online* 18: 671-3
- Morgia F *et al.* (2004) A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 8: 1542-7
- Trokoudes KM, Minbattiwalla MB, Kalogirou L *et al.* (2005) Controlled natural cycle IVF with antagonist use and blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 11: 685-9
- Jancar N, Virant-Klun I, Osredkar J, Vrtacnik Bokal E (2008) Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod Biomed Online* 16: 640-8
- Phillips SJ, Kadoch IJ, Lapensée L *et al.* (2007) Controlled natural cycle IVF: experience in a world of stimulation. *Reprod Biomed Online* 14: 356-9
- Bar-Hava I, Ferber A, Ashkenazi J *et al.* (2000) Natural-cycle in vitro fertilization in women aged over 44 years. *Gynecol Endocrinol* 14: 248-52
- Weghofer A, Margreiter M, Bassim S *et al.* (2004) Minimal stimulation using recombinant follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone antagonist in women of advanced age. *Fertil Steril* 81: 1002-6
- Schimberni M, Morgia F, Colabianchi J *et al.* (2009) Natural-cycle in vitro fertilization in poor responder patients: a survey of 500 consecutive cycles. *Fertil Steril* 92: 1297-301
- Ata B, Yakin K, Balaban B, Urman B (2008) Embryo implantation rates in natural and stimulated assisted reproduction treatment cycles in poor responders. *Reprod Biomed Online* 17: 207-12
- Lédée-Bataille N, Dubanchet S, Kadoch IJ *et al.* (2004) Controlled natural in vitro fertilization may be an alternative for patients with repeated unexplained implantation failure and a high uterine natural killer cell count. *Fertil Steril* 82: 234-6
- Kadoch IJ (2004) Natural cycle IVF (nIVF) in women with implantation failure. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 33: S33-5
- Kadoch IJ, Phillips SJ, Hemmings R *et al.* (2005) Ongoing pregnancy after ICSI of frozen-thawed PESA-retrieved spermatozoa and IVF in a controlled natural cycle. *Reprod Biomed Online* 10: 650-2
- Brown JR, Modell E, Obasaju M, King YK (1996) Natural cycle in-vitro fertilization with embryo cryopreservation prior to chemotherapy for carcinoma of the breast. *Hum Reprod* 11: 197-9
- Hirt R, Davy C, Guibert J, Olivennes F (2008) Pregnancy after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection obtained with a modified natural cycle in a BRCA1 mutation carrier. *Fertil Steril* 90: 1199 e25-8
- Jamal W, Phillips SJ, Hemmings R *et al.* (2009) Successful pregnancy following novel IVF protocol and transmyometrial embryo transfer after radical vaginal trachelectomy. *Reprod Biomed Online* 18: 700-3
- Chian RC, Buckett WM, Abdul Jalil AK *et al.* (2004) Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertil Steril* 82: 1675-8
- Kadoch IJ, Fanchin R, Frydman N *et al.* (2007) Controlled natural cycle IVF: a novel approach for a dominant follicle during an in-vitro maturation cycle. *Reprod Biomed Online* 14: 598-601
- Kim SH, Kim CH, Suh CS *et al.* (1996) Simultaneous program of natural-cycle in vitro fertilization and cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 13: 716-21

-
40. Nargund G, Waterstone J, Bland J *et al.* (2001) Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. *Hum Reprod* 16: 259-62
 41. Pelinck MJ, Vogel NE, Arts EG *et al.* (2007) Cumulative pregnancy rates after a maximum of nine cycles of modified natural cycle IVF and analysis of patient drop-out: a cohort study. *Hum Reprod* 22: 2463-70
 42. Shahin AY (2007) The problem of IVF cost in developing countries: has natural cycle IVF a place? *Reprod Biomed Online* 15: 51-6
 43. Ubaldi F, Rienzi L, Baroui E *et al.* (2004) Natural cycles with minimal stimulation in poor responder patients: cost-effectiveness analysis. *Human Reprod* 19 (Suppl 1): 8

L. Dessolle

Ponction ovarienne : indications, aspects techniques et complications

Introduction

La ponction ovarienne permet le recueil des gamètes féminins en vue d'une assistance médicale à la procréation (AMP). Nous réalisons aujourd'hui une majorité de ponctions ovariennes programmées, par voie vaginale sous écho-guidage, après stimulation multifolliculaire, pour recueillir des ovocytes matures. Dans des indications spécifiques, en vue d'une maturation *in vitro*, la ponction ovarienne peut être réalisée en cycle spontané pour recueillir des ovocytes immatures. Réalisée en ambulatoire au bloc opératoire, sous anesthésie locale ou sous anesthésie générale légère, la technique est simple, standardisée et ses complications hémorragiques, infectieuses ou traumatiques, sont rares.

Historique

Réalisés initialement sous anesthésie générale par laparotomie puis rapidement sous coelioscopie, les recueils d'ovocytes humains en vue d'une maturation et fécondation *in vitro* sont devenus rapidement une pratique routinière (1). Cependant, l'acidification délétère du liquide folliculaire par le dioxyde de carbone utilisé pour le pneumopéritoine (2), ainsi que les risques inhérents à l'anesthésie et à la coelioscopie conduisirent à la recherche de techniques moins invasives. Les premières ponctions échoguidées ont été rapportées au début des années 1980 : par voie abdominale transvésicale (3), par voie transvésicale *via* l'urèthre (4), par voie vaginale avec guidage échographique abdominal puis vaginal (5-8). La ponction à l'aide d'un guide monté sur une sonde d'échographie vaginale est aujourd'hui la technique de référence mais les autres voies peuvent être utiles dans des cas spécifiques.

Indications

L'indication principale de la ponction ovarienne est le recueil d'ovocytes matures après stimulation multifolliculaire, en vue d'une fécondation *in vitro*.

Ces dernières années, la maturation *in vitro*, la fécondation *in vitro* en cycle naturel et des protocoles de stimulation modérée ont fait l'objet d'un nombre croissant de publications. La maturation *in vitro* est utilisée essentiellement chez les patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (9) mais aussi en vue d'une cryoconservation ovocytaire, pour préserver la fertilité de patientes devant subir des traitements potentiellement stérilisants (10). Dans ces indications, la ponction présente quelques particularités techniques.

Enfin, la ponction ovarienne est utilisée en cours de stimulation par certains auteurs pour traiter un syndrome d'hyperstimulation ovarienne débutant (11).

Aspects techniques

Organisation et dispositions réglementaires

En France, les ponctions ovariennes en vue d'une assistance médicale à la procréation doivent être réalisées dans un centre autorisé et par un praticien personnellement agréé pour ce geste par l'Agence de biomédecine.

Le couple, ayant satisfait aux obligations administratives et sanitaires, aura donné son accord écrit. Ce consentement éclairé suppose une information bien comprise, qui mérite d'être répétée au cours des consultations et complétée par des documents écrits institutionnels. La majorité des équipes organise de plus des réunions d'information pour les couples, à l'aide de supports audiovisuels.

La ponction est réalisée au bloc opératoire, idéalement dans une salle dédiée, contiguë au laboratoire de biologie de la reproduction et communiquant avec lui par une ouverture permettant de transmettre immédiatement les prélèvements aux biologistes. Des altérations irréversibles du fuseau méiotique pouvant survenir en cas de refroidissement de l'ovocyte (12), il est important de maintenir les liquides folliculaires à une température proche de 37° C. Si le laboratoire est distant du bloc de ponction, les prélèvements sont mis à l'étuve et transportés rapidement dans un conteneur isotherme.

La table d'opération doit permettre la position gynécologique et les adaptations en hauteur et en inclinaison qui peuvent être nécessaires en fonction des cas. Un échographe avec sonde abdominale et vaginale est nécessaire. La protection et la désinfection des sondes endocavitaires ont fait l'objet d'une note technique publiée par le Collège national des gynécologues obstétriciens français (13), d'après les règles d'hygiène proposées par le Haut Conseil de santé publique. Un protocole mérite d'être rédigé et diffusé dans chaque établissement en collaboration avec le comité local de lutte contre les infections nosocomiales. Un registre doit être tenu, assurant la traçabilité des mesures d'hygiène prises quotidiennement. On utilise une gaine de protection stérile à usage unique et du gel échographique stérile en conditionnement individuel (Circulaire DH/EM n° 96479 du 6 février 1996).

Éviter toute confusion entre les gamètes de couples différents est une préoccupation de tous les instants. La rigueur est requise dans la programmation de l'ordre des ponctions, la vérification répétée des identités et l'étiquetage des prélèvements.

Ponction après stimulation multifolliculaire

Planification de la ponction

La plupart des centres d'assistance médicale à la procréation tentent de réguler l'activité de ponction afin d'éviter une surcharge de travail préjudiciable certains jours et afin de pas ponctionner les jours fériés. La flexibilité des protocoles permet de choisir la date de début de la stimulation, de prévoir la semaine où la ponction sera réalisée et d'essayer de lisser l'activité chaque semaine.

L'objectif étant d'obtenir le maximum d'ovocytes matures et d'intervenir avant la rupture folliculaire, la ponction est réalisée 34 à 36 heures après le déclenchement de l'ovulation par hCG ou le pic ovulatoire de LH (14, 15). Ceci conduit à programmer l'heure de l'injection d'hCG par la patiente en fonction de l'horaire de passage prévu au bloc opératoire.

Anesthésie pour la ponction ovocytaire

La ponction ovarienne est le geste le plus douloureux au cours de la fécondation *in vitro*, chez des patientes souvent anxieuses et stressées. Une consultation d'anesthésie aura été organisée au moins 48 heures avant le geste. La ponction ovarienne peut être réalisée sous anesthésie locale ou locorégionale, sous acupuncture, sous analgésie contrôlée par la patiente, sous sédation, sous anesthésie générale ou l'association de plusieurs de ces techniques (16). La méthode anesthésique de choix reste discutée, aucune n'ayant démontré sa supériorité (17). Une anesthésie locale par bloc paracervical s'accompagne d'un bon contrôle de la douleur chez des patientes motivées (18). Dans une étude randomisée, l'injection vaginale et péri-ovarienne échoguidée de l'anesthésique local n'était pas supérieure au bloc paracervical (19). Aucun effet délétère des anesthésiques locaux sur les résultats de la fécondation *in vitro* n'a été observé (17). L'association d'une benzodiazépine intraveineuse apparaît supérieure à l'anesthésie locale seule (20, 21). La sédation consciente est actuellement la technique la plus répandue pour les ponctions ovariennes (17). Le propofol, associé à un morphinique et à une benzodiazépine, est très utilisé, en petits bolus assurant une sédation consciente avec maintien de la ventilation spontanée. Les effets du propofol sur la qualité ovocytaire, l'interaction gamétique, la fécondation et le développement embryonnaire ont été bien évalués chez la souris (22-24). Le passage et l'accumulation dans le liquide folliculaire ont été évalués spécifiquement chez la femme (25, 26) : les ovocytes ponctionnés en début d'intervention (environ 3 minutes après l'induction) et ceux ponctionnés en fin d'intervention (après environ 20 minutes d'exposition) ont montré le même pronostic après fécondation *in vitro* et transfert embryonnaire (27). Comparée à l'anesthésie locale dans une étude cas-témoins, l'anesthésie au propofol pour la ponction s'accompagnait de résultats identiques après fécondation *in vitro* (28). Intéressant de par sa pharmacocinétique qui permet une induction et un réveil rapides, le propofol présente de plus des effets antalgiques et antiémétiques. La douleur qu'il provoque au point d'injection est atténuée par l'administration première du morphinique, voire d'un anesthésique local et par le rinçage du cathéter (16).

Certains gaz anesthésiques (protoxyde d'azote, iso-flurane) sont toxiques pour l'ovocyte ou l'embryon et sont proscrits (16). Dans un travail expérimental chez la souris, la supplémentation des milieux de culture avec du sérum de patientes anesthésiées avec du protoxyde d'azote et de l'isoflurane était préjudiciable pour le développement embryonnaire (29). Plusieurs études comparant les résultats en fécondation *in vitro* en fonction du type d'anesthésie lors de la ponction ont montré que l'utilisation d'une anesthésie

générale avec du protoxyde d'azote ou de l'isoflurane altérerait les taux de grossesses, en comparaison avec l'anesthésie péridurale ou le bloc paracervical (30), et en comparaison avec une anesthésie générale sans ces gaz anesthésiques (29, 31). De plus, le protoxyde d'azote est tératogène chez l'animal (32).

Matériel

On peut utiliser des kits de ponction à usage unique ou du matériel stérilisable comprenant un spéculum, une pince languette, un guide de ponction adaptable sur la sonde d'échographie et une cupule. Les aiguilles de ponction utilisées ont le plus souvent un diamètre de 17-18 Gauge (33) et une longueur de 300 mm ; elles sont sablées pour être mieux visibles par échographie. La désinfection périnéale et vaginale est réalisée à la chlorhexidine ou dans de nombreux centres à la polyvidone iodée (Bétadine®). Pour l'antisepsie vaginale, la Bétadine® a été comparée au sérum physiologique dans une étude randomisée de 334 ponctions : si les taux de fécondation et de clivage étaient comparables dans les deux groupes, le taux de grossesse clinique par transfert était significativement supérieur dans le groupe où la toilette vaginale avait été faite au sérum physiologique (30,3 %) que dans le groupe Bétadine® (17,2 %), sans différence de risque infectieux entre les deux groupes (34). Dans une autre étude randomisée plus récente, rincer le vagin avec du sérum physiologique en cas de désinfection à la Bétadine® avait un impact positif sur les taux de grossesse (35).

Le prélèvement se fait à la seringue ou à l'aide d'un système de recueil branché sur l'aspiration murale. Le système de recueil est stocké à l'étuve et rincé avec du milieu de culture. L'aspiration doit être douce, une pression trop élevée pouvant provoquer des cassures de la zone pellucide (36).

Déroulement

La patiente et le personnel doivent respecter les règles d'hygiène prévalant au bloc opératoire. Après vérification d'identité, la patiente est préparée en vue de l'anesthésie puis installée en position gynécologique. Après lavage chirurgical des mains, la personne réalisant la ponction revêt une casaque et des gants stériles. Une désinfection du périnée et de la vulve est réalisée, des champs stériles sont mis en place. L'antisepsie du vagin est faite sous spéculum. La sonde d'échographie est recouverte d'une protection stérile contenant du gel stérile pour échographie. Le guide de ponction est mis en place sur la sonde. En cas d'anesthésie locale, un bloc paracervical est réalisé, par injection de 10 mL de Xylocaïne® à 1 % à 4 heures et 8 heures. Les réglages de l'échographe sont vérifiés et les ovaires repérés. Un sondage vésical est réalisé si nécessaire. Un changement de gants peut être réalisé.

La sonde vaginale est placée au plus près de l'ovaire le plus accessible, la ligne de ponction dans l'axe du follicule à ponctionner. L'aiguille est poussée dans guide et suivie sur l'écran de l'échographe jusqu'à sa pénétration dans le follicule, dont le contenu est aspiré en totalité, en mobilisant si nécessaire l'aiguille pour cela. Certaines équipes transmettent le liquide de ponction au biologiste follicule par follicule afin de rechercher immédiatement la présence de l'ovocyte. En l'absence de celui-ci, un lavage folliculaire peut être réalisé avec quelques millilitres de milieu de culture. Des études randomisées montrent que le rinçage n'améliore ni le rendement de la ponction, ni les taux de fécondation et de grossesse mais qu'il augmente la durée de la procédure en cas de ponction multifolliculaire chez les normo-répondeuses (37-38) et chez les mauvaises répondeuses (39). Le rinçage pourrait être utile en cycle spontané, en stimulation modérée (40) et dans le cas de la maturation *in vitro* (41). D'autres opérateurs ponctionnent plusieurs follicules par seringue. Les prélèvements sont réalisés de proche en proche, en évitant si possible de ressortir l'aiguille de l'ovaire à chaque fois, pour limiter le nombre d'impacts sur l'organe. La ponction des follicules de moins de 10-12 mm est peu rentable : elle donne moins de 20 % d'ovocytes matures, dont la qualité semble inférieure à celle des ovocytes issus de follicules > 18 mm (42). Lorsque les ovaires sont haut situés, la pression abdominale par un aide peut être utile pour rapprocher l'ovaire de la sonde. Il faut être prudent si la distance entre le cul-de-sac vaginal et l'ovaire est importante, chez des patientes avec des antécédents pelviens chirurgicaux, infectieux ou endométriosiques. Le passage de l'aiguille à travers l'utérus peut permettre d'atteindre certains follicules en cas d'ovaire postérieur. Ces situations rares, dépistées au cours de la surveillance de la stimulation, peuvent faire porter l'indication d'une ponction transvésicale *via* l'urètre ou d'une ponction par coelioscopie.

En fin d'intervention, on contrôle qu'il ne persiste aucun follicule susceptible de contenir un ovocyte, qu'il n'y a pas d'hémopéritoine en cours de constitution ni de saignement vaginal anormal. Si la ponction a été réalisée sous anesthésie locale, la sortie est envisageable dans l'heure qui suit ; en cas de ponction le matin sous anesthésie générale, elle est autorisée l'après-midi. Des antalgiques simples sont prescrits et la patiente est informée des signes anormaux nécessitant un avis médical, pour lequel un numéro de téléphone est fourni en cas d'urgence.

Complications

Les complications de la ponction ovarienne sont rares, avec une incidence inférieure à 1 % pour la

voie vaginale échoguidée (43, 44). Les plus fréquentes sont hémorragiques, infectieuses et traumatiques.

Un saignement modéré originaire de la paroi vaginale n'est pas rare après la ponction mais habituellement sans conséquence. À partir de 220 ponctions successives non compliquées, la perte sanguine moyenne à 24 heures a été évaluée à 232 ± 131 mL et la baisse du taux d'hémoglobine à $1,6 \pm 0,8$ g/dL (45). Dans une série prospective de 2 670 ponctions, un saignement vaginal était observé dans 8,6 % mais n'excédait 100 mL que dans 0,8 % des cas (46). Une simple compression locale, l'application d'une mèche, voire la mise en place d'un point de suture, suffisent généralement à régler le problème. Dans une série prospective de 1 049 ponctions, une compression locale était nécessaire dans 2,8 %, un méchage dans 0,1 % et une suture dans aucun cas (47). Un saignement intrapéritonéal est rare, habituellement d'origine ovarienne, exceptionnellement secondaire à une blessure de la veine iliaque, confondue en coupe transversale avec un follicule (46). D'exceptionnels saignements rétropéritonéaux ont été décrits (43). Dans deux études prospectives, deux hémopéritoines sur 2 670 ponctions (0,08 %) et aucun sur 1 049 ponctions ont été observés (46, 47). Dans les séries rétrospectives, des hémorragies intra-abdominales sévères ont été décrites dans 0,02 % à 0,3 % des cas (47), nécessitant une coelioscopie ou une laparotomie dans 0,05 % des cas (48).

La fréquence des infections après ponction ovarienne rapportées dans la littérature n'excède pas 0,6 % (44-47). Elles sont, en général, retardées par rapport à la ponction et peuvent être secondaires à l'introduction de bactéries d'origine vaginale, à la blessure d'une anse intestinale, à la réactivation d'un foyer infectieux pelvien. Dans une série continue de 2 670 ponctions sans antibioprophylaxie, l'incidence d'une infection pelvienne était de 0,6 % dont la moitié d'infections sévères avec abcès ovarien chez des patientes présentant toutes des antécédents pelviens (46). Dans une autre étude prospective de 1 058 cycles sans antibioprophylaxie, aucune infection et aucun abcès n'a été observé alors que la préparation ne comportait pas d'antisepsie vaginale mais un rinçage simple avec du sérum stérile (47). L'effraction d'un endométriome pendant la ponction multiplie par près de trois le risque d'abcès ovarien (49). Chez des patientes sélectionnées dans un programme de don d'ovocytes, aucun cas d'infection n'a été rapporté dans une série rétrospective de plus de 4 000 ponctions (50). La survenue est en général retardée par rapport à la ponction, avec une fièvre, des douleurs, un syndrome inflammatoire voire un tableau de pelvipéritonite. Quelques cas d'abcès révélés en cours de grossesse ont été décrits (51). En fonction

des situations, le traitement peut comporter une antibiothérapie isolée ou nécessiter un drainage chirurgical.

Une blessure des organes de voisinage (vessie, uretère, vaisseaux pelviens, anse intestinale) par l'aiguille de ponction est possible. Aucun cas de lésion intestinale n'a été rapporté par Bennett *et al.* ni par Ludwig *et al.*, néanmoins plusieurs cas d'appendicite perforée ont été décrits, où des orifices de ponctions étaient observés dans l'appendice (43). Sept cas de blessure urétérale ont été rapportés, révélés rapidement ou tardivement par une hydronéphrose (52-54), un urorétropéritoine (55), voire une fistule urétéro-vaginale (56-58).

La prévention des complications des ponctions n'a fait l'objet d'aucun essai clinique mais plutôt de recommandations de bon sens. Rappelons qu'un agrément des praticiens réalisant les ponctions est obligatoire, qui devrait garantir une formation théorique et pratique initiale homogène des internes se destinant à l'AMP. Un interrogatoire rigoureux, une consultation pré-anesthésique et une bonne communication entre les personnes réalisant la stimulation et la ponction devraient permettre d'identifier la majorité des problèmes prévisibles, des patientes à risque hémorragique et des ponctions difficiles pouvant nécessiter une technique particulière. L'antibioprophylaxie a été discutée à titre systématique et chez les patientes à risque, sans avoir fait la preuve de son intérêt. En cas d'anesthésie locale, il convient de vérifier l'absence de reflux vasculaire avant d'injecter la Xylocaïne®. En cours de ponction, limiter le nombre d'impact sur le vagin et l'ovaire contribue probablement à réduire les saignements. L'opérateur entraîné ne se laissera pas tromper en échographie par une veine iliaque en coupe transversale, au contact de l'ovaire, ressemblant à un follicule : une rotation de la sonde suffit à faire le diagnostic différentiel. On évitera de ponctionner un endométriome. On se méfiera s'il existe une distance importante entre la sonde et le follicule à ponctionner. Si la ponction a déjà permis d'obtenir un nombre satisfaisant d'ovocytes, peut-être vaut-il mieux s'arrêter que de vouloir ponctionner à tout prix un dernier follicule d'accès dangereux. En fin de ponction, on vérifiera l'absence d'épanchement péritonéal expansif et l'absence de saignement vaginal.

Références

1. Steptoe PC, Edwards RG (1970) Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1: 683-9
2. Daya S, Wickland M, Nilsson L, Enk L (1987) Effect on fertilization of intra-peritoneal exposure of oocytes to carbon dioxide. *Hum Reprod* 2: 603-6

3. Lenz S, Lauritsen JG, Kjellow M (1981) Collection of human oocytes for in vitro fertilization by ultrasonically guided follicular puncture. *Lancet* 1: 1163-4
4. Parsons J, Riddle A, Booker M *et al.* (1985) Oocyte retrieval for in-vitro fertilization by ultrasonically guided needle aspiration via the urethra. *Lancet* 1: 1076-7
5. Gleicher N, Friberg J, Fullam N, Siegel I (1983) Egg retrieval for in-vitro fertilization by sonographically controlled vaginal culdocentesis. *Lancet* 1: 508-9
6. Dellenbach P, Nisand I, Moreau L *et al.* (1984) Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 1: 1467
7. Feichtinger W, Kemeter P (1986) Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration in gynecologic routine and research. *Fertil Steril* 45: 722-5
8. Wickland M, Enk L, Hammarberg K, Nilsson L (1987) Use of a vaginal transducer for oocyte retrieval in an IVF/ET program. *J Clin Ultrasound* 15: 245-51
9. Chian RC, Lim JH, Tan SL (2004) State of the art in in-vitro maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16: 211-9
10. Dessolle L, de Larouzière V, Ravel C *et al.* (2009) Congélation lente et vitrification des ovocytes humains matures et immatures. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 712-9
11. Zhu WJ, Li XM, Chen XM, Zhang L (2005) Follicular aspiration during the selection phase prevents severe ovarian hyperstimulation in patients with polycystic ovary syndrome who are undergoing in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122: 79-84
12. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH *et al.* (1990) Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 54: 102-8
13. Collège national des gynécologues et obstétriciens français (2009) Protection et désinfection des sondes d'échographie endocavitaire. Note technique du 19 février 2008 – Mise à jour : 29 avril 2009
14. Barrière P, Couet ML, Hamamah S *et al.* (1998) Pratique de l'assistance médicale à la procréation. Paris, Masson
15. Seibel MM, Smith DM, Levesque L *et al.* (1982) The temporal relationship between the luteinizing hormone surge and human oocyte maturation. *Am J Obstet Gynecol* 142: 568-72
16. Vlahos NF, Giannakikou I, Vlachos A, Vitoratos N (2009) Analgesia and anesthesia for assisted reproductive technologies. *Int J Obstet Gynecol* 105: 201-5
17. Kwan I, Bhattacharya S, Knox F, McNeil A (2005) Conscious sedation and analgesia for oocyte retrieving during IVF procedures. *Cochrane Database Syst Rev* 20: CD004829
18. Hammarberg K, Wikland M, Nilsson L, Enk L (1988) Patient's experience of transvaginal follicle aspiration under local anesthesia. *Ann N Y Acad* 541: 134-7
19. Cerne A, Bergh C, Borg K *et al.* (2006) Pre-ovarian block versus paracervical block for oocyte retrieval. *Hum Reprod* 21: 2916-21
20. Ng EH, Chui DK, Tang OS, Ho PC (1999) A prospective, randomized, double-blind and placebo-controlled study to assess the efficacy of paracervical block in the pain relief during egg collection in IVF. *Hum Reprod* 14: 2783-7
21. Ng EH, Chui DK, Tang OS, Ho PC (2001) Paracervical block with and without conscious sedation: a comparison of the pain levels during egg collection and the postoperative side effects. *Fertil Steril* 75: 711-7
22. Alsaili M, Thorton S, Fleming S (1997) The effect of the anesthetic propofol on in-vitro maturation, fertilization and cleavage in mice. *Hum Reprod* 12: 1271-4
23. Janssenswillen C, Christiaens F, Camu F, Van Steirteghem A (1997) The effect of propofol on parthenogenetic activation, in vitro fertilization and early development of mouse oocytes. *Fertil Steril* 67: 769-74
24. Tatone C, Francione A, Marinangeli F *et al.* (1998) An evaluation of propofol toxicity on mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Hum Reprod* 13: 430-5
25. Coetsier T, Dhont M, De Sutter P *et al.* (1992) Propofol anesthesia for ultrasound guide oocyte retrieval: accumulation of the anaesthetic agent in the follicular fluid. *Hum Reprod* 7: 1422-4
26. Christiaens F, Janssenswillen C, Verborgh C *et al.* (1999) Propofol concentrations in follicular fluid during general anesthesia for transvaginal oocyte retrieval. *Hum Reprod* 14: 345-8
27. Ben-Shlomo I, Moskovich R, Golan J *et al.* (2000) The effect of propofol anesthesia on oocyte and early embryo quality. *Hum Reprod* 15: 2197-9
28. Christiaens F, Janssenswillen C, Van Steirteghem A *et al.* (1998) Comparison of assisted reproductive technology performance after oocyte retrieval under general anesthesia (propofol) versus paracervical local anesthetic block: a case-control study. *Hum Reprod* 13: 2456-60
29. Matt DW, Steingold KA, Dastvan CM *et al.* (1991) Effects of sera from patients given various anesthetics on preimplantation mouse embryo development in-vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 12: 678-82
30. Gonen O, Shulman A, Ghetler Y *et al.* (1995) The impact of different types of anesthesia on in-vitro fertilization-embryo transfer treatment outcome. *J Assist Reprod Genet* 12: 678-82
31. Wilhelm W, Hammadeh ME, White PF *et al.* (2002) General anesthesia versus monitored anesthesia care with remifentanyl for assisted reproductive technologies: effect on pregnancy rate. *J Clin Anesth* 14: 1-5
32. Mazze RI, Wilson AI, Rice SA, Baden JM (1984) Reproduction and fetal development in rats exposed to nitrous oxide. *Teratology* 30: 259-65
33. Awonuga A, Waterstone J, Oyesanya O *et al.* (1996) A prospective randomized study comparing needles of different diameters for transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration. *Fertil Steril* 65: 109-13
34. Van Os HC, Roozenburg BJ, Janssen-Caspers HA *et al.* (1992) Vaginal disinfection with povidone iodine and the outcome of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 7: 349-50
35. Hannoun A, Awwad J, Zreik T *et al.* (2008) Effect of betadine vaginal preparation during oocyte aspiration in in-vitro fertilization cycles on pregnancy outcome. *Gynecol Obstet Invest* 66: 274-8
36. Cohen J, Avery S, Campbell S (1986) Follicular aspiration using a syringe suction system may damage the zona pellucida. *J In-Vitro Fert Embryo Transfer* 3: 224-6
37. Kingsland CR, Taylor CT, Aziz N, Bickerton N (1991) Is follicular flushing necessary for oocyte retrieval? A randomized trial. *Hum Reprod* 6: 382-3
38. Tan SL, Waterstone J, Wren M, Parsons J (1992) A prospective randomized study comparing aspiration only with aspiration and flushing for transvaginal ultrasound-directed oocyte recovery. *Fertil Steril* 58: 356-60
39. Levens ED, Whitcomb BW, Payson MD, Larsen FW (2009) Ovarian follicular flushing among low-responding patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertile Steril* 91 (Suppl): 1381-4
40. Mendez Lozano DH, Brim Scheffer J, Frydman N *et al.* (2008) Optimal reproductive competence of oocytes retrieved through follicular flushing in minimal stimulation IVF. *Reprod Biomed Online* 16: 119-23
41. Hill MJ, Levens ED (2010) Is there a benefit in follicular flushing in assisted reproductive technology? *Curr Opin Obstet Gynecol* (in press)
42. Rosen MP, Shen S, Dobson AT, rinaudo PF *et al.* (2008) A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence. *Fertil Steril* 90: 684-90
43. El Shawarby SA, Margara RA, Trew GH, Lavery SA (2004) A review of complications following transvaginal oocyte retrieval for in-vitro fertilization. *Hum Fertil* 7: 127-33

44. Merviel P, Cabry R, Boulard V *et al.* (2009) Risques de la stimulation ovarienne et du prélèvement ovocytaire. *Gynecol Obstet Fertil* 37: 926-33
45. Dessole S, Rubattu G, Ambrosini J *et al.* (2001) Blood loss following non-complicated transvaginal oocyte retrieval for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 76: 205-6
46. Bennet SJ, Waterstone JJ, Cheng WC, Parsons J (1993) Complications of ultrasound directed follicle aspirations: a review of 2670 consecutive procedures. *J Assist Reprod Genet* 10: 72
47. Ludwig AK, Glawatz M, Griesinger G *et al.* (2006) Perioperative and postoperative complications of transvaginal-guided oocyte retrieval: prospective study of > 1,000 oocyte retrievals. *Hum Reprod* 21: 3225-40
48. Zhen X, Qiao J, Ma C *et al.* (2010) Intaperitoneal bleeding following transvaginal oocyte retrieval. *Int J Gynecol Obstet* 108: 31-4
49. Chen MJ, Yang JS, Yang YS, Ho HN (2004) Increased occurrence of tubo-ovarian abscesses in women with stage III and IV endometriosis. *Fertil Steril* 82: 498-9
50. Bodri D, Guillen JJ, Polo A *et al.* (2008) Complications related to ovarian stimulation and oocyte retrieval in 4052 oocyte donor cycles. *Reprod Biomed Online* 17: 237-43
51. Matsunaga Y, Fukushima K, Nozaki M *et al.* (2003) A case of pregnancy complicated by the development of a tubo-ovarian abscess following in vitro fertilization and embryo transfer. *Am J Perinat* 20: 277-82
52. Jones WR, Haines CJ, Matthews CD *et al.* (1989) Traumatic ureteric obstruction secondary to oocyte recovery for in vitro fertilization for in vitro fertilization: a case report. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 6: 185-7
53. Fugita OE, Kavoussi L (2001) Laparoscopic ureteral reimplantation for ureteral lesion secondary to transvaginal ultrasonography for oocyte retrieval. *Urology* 58: 281
54. Miller PB, Price T, Nichols JE Jr, Hill L (2002) Acute ureteral obstruction following transvaginal oocyte retrieval for IVF. *Hum Reprod* 17: 137-8
55. Fiori O, Cornet D, Darai E (2006) Uro-retroperitoneum after ultrasound-guided transvaginal follicle puncture in an oocyte donor: a case report. *Hum Reprod* 21: 2669-71
56. Coroleu B, Lopez Mourelle F, Hereter L *et al.* (1997) Ureteral lesion secondary to vaginal ultrasound follicular puncture for oocyte retrieval in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12: 948-50
57. Von Eye Corleta H, Moretto M, D'Avila AM, Berger M (2008) Immediate ureterovaginal fistula secondary to oocyte retrieval – a case report. *Fertil Steril* 90: 2006.e1-3
58. Mongiu AK, Helfand BT, Kielb SJ (2009) Ureterovaginal fistula formation after oocyte retrieval. *Urology* 73: 444.e1-3

P. Boyer, G. Mercier
et M. Boyer

Morphologie de l'embryon humain : évaluation et corrélation à son potentiel de développement

Introduction

Depuis 30 ans, la fécondation *in vitro* (FIV) permet de traiter la stérilité des couples grâce à la prise en charge active par des équipes pluridisciplinaires d'assistance médicale à la procréation (AMP). Les résultats sont en constante amélioration et la mise en place de nouvelles techniques repousse régulièrement les limites de la biologie. L'analyse des gamètes et des embryons humains est la base de l'embryologie clinique et débute par une observation microscopique. En biologie de la reproduction et plus particulièrement en AMP, le monde cellulaire est habituellement observé dans des conditions qui préservent la vitalité et la fonctionnalité des cellules. Le microscope inversé équipé du contraste interférentiel permet un grossissement $\times 400$ et jusqu'à $\times 1\,000$ sous immersion. La prise en compte des informations détaillées de la morphologie aux différents stades de l'évolution *in vitro* de l'embryon humain reste le critère non invasif le plus facilement accessible et le plus utilisé par les laboratoires de biologie de la reproduction. Les critères morphologiques sont à l'origine du choix des embryons à transférer et ne peuvent être dissociés de la notion d'évolution dynamique au cours des 2 à 5 jours de culture pendant lesquels nous avons accès aux transformations caractérisant la période préimplantatoire. La difficulté réside en l'évaluation du pronostic d'implantation de l'embryon à replacer, pour autant, les critères d'appréciation et le meilleur moment du remplacement restent controversés.

À cette fin, nous envisagerons les principales classifications utilisées en fonction du stade de développement par la majorité des équipes.

Le zygote

Un chapitre de l'ouvrage étant consacré à l'ovocyte, nous commencerons l'évaluation possible à partir de l'observation des signes de fécondation. L'ovocyte fécondé présente l'image des deux pro-

nuclei dans les 16 à 20 heures après la pénétration du spermatozoïde : ce stade d'œuf fécondé est proprement appelé zygote. Des signes indirects de la fécondation peuvent également être remarqués : l'émission du deuxième globule polaire et les remaniements du cytoplasme, en particulier la réaction corticale qui s'organise avec un halo périphérique plus clair. Les observations de Payne en cinématographie nous ont appris que le pronucleus féminin se voit généralement à proximité du second globule polaire alors que le pronucleus mâle apparaît plutôt au centre du cytoplasme (1). Les pronuclei convergent vers la zone centrale du cytoplasme ovocytaire et viennent au contact l'un de l'autre. Au cours de la prophase de chacun des pronoyaux, les chromosomes se répliquent, le centriole d'origine spermatique se dédouble pour organiser le fuseau mitotique, les enveloppes des pronuclei disparaissent (2) et les chromosomes se disposent sur la plaque équatoriale en métaphase de la première division : 24 à 30 heures après la fécondation apparaissent les deux premiers blastomères. Scott (3) publie en 1998 une classification comparative des tailles et situation des pronuclei en intégrant : le nombre, la taille et l'alignement des précurseurs nucléolaires. Elle distingue dans un premier temps les grades 1 à 5 qui sont définis comme suit (fig. 1) :

- grade 1 (G1) : un nombre égal de nucléoles de taille égale (entre 3 et 7) alignés à la jonction des pronuclei ;
- grade 2 (G2) : un nombre égal de nucléoles, de taille égale, alignés sur la jonction dans l'un des pronuclei et dispersés pour l'autre ;
- grade 3 (G3) : nombre (entre 3 et 7) de nucléoles, de taille égale mais dispersés dans les deux pronuclei ;
- grade 4 (G4) : nombre inégal (différence supérieure à un) des nucléoles et/ou de leur taille ;
- grade 5 (G5) : pronuclei non alignés, de tailles très différentes ou non, situés dans la partie centrale du zygote.

Cette classification a été revue en fonction de l'aptitude des embryons à atteindre un stade de blastocyste sous la dénomination de « Z score »,

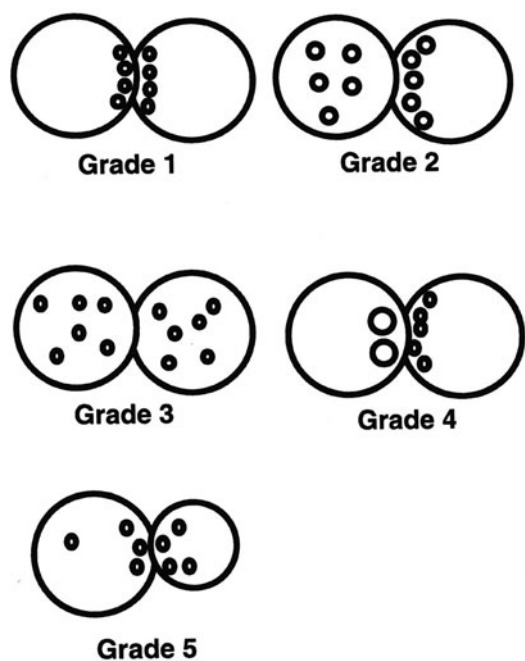


Fig. 1 – Classification initiale de L. Scott (1998).

Z pour zygote (4). G1 et G3 qui ont donné les meilleures morphologies embryonnaires sont renommés respectivement Z1et Z2. G2 et G4 sont regroupés sous le score Z3. Quant aux pronuclei non accolés ou de tailles sensiblement différentes, ils sont regroupés en Z4 (fig. 2).
Le pronostic d’implantation des zygotes a également été calculé par Tesarik en 1999 (5) en relation avec sa propre classification. Il propose six classes selon le pattern : le pattern 0 est le plus favorable car observé dans la classe des embryons ayant tous eu une implantation, puis il distingue les patterns de 1 à 5 avec des variations de nombre et distribution des organisateurs nucléolaires (ON). Il valide cette classification l’année suivante par une étude qui confirme la différence d’implantation en séparant le groupe 0 et les groupes 1 à 5. Sur un total de 436 embryons observés, Tesarik (6) évalue l’évolution en fonction du pattern en quatre classes (tableau I). Le nombre, la taille et la répartition des organisateurs nucléolaires sont liés à l’évolution

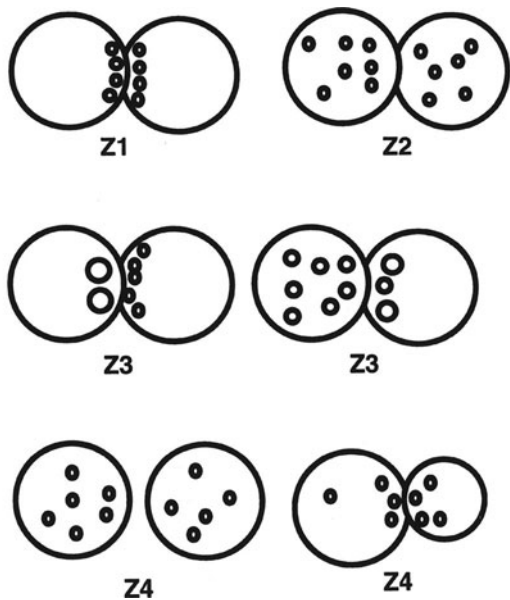


Fig. 2 – Classification modifiée de L. Scott (2000).

dans le temps des pronuclei. Tout d’abord en grand nombre et assez petits, ils sont répartis au hasard, puis leur nombre diminue alors que leur taille augmente, leur distribution se polarise alors le long de la zone de contact :
– pattern 0 : soit plus de 7 petits ON répartis de manière aléatoire dans chaque pronucleus, soit entre 3 et 7 ON dans chaque pronucleus mais toujours polarisés. Dans cette classe, il n’y a jamais polarisation des nucléoles dans un pronucleus et distribution aléatoire dans l’autre ;
– pattern 1 : une grande différence (> 3) dans le nombre des ON entre les deux pronuclei ;
– pattern 2 : un petit nombre d’ON (< 7) sans polarisation dans au moins un pronucleus ;
– pattern 3 : un grand nombre d’ON (> 7) polarisés dans au moins un pronucleus ;
– pattern 4 : un très petit nombre d’ON (< 3) dans au moins un pronucleus ;
– pattern 5 : la distribution des ON est polarisée dans l’un des pronucleus et pas dans l’autre (fig. 3).

Tableau I – Répartition des embryons (%) en fonction du pattern de leurs pronuclei selon Tesarik, observation de 436 zygotes (5).

Pattern	Aspect des embryons à j3			
	Bonne morphologie	Arrêtés	Avec blastomères multinucléés	Dégénératifs : ni arrêtés ni multinucléés
0	37,3	8,5	6,5	47,7
1	19,3	31,6	12,3	36,8
2	27,8	21,9	9,5	40,8
3	26,7	30,0	6,7	36,6
4	33,3	20,5	5,1	44,1
5	30,6	24,1	12,0	37,3

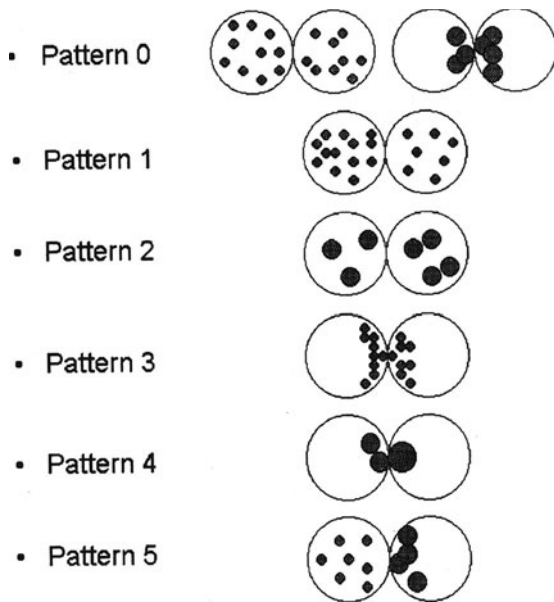


Fig. 3 – Classification des zygotes par Tésarik.

Au stade de zygote, de nombreuses anomalies ou images inhabituelles peuvent être observées. Les plus classiquement rencontrées sont l'observation de trois pronuclei en cas de polyspermie ou de digynie en ICSI ou d'un seul pronucleus correspondant à l'activation parthénogénétique (fig. 4).

Les premières divisions jusqu'à j3

La première division mitotique survient à la fin de la première journée de culture, elle divise l'œuf en deux cellules égales : division méridienne normale. L'observation précoce des deux premières cellules dans les 25 à 27 heures après insémination est nommée « clivage précoce » et constitue un élément pronostique important d'implantation, certaines équipes basent le choix de l'embryon à replacer sur ce critère (7-9). La deuxième division cellulaire de l'embryon intéresse la totalité du cytoplasme tout en associant une division équatoriale pour un blastomère et une division méridienne pour l'autre : segmentation holoblastique rotationnelle. Elle donne cet aspect caractéristique de l'œuf à quatre cellules. Dès le stade deux cellules, de nombreuses anomalies sont visibles lors de l'observation au microscope en contraste interférentiel. Elles concernent, entre autres, la régularité des blastomères, la présence de fragments anucléés dans l'espace périvitellin ainsi que le nombre et la qualité des noyaux cellulaires. Les divisions se succèdent avec un rythme lent : 12 heures de une cellule à quatre cellules puis 24 heures pour les mitoses suivant

tes, tout en faisant apparaître fréquemment une division des cellules. Des nombres impairs de blastomères sont fréquemment observés sans que l'on puisse établir un lien avec les capacités de développement de l'embryon. Le stade 4 cellules représente dans l'espèce humaine le dernier stade de développement utilisant exclusivement les réserves protéiques et d'ARN messager d'origine ovocytaire. Jusqu'au réveil du génome embryonnaire, la totipotence des cellules, mise en évidence par Siedel (10) dès 1952 sur l'œuf de lapin, assure à l'œuf sa capacité à compenser un excès ou une perte de matériel afin de maintenir une morphogenèse harmonieuse. Le relais par le génome embryonnaire des synthèses protéiques s'effectue, 48 heures après la fécondation, avec le passage au stade 8 cellules objectivé par le profil de migration électrophorétique comme le montrent les travaux de Braude (11). C'est une étape indispensable à la mise en place de l'architecture tridimensionnelle qui débute avec le phénomène de différenciation cellulaire.

La classification habituellement utilisée en France a fait l'objet d'un consensus des Biologistes des Laboratoires d'étude de la fécondation et de la conservation de l'œuf (BLEFCO). Elle présente l'avantage d'une codification simple à laquelle tout le monde peut se référer. Elle repose sur le nombre de cellules de l'embryon dont le nombre dépend du jour de l'observation, l'aspect typique des blastomères (typique = 1, atypique = 2) et du pourcentage d'exsudats ou fragments anucléés. Ces derniers sont évalués en proportion du volume intrapellucidaire qu'ils représentent : de 0 à 10 % de fragmentation la cotation est 1, de 10 à 50 % la cotation est 2 et au-delà de 50 %, elle est notée 3. Les embryons sont donc classés en 211 (2 blastomères, égaux, sans fragments), 411, 811..., ou 212 (2 blastomères de taille égale avec 10 à 20 % de fragments), 412, 812... ou 221 (2 blastomères de taille inégale sans fragments) 421, 821... ou 222 (2 blastomères de taille inégale avec 10 à 50 % de tailles inégales sans fragment), enfin 223 (2 blastomères inégaux avec plus de 50 % de fragments)... selon le jour du développement auquel on les examine (fig. 5). Il est assez fréquent de rencontrer des images de multinucléation qui font évoquer des anomalies de divisions mitotiques probablement par fragmentation du matériel nucléaire (micronoyaux), ces embryons sont généralement exclus du transfert et de la congélation. Certains auteurs ont proposé des adaptations de la classification BLEFCO en attribuant des points à chaque embryon en fonction de critères prédéfinis : le scoring. Ainsi, Giorgetti (12) propose d'ajouter 1 point de score pour chaque embryon en fonction de 4 critères : au moins 2



a = pattern 0 = G1 = Z1



b = pattern 5 ou G4 ou Z3



c = 2 pronucléi de tailles différentes (G5 ou Z4)



d = 3 pronucléi.



e = 2 pronucléi évanescents.



f = 2 pronucléi superposés.

Fig. 4 – Images de zygotes d'aspects caractéristiques (a et b), atypiques (c et d) ou difficilement classifiables (e et f).

blastomères (1 point), 4 blastomères (+ 1 point), pas de blastomères irréguliers (+ 1 point), pas de fragments anucléés (+ 1 point), soit un total maximal de 4 points pour les embryons ayant le meilleur pronostic. Ils établissent ainsi une corrélation étroite entre le score des embryons transférés et le taux de grossesse (environ 4 %

de grossesse par point de score pour le transfert d'un seul embryon à 48 heures). D'autres auteurs ont montré que la combinaison des critères des pronuclei associés à ceux du clivage à 24 heures avait un meilleur pronostic que l'étude de la morphologie au 3^e jour ou la capacité à évoluer jusqu'au stade de blastocyste (13).



a = 4-1-1
4 cellules typiques, sans fragment



b = 4-2-2.
4 cellules de tailles différentes,
10 à 20 % de fragments



c = 2-2-3.
2 cellules de taille très différente,
plus de 50 % de fragments



d = 3-1-1.
3 cellules typiques sans fragment

Fig. 5 – Quelques aspects d'embryons à j2 et de leur classification selon le BLEFCO.

La morula

Lorsque le développement embryonnaire se poursuit, les 3^e et 4^e jours sont marqués par la constitution de la morula (fig. 6a) et les transformations liées à la compaction. On qualifie sous ce nom de morula l'aspect que prend l'œuf au stade de 16-32 cellules encore distinctement visibles, car il ressemble à une petite mûre. Au stade morula, les échanges entre le milieu extérieur et les blastomères s'effectuent de manière indépendante pour chaque blastomère, grâce à une surface membranaire augmentée par l'existence de microvilli et des liens intercellulaires lâches. Remarquons que, jusqu'à ce stade, la faible cohésion des blastomères rend possible le prélèvement pour diagnostic préimplantatoire (DPI). La différenciation de la morula débute avec une double destinée des cellules : celles de la périphérie

sont affectées au développement du trophoctoderme alors que c'est à partir des cellules internes que sera constituée la masse cellulaire interne ou bouton embryonnaire ; cependant cet événement n'est pas encore accessible à la seule observation microscopique.

La morula compactée

La compaction est probablement la première expression visible de la différenciation cellulaire (fig. 6b-6d). Elle se caractérise par la disparition des limites cellulaires visibles en microscopie optique avec établissement de jonctions serrées entre les blastomères intéressés par le phénomène. Il s'ensuit trois conséquences majeures : la morphologie se transforme par l'épithélialisation des cellules,



a = morula (12 à 16 cellules).



b = morula en cours de compaction.



c = morula compactée partielle.



d = morula totalement compactée.

Fig. 6 – Différents aspects de la morula, à la morula compactée.

l'apparition d'une polarité apico-basale oriente les blastomères, la différenciation distingue des cellules internes et des cellules externes polarisées gardant un contact direct avec le milieu extérieur. Il s'agit du premier épithélium de transport. Les cellules internes, apolaires, sont isolées du milieu extérieur. Elles ne reçoivent de signaux externes qu'après le passage obligatoire à travers les cellules superficielles. La compaction touche en général la totalité des blastomères mais elle peut n'intéresser qu'une partie des blastomères adjacents et ne concerne jamais les exsudats cytoplasmiques ou les fragments anucléés. On implique dans ce processus de compaction une molécule adhésive : la E-cadhérine ou ovomoruline (14).

Le blastocyste

L'étape suivante survenant dès le 5^e jour est la mise en place du blastocœle, cavité dont l'apparition est excentrée, définissant le blastocyste jeune. Chez la souris, les cellules en contact avec le milieu extérieur captent le Na⁺. La Na⁺/K⁺ ATPase le trans-

porte vers le pôle opposé, créant ainsi un gradient ionique qui permet l'accumulation de liquide par effet osmotique. Le blastocœle, formé de façon dynamique par le métabolisme des cellules, grossit jusqu'à aplatissement des cellules en périphérie qui prennent le nom de trophoctoderme. Quelques cellules internes s'organisent pour former le bouton embryonnaire (BE) ou *inner cell mass* (ICM). Le bouton embryonnaire est à l'origine de l'embryon didermique. Les expériences chez les souris allophènes de Mintz (15) ont démontré que trois blastomères seulement sont à l'origine de la formation du bouton embryonnaire. Le blastocœle augmente rapidement de volume (en quelques heures), faisant passer le blastocyste au stade de blastocyste expansé. Celui-ci, en augmentant de volume, amincit la zone pellucide. Le diamètre est multiplié par deux, soit une augmentation de volume d'environ huit fois celui de l'ovocyte.

L'évolution rapide de l'embryon à ce stade rend l'utilisation d'une classification peu pratique. Néanmoins, celle de Gardner (16) peut être proposée. Elle repose sur l'évolution du blastocyste et définit six stades en fonction de l'apparition du blastocœle et de l'augmentation de volume

qu'il impose à l'embryon. À partir du stade 3, elle est complétée par l'analyse du bouton embryonnaire qui doit être bien individualisé : compact et composé de nombreuses cellules, il sera alors noté A. S'il est moins organisé, impliquant moins de cellules : il est noté B et enfin, difficilement

identifiable, formé de peu de cellules : il est noté C. La classification tient compte de la deuxième structure analysable qu'est le trophoctoderme qui est, lui aussi, caractérisé par trois grades A, B et C selon qu'il est organisé en épithélium festonné (A), irrégulier (B), voire presque lisse (C). (fig. 7 et 8). Les



a = Blastocyste jeune : B1

(x 40)



b = B2

(x 40)



c = B3

(x 40)



d = B4

(x 20)



e = B4 B C d'après D. Gardner.

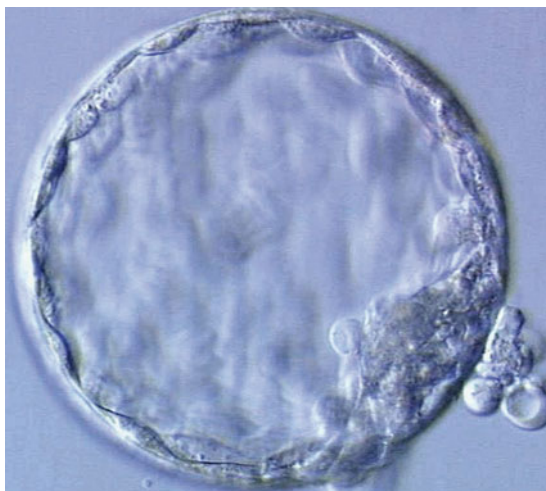


f = B3 AB partiel d'après D. Gardner.

Fig. 7 – Classification des blastocystes.



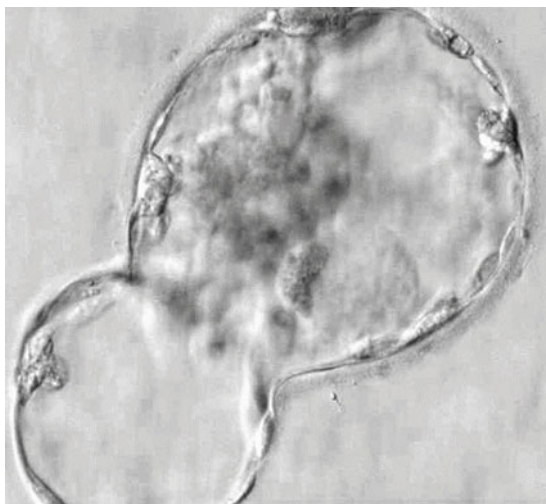
a = B5.



b = B6 début d'éclosion.



c = extrusion du trophoctoderme.



d = rupture de la pellucide.

Fig. 8 – Éclosion du blastocyste.

BLEFCO ont défini une classification simplifiée qui reprend les six aspects typiques. Ce sont ces aspects qui sont illustrés : B1 = blastocyste jeune, B2 = blastocyste dont le blastocœle occupe la moitié du volume, B3 = blastocyste dont le blastocœle occupe plus de la moitié du volume, B4 = blastocyste dont la cavité occupe tout le volume de l'embryon, B5 = blastocyste augmenté de volume avec pellucide amincie et B6 éclosion du blastocyste avec hernie du trophoctoderme (fig. 7 et 8).

L'éclosion

L'éclosion du blastocyste hors de la zone pellucide est nécessaire avant l'implantation. Celle-ci

se fait par l'action de deux facteurs : un facteur mécanique de mouvements qui distendent cette membrane glycoprotéique et un facteur enzymatique de type trypsine. On constate alors une extrusion du trophoctoderme à un pôle du blastocyste qui s'échappe ensuite par l'ouverture formée (fig. 8). Une fois l'éclosion achevée, en interaction avec l'endomètre la nidation peut commencer. Le pouvoir invasif du trophoctoderme est mis en évidence par des sécrétions enzymatiques protéolytiques comme la collagénase, la stromélysine et l'activateur du plasminogène. L'action lytique des protéases est couplée à celle des intégrines qui fixent le blastocyste sur la matrice extracellulaire permettant l'implantation.

Limite des classifications : un outil pour y remédier

L'observation des ovocytes ou des embryons se fait généralement dans des périodes de temps courtes et à intervalle réguliers, environ 18 heures après la fécondation puis toutes les 24 heures. Le respect de ces intervalles est très important car l'appréciation de la qualité se fait sur des stades précis et labiles. Les pronuclei apparaissent peu souvent sous la représentation synthétique que l'on en donne dans les schémas, en particulier parce qu'on les représente dans le plan. L'évolution des embryons est plus ou moins rapide et l'observation ne représente que l'instant t , elle-même conditionnée par le grandissement et la profondeur de champs auxquels ils sont observés. Les blastomères sont dans une sphère et requièrent une observation de tout le volume intrapellucidaire (fig. 9). En revanche, l'observation quotidienne des étapes peut faire l'objet d'une saisie informatique par capture et digitalisation de l'image observée. L'enregistrement autorise une observation approfondie, répétée, et alimente une « banque d'image » qu'il faut organiser en « dossier image des étapes biologiques » auquel

on intègre les informations du dossier clinique et de la biologie classique. Le traitement de la base de données sous forme d'analyse d'image est bien sûr envisageable à distance de la prise de vue et permet une confrontation objective. Enfin, les aspects morphologiques inhabituels rares peuvent ainsi bénéficier d'une diffusion plus large. Les variations d'appréciations au sein d'un même laboratoire sont telles que des cotations différentes peuvent être attribuées au même embryon. Cette particularité a même été prise en compte dans l'étude Merit (17) où la lecture par trois observateurs indépendants en double aveugle a permis de corriger les variations d'appréciations. À ce problème s'ajoute le choix de la classification, certains biologistes continuent à utiliser des classifications encore plus simplifiées qui ne sont pas présentées ici. Pour nous affranchir de ces divergences au moment du transfert, nous avons mis en place le suivi individuel quotidien avec prise de vue des stades observés. Le schéma d'une telle organisation a fait l'objet d'un ouvrage richement illustré : « la mémoire de l'image » (18) qui confirme l'intérêt de la démarche d'assurance qualité ainsi initiée. L'évaluation quotidienne et l'intégration des éléments de l'évolution peuvent

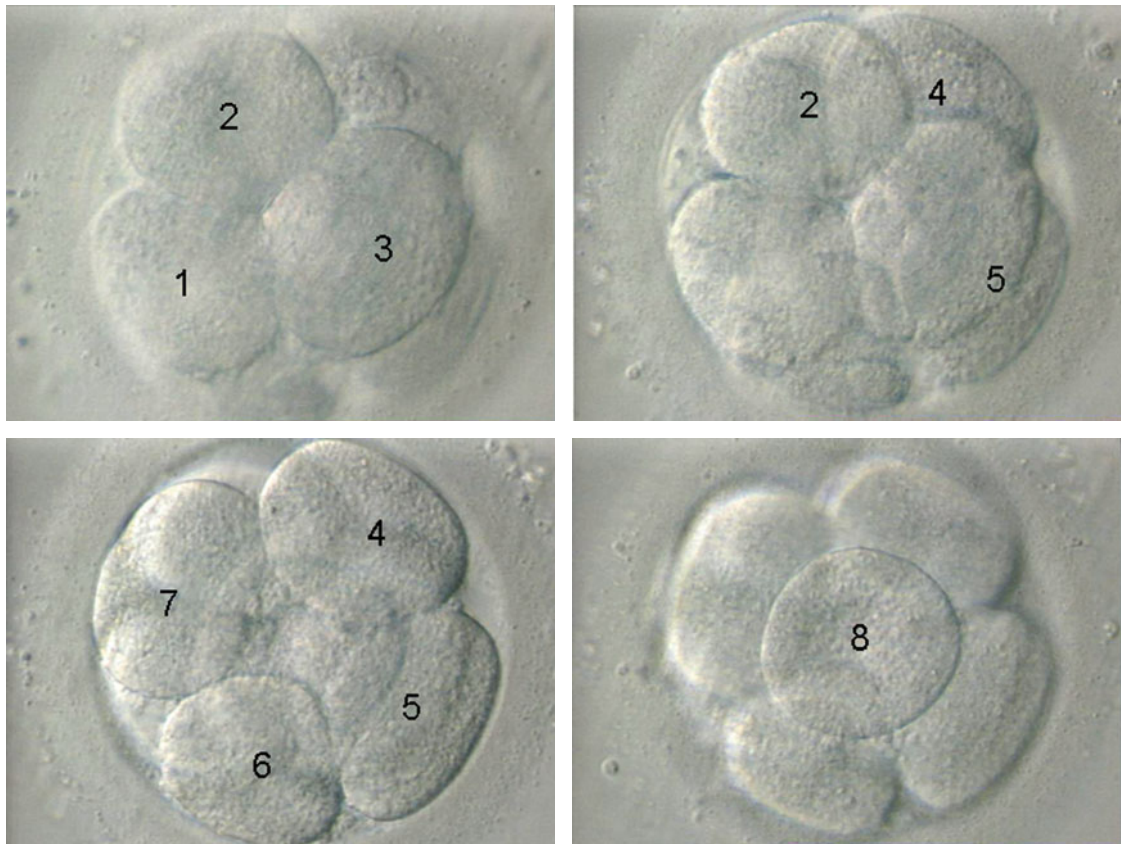


Fig. 9 – Reconstitution d'un embryon de type 8-1-1 en quatre plans.

1 : Embryon n°1



2 : Embryon n°2



j2 j3 j4 j5

Fig. 10 – Exemple d’évolution de deux embryons entre j2 et j5 dont le choix aurait été différent s’il avait fallu le faire à j3.

surprendre le biologiste. En effet, un nombre important d’embryons, environ 30 %, évalués favorablement à j3, ne sont pas au rendez-vous à j5, et de même certains embryons de j3 de morphologie incertaine se retrouvent au stade de blastocyste avec un fort potentiel d’implantation (fig. 10). L’appréciation dynamique qui en découle nous a permis de modifier profondément nos pratiques sur le nombre moyen d’embryons replacés sans diminuer les taux de grossesse et d’accouchement en dix ans d’activité (fig. 11). L’effort

réalisé ces quatre dernières années a permis de multiplier par deux le nombre de transferts d’un seul embryon alors que corrélativement le transfert de deux embryons a été réduit de plus d’un tiers (tableau II). Dans le même temps, le taux d’accouchement pour les transferts d’un seul embryon a augmenté de 21,74 à 27,23 % grâce au transfert à j5. Les bénéfices d’une telle politique montrent que le taux d’accouchements gémellaires diminue d’un quart lors des transferts de deux embryons (tableau III). Le nombre total de nais-

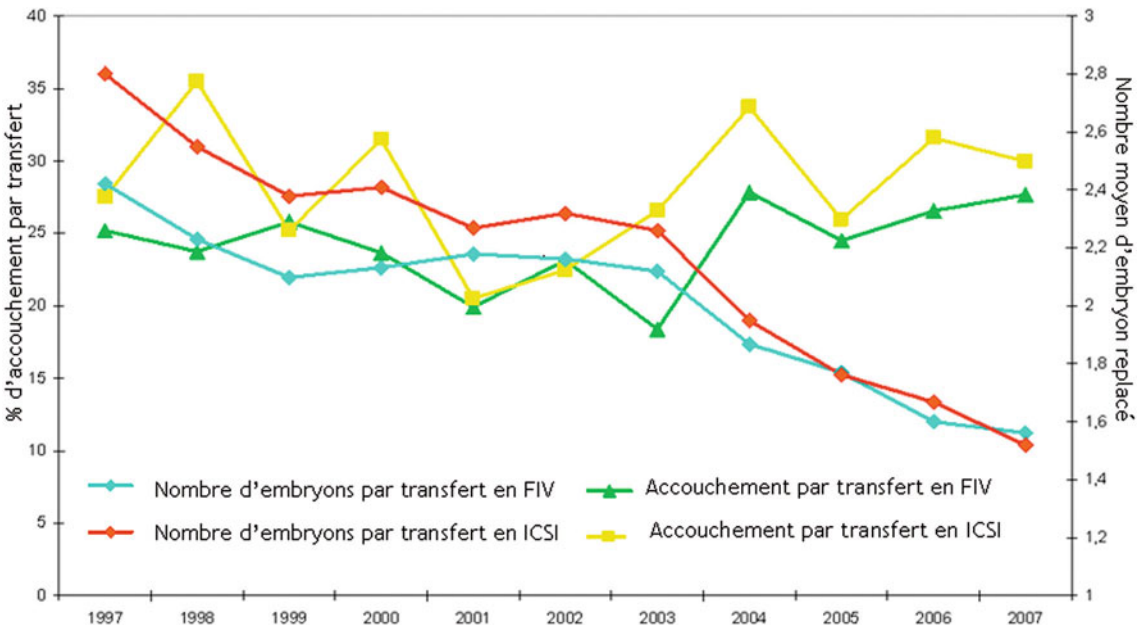


Fig. 11 – Évolution du nombre moyen d’embryons replacés et des taux d’accouchement par transfert.

Tableau II – Évolution du nombre de transferts de un et deux embryons sur 4 ans.

	2005	2006	2007	2008
Nombre de transferts	498	523	481	482
Transfert de 1 embryon (%)	115 (23,09)	189 (36,13)	220 (45,73)	246 (51,03)
Transfert de 2 embryons (%)	383 (76,91)	334 (63,86)	261 (54,26)	236 (48,96)
Taux d'accouchement par grossesse	78,12	78,5	74,03	79,72

Tableau III – Évolution du pourcentage des accouchements par grossesse clinique après transfert de deux embryons.

(%)	2005	2006	2007	2008
Accouchement simple	70	67,64	72,72	80,82
Accouchement gémellaire	30	32,35	27,27	19,18

Tableau IV – Évolution des pronuclei selon les patterns définis par Tésarik correspondant aux deux embryons transférés dans les grossesses gémellaires.

	Pattern 0	Pattern 0 pour un embryon Pattern 1 à 5 pour l'autre	Pattern 1 à 5	Total grossesses gémellaires
Grossesses avec transfert à j3 (%)	3 (13,04)	11 (47,82)	9 (39,13)	23 (100)
Grossesses avec transfert à j5 (%)	9 (23,68)	10 (26,31)	19 (50,00)	38 (100)
Total des grossesses	12 (19,7)	21 (34,42)	28 (45,90)	61 (100)

sances gémellaires est réduit de plus de moitié, passant de 24 à 11 % alors que le taux d'accouchement global est conservé (tableau II). L'exemple de l'analyse des transferts de deux embryons ayant abouti à des grossesses gémellaires illustre l'intérêt du choix dynamique (tableaux III et IV). Les grossesses gémellaires avec transfert de deux embryons nous permettent rétrospectivement d'analyser et comparer les morphologies embryonnaires aux différents stades d'observation. Nous avons réexaminé les PN des embryons d'après la classification de Tésarik (tableau IV). Il apparaît que cette classification ne permet pas un choix superposable à celui que nous avons fait pour les embryons replacés (fig. 12, 13, 14). En revanche, l'évaluation sur les critères de j2/j3 selon la classification BLEFCO : « Top Embryons » notés 411 ou 811 donne un pronostic d'implantation plus proche de celui du blastocyste.

Les embryons transférés sont toujours ceux à qui on donne le meilleur pronostic. Pour autant, dans ces grossesses obtenues après transfert à j3, un autre choix était possible à j2 dans 80 % des cas et lors des transferts à j5 un autre choix est encore possible dans 65 % des cas. Le transfert à j5 au stade de blastocyste permet d'améliorer le choix et, dans les cas où le développement de toute la cohorte embryonnaire s'interrompt avant j5, un diagnostic étiologique d'échecs répétés après transfert peut être attribué à la viabilité

embryonnaire plus qu'à un défaut d'implantation.

Conclusion

Les classifications ne permettent pas de « choisir » de façon simple l'embryon qui va s'implanter. Notre choix se fonde plus sur l'observation de la dynamique de développement que sur des critères morphologiques instantanés, bases des classifications. Le pourcentage encore élevé de grossesses gémellaires dans les transferts de deux embryons montre qu'il existe une marge de manœuvre pour diminuer le nombre d'embryon replacé par la sélection des patientes à qui ce choix est proposé. Les limites de l'utilisation des critères morphologiques semblent atteintes et d'autres explorations non invasives ont depuis longtemps été envisagées. La capacité de développement de l'embryon est liée à sa consommation de divers nutriments (19, 20) et peut également se traduire par des changements de métabolisme des acides aminés corrélés au potentiel d'implantation (21, 22). Une approche d'avenir pourrait être l'analyse spectroscopique des métabolites du milieu de culture de chaque embryon comme facteur prédictif de leur capacité à poursuivre leur développement (23).



J1 emb1



J1 emb5



J3 emb1



J3 emb5



J5 emb1



J5 emb5

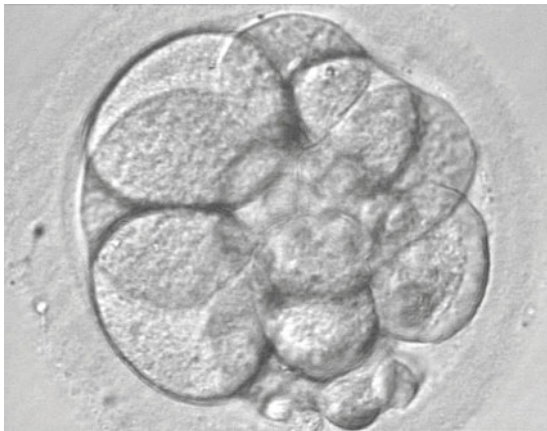
Fig. 12 – Grossesse gémellaire : évolution de deux embryons dont les PN étaient « typiques » à j1.



J1 emb3



J1 emb7



J3 emb3



J3 emb7



J5 emb3



J5 emb7

Fig. 13 – Grossesse gémellaire : évolution de deux embryons dont les PN étaient « atypiques » à j1.



J1 emb3



J1 emb11



J3 emb3



J3 emb11



J5 emb3



J5 emb11

Fig. 14 – Grossesse gémellaire : évolution de deux embryons dont seul l'un avait des PN « typiques » à j1.

Références

1. Payne D, Flaherty SP, Barry MF *et al.* (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 12: 532-41
2. Czyba JC, Montella A (1993) La Fécondation. In : *Biologie de la reproduction humaine*. Montpellier, Sauramps Médical : 213-6
3. Scott L, Smith S (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 13: 1003-13
4. Scott L, Alvero R, Leondires M *et al.* (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 15: 2394-403
5. Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14: 1318-23
6. Tesarik J, Junca A.M, Hazout A *et al.* (2000) Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 15: 1396-9
7. Shoukir Y, Campana A, Farley T *et al.* (1997) Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 12: 1531-6
8. Lundin K, Bergh C, Hardarson T (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 16: 2652-7
9. Scott L, Finn A, O'Leary T *et al.* (2007) Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 22: 230-40
10. Siedel F (1952) Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellen-stadium im Säugertieren. *Naturwissenschaften* 39: 355-6
11. Braude P, Bolton V, Moore S (1988) Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332: 549
12. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P *et al.* (1995) Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 10: 2427-31
13. Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M (2004) Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 8: 687-9
14. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I (2001) Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoblast differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci* 1: D1000-7
15. Mintz B (1970) Clonal expression in allophonic mice. *Symp Int Soc Cell Biol* 9: 15
16. Gardner DK, Lane M, Stevens J *et al.* (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73: 1155-8
17. Andersen A, Devroey P, Arce J (2006) Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod* 21: 3217-27
18. Boyer P (2006) La mémoire de l'image Assistance Médicale à la Procréation. Rueil-Malmaison, Editions Rand
19. Conaghan J, Hardy K, Handyside AH *et al.* (1993) Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet* 10: 21-30
20. Gardner DK, Lane M, Stevens J *et al.* (2001) Non-invasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76: 1175-80
21. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG *et al.* (2002) Non invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 17: 999-1005
22. Brison DR, Houghton FD, Falconer D *et al.* (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turn-over. *Hum Reprod* 19: 2319-24
23. Scott R, Seli E, Miller K *et al.* (2008) Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 90: 77-83

Remerciements

Je remercie les laboratoires Genévrier pour l'auto-risation d'utilisation d'iconographies tirées de l'ouvrage *La mémoire de l'image*.

D. Royère, P. Feuerstein,
V. Cadoret, V. Puard
et F. Guérif

Évaluation non invasive de la viabilité de l'embryon humain

Introduction

Le développement de l'embryon avant l'implantation constitue l'un des deux événements clés de l'obtention et de l'évolution future de la grossesse. Les approches non invasives de « qualité » ou « viabilité » embryonnaire sont d'autant plus justifiées que l'exigence de mieux la définir se renforce avec le souhait de plus en plus exprimé de réduire le risque de grossesse multiple en préservant les chances de conception pour le couple. L'approche morphologique, qu'elle concerne les étapes précoces de la fécondation, du développement embryonnaire ou l'ovocyte avant la fécondation conserve une place non négligeable mais a montré ses limites (1, 2). Ces approches fonctionnelles doivent répondre à certains critères, notamment :

- ne pas être invasives pour l'embryon ;
- être applicables à l'échelle de l'embryon et reproductibles ;
- pouvoir fournir une information dans un délai compatible avec le moment du transfert de l'embryon ;
- être faciles à mettre en œuvre dans une pratique quotidienne ;
- avoir un rapport coût-efficacité raisonnable ;
- être indépendantes des autres critères notamment morphologiques pour augmenter leur puissance discriminative ;
- idéalement reposer sur des hypothèses physiopathologiques précises.

C'est dans cet esprit que nous aborderons successivement les approches protéomique et métabolique concernant l'embryon, puis la contribution du dialogue ovocyte-cumulus à la compétence de l'ovocyte au développement.

Approche protéomique du sécrétome de l'embryon

Elle s'appuie sur le fait qu'au-delà de la génomique, les protéines sécrétées par un embryon attestent

d'un profil réel d'expression de certains gènes et, de ce fait, conditionnent une activité fonctionnelle pouvant influencer le devenir de cet embryon. C'est donc une démarche qui s'intercale entre la génomique, visant à évaluer le profil d'expression des gènes et l'approche centrée sur l'évaluation de l'activité fonctionnelle mesurée directement ou indirectement par les produits.

Approches spécifiques sur « protéines candidates »

Elles ont été les premières mises en œuvre en raison de leur « relative » simplicité mais se sont toutes heurtées à certaines limites. C'est le cas pour le 1-O-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine plus communément dénommé *platelet activating factor* (PAF) facteur soluble autocrine sécrété par l'embryon et favorisant sa survie (3), la leptine dont la sécrétion refléterait l'aptitude de l'embryon à atteindre le stade de blastocyste et pourrait intervenir dans le dialogue embryon-endomètre (4, 5), l'acrogranine pour son action facilitante sur le développement du blastocyste chez la souris (6), la forme soluble d'HLA-G qui fait l'objet de controverses (7). Quelle que soit la pertinence attribuable à chacun de ces facteurs pour refléter la viabilité de l'embryon, une remarque générale s'impose, la difficulté pour ne pas dire l'impossibilité de relier l'expression d'une molécule avec un phénomène aussi complexe et multifactoriel que la capacité d'un embryon à se développer et s'implanter.

Approches plus globales : *protein microarray*, spectrométrie de masse

Elles visent d'abord à définir un ou des profils protéiques de sécrétome associés à la capacité de développement ou d'implantation, avant de caractériser d'éventuelles protéines candidates spécifiques de ces profils.

C'est ainsi qu'une approche ayant recours à des puces protéiques (*protein microarray*) a mis en évidence la décroissance dans le milieu de culture de facteurs tels que le récepteur soluble de type I du TNE, l'interleukine-10, *macrophage stimulating protein alpha*, *stem cell factor*, CXCL13, TRAIL R3 et MIP 1- β , tandis que la diminution de CXCL13 et GM-CSF était aussi associée avec l'implantation du blastocyste (8). L'absence de protéine « sur-représentée » dans le sécrétome des embryons aptes à l'implantation reste surprenante.

L'application de la spectrométrie de masse au sécrétome de l'embryon est d'abord la conséquence de l'adaptation récente de cette technologie en termes de sensibilité et de taille des échantillons aux conditions de la culture *in vitro* de l'embryon. Brièvement, la méthodologie repose sur le principe d'une ionisation des espèces moléculaires présentes (ici peptides et protéines) et la détection des ions produits après migration dans un champ électrique selon le rapport masse sur charge de ces ions. Il existe une grande variété de techniques pour chaque étape, leur choix impliquant la source que l'on utilise (et sa préparation), les espèces moléculaires que l'on souhaite identifier, les quantités disponibles donc la sensibilité de la technique, les contraintes de temps à intégrer, sans oublier les coûts engendrés et les appareils et compétences disponibles (9). Une approche de type SELDI-TOF (*surface enhanced laser desorption and ionization time of flight*) a été utilisée pour le sécrétome de l'embryon (10). Des profils de sécrétion ont pu être associés avec la capacité de développement au stade de blastocyste (11, 12) de même qu'avec le statut euploïde ou aneuploïde de l'embryon (10). En particulier, l'ubiquitine s'est révélée un biomarqueur corrélé au développement au stade de blastocyste indépendamment de son rôle dans le processus de l'implantation (12). L'impact de ces profils ou des biomarqueurs identifiés reste à évaluer de manière prospective sur un plus grand nombre d'échantillons.

Approches métaboliques de la viabilité embryonnaire

Si toutes s'intéressent au métabolisme de l'embryon, il convient de distinguer les approches précises du métabolisme énergétique et/ou de la consommation d'oxygène des approches spectrales plus globales.

Métabolisme énergétique et consommation d'oxygène

Cette approche a été développée depuis de nombreuses années, mais elle connaît un regain d'ac-

tualité du fait des évolutions technologiques ayant permis de gagner en sensibilité et de traiter de très petits volumes compatibles avec les conditions de culture des embryons. La mesure de la consommation d'oxygène (respirométrie) a été rapportée comme un critère puissant de discrimination entre les embryons capables ou non de s'implanter chez les bovins (13), elle a aussi été évaluée chez l'homme dans l'objectif de mieux sélectionner les ovocytes (14). Sans réduire l'intérêt d'une telle approche sur le plan expérimental, la complexité de la technique de microprélèvement et de mesure limite singulièrement la portée de ces observations en pratique d'embryologie clinique.

Les approches concernant le métabolisme et particulièrement le métabolisme des acides aminés ont, elles aussi, bénéficié d'aménagements techniques par rapport aux travaux plus anciens (15, 16). C'est ainsi que le turnover de certains acides aminés (asparagine, glycine et leucine) des embryons à j2 a été corrélé à l'obtention d'une grossesse après transfert (17). En outre, le turnover de l'acide glutamique, la glutamine, la glycine, l'arginine, l'alanine et la lysine a été relié à la reprise de développement jusqu'au stade de blastocyste après décongélation (18), confirmant le potentiel d'une telle approche et son applicabilité en pratique. De plus, ces approches ont eu aussi le mérite d'attirer l'attention sur le fait qu'un embryon viable est un embryon non stressé, qui ne déploie ni le métabolisme le plus actif, ni les ressources énergétiques les plus importantes (19). Les essais cliniques à grande échelle sont en cours et devraient déboucher sur la mise sur le marché de la technique de mesure.

Approches métabolomiques

Elles se veulent plus globales visant à fournir des « signatures », c'est-à-dire des profils caractéristiques des embryons à haut potentiel de développement voire d'implantation. Ce faisant, elles ne s'appuient pas au départ sur un ou des concepts physiopathologiques comme l'approche du métabolisme énergétique le permettait. Néanmoins, cette approche globale n'est pas sans intérêt si l'on retient le caractère multifactoriel de la « viabilité » embryonnaire. Techniquement, elles peuvent s'appuyer comme pour la protéomique sur la méthodologie de la spectrométrie de masse avec, bien sûr, des adaptations pour les petites molécules du métabolisme, ou sur la résonance magnétique nucléaire qui pose des problèmes de sensibilité comme de volume des échantillons, mais les résultats publiés s'appuient sur la spectroscopie vibrationnelle dans les domaines de l'infrarouge, de la spectroscopie Raman ou proche de l'infrarouge (20).

L'approche utilisant l'analyse spectrale dans le domaine de l'infrarouge après transformation de Fourier a été appliquée au milieu de culture des embryons et permis de relier certaines de ces « empreintes » à un potentiel implantatoire avec une bonne cohérence entre les observations réalisées. C'est une approche prometteuse qui demande à être confirmée sur une plus grande échelle et surtout de manière prospective (21).

La spectroscopie Raman et la spectroscopie dans le domaine proche de l'infrarouge (NIR spectroscopy) ont été appliquées aux embryons en FIV (22). L'analyse spectrale est rendue plus complexe et nécessite un traitement mathématique et une modélisation s'appuyant sur un algorithme génétique, qui conduit à calculer un « index de viabilité » que l'on peut confronter avec les différentes situations cliniques testées. Cette étude préliminaire avait retrouvé des différences significatives pour les deux spectres en fonction de la capacité pour les embryons à s'implanter. Elle a été complétée par deux autres études, l'une utilisant le spectre Raman avec simplement l'analyse en aveugle des échantillons (23), l'autre utilisant le spectre proche de l'infrarouge, là aussi en aveugle, mais cette fois dans le contexte de transferts d'embryons uniques à j3 (24, 25) ou à j2 (25). L'absence de relation observée entre l'index de viabilité et le score morphologique est un argument d'indépendance entre les deux types de critères. Ce n'est pas le cas en ce qui concerne une autre étude utilisant la même technique, la relation entre index de viabilité et cinétique de développement comme caractéristiques morphologiques apparaissant plus nette (26). De nouveau, la validité de cette approche nécessite une confirmation par une étude prospective en aveugle pour confirmer l'aide à la décision du calcul de l'index de viabilité.

Dialogue ovocyte-cumulus : impact sur la qualité embryonnaire

Cette approche non invasive repose sur le rôle majeur pour la maturation ovocytaire du dialogue ovocyte-cumulus (27). Ce dialogue ne met pas seulement en jeu la synergie entre les deux compartiments sur le plan métabolique (28, 29), mais aussi l'expression de certains gènes au niveau des cellules du cumulus sous la dépendance ou non de la LH (30-33). Notre propre approche de transcriptomique nous a permis de mettre en évidence 724 gènes différentiellement exprimés en fonction de la compétence à la méiose et 146 gènes différentiellement exprimés en fonction de la compétence au développement (34). Des approches comparatives entre cellules de granulosa et cellules

de cumulus ont également été rapportées (35), de même que des approches ciblées sur certains gènes ont évalué l'impact des traitements de stimulation et de certaines caractéristiques (âge, IMC, réponse à la stimulation) des patientes (36). La divergence des résultats entre les équipes ne s'explique pas seulement par les différences méthodologiques et justifie l'importance de la validation des données en PCR quantitative, en aveugle et dans une approche prospective.

Évaluation non invasive de la viabilité embryonnaire : quelles perspectives ?

S'il est encore prématuré d'indiquer parmi tous les critères de développement/viabilité présentés ceux qui seront à la fois robustes, fiables et transposables en pratique clinique, en revanche l'apport cognitif de ces résultats est déjà indiscutable. Cette identification ouvre la voie au développement de « marqueurs » de compétence accessibles en pratique clinique. Bien entendu, cette réflexion est indissociable de l'étude des mécanismes impliqués dans le processus de l'implantation. Il reste qu'avant d'être retenus comme outils d'aide à la décision (et commercialisés), ces critères devront satisfaire l'ensemble des conditions énoncées plus haut.

Ce chapitre a fait l'objet d'une communication orale au congrès de la Fédération française d'étude de la reproduction (FFER) 2009 (37).

Références

1. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B *et al.* (2007) Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 22: 1973-81
2. Royere D, Guerif F (2008) Preimplantation embryo development: current status and perspectives in clinical embryology. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 1119-25
3. O'Neill C (2005) The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update* 11: 575-93
4. Gonzales RR, Caballero-Campo P, Jasper M *et al.* (2000) Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4883-8
5. Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F *et al.* (2005) Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 10: 217-23
6. Diaz-Cueto L, Stein P, Jacos A *et al.* (2000) Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin:granulin precursor). *Dev Biol* 217: 406-18
7. Tabiasco J, Perrier d'Hauterive S, Thonon F *et al.* (2009) Soluble HLA-G in IVF-ICSI embryo culture supernatants do not always predict implantation success: a multicentre study. *Reprod Biomed Online* 18: 374-81

8. Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ *et al.* (2008) Comparative protein profile analysis of implanted versus non implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 23: 1993-2000
9. Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207
10. Katz-Jaffe MG, Mc Reynolds S, Gardner D, Schoolcraft WB (2009) The role of proteomics in defining the human embryo secretome. *Mol Hum Reprod* 15: 271-7
11. Katz-Jaffe MG, Gardner D, Schoolcraft WB (2006) Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 85: 101-7
12. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner D (2006) Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 86: 678-85
13. Lopes A, Greve T, Callesen H. Quantification of embryo quality by repirometry. (2007) *Theriogenology* 67: 21-31
14. Scott L, Berntsen J, Davies D *et al.* (2008) Human oocyte respiration-rate measurement potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online* 17: 461-9
15. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 44: 476-85
16. Gardner D, Pawelczynski M, Trounson A (1996) Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 44: 472-5
17. Brison DR, Houghton FD, Falconer D *et al.* (2004) Identification of viable embryos in IVF by non invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19: 2319-24
18. Stokes P, Hawkhead JA, Fawthrop RK *et al.* (2007) Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Hum Reprod* 22: 829-35
19. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR *et al.* (2008) Metabolism of the viable mammalian embryo : quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 14: 667-72
20. Singh R, Sinclair KD (2007) Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 68S: S56-S62
21. Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre R (2007) Predicting human embryo viability : the road to non invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online* 15: 296-302
22. Seli E, Sakkas D, Scott R *et al.* (2007) Non invasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88: 1350-7
23. Scott R, Seli E, Miller K *et al.* (2008) Non invasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 90: 77-83
24. Vergouw CG, Botros LL, Roos P *et al.* (2008) Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 23: 1499-504
25. Seli E, Vergouw CG, Morita H *et al.* (2009) Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* (in press)
26. Nagy ZP, Jones-Colon S, Roos P *et al.* (2009) Metabolomic assessment of oocyte viability. *Reprod Biomed Online* 18: 219-25
27. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R *et al.* (2006) Le dialogue ovocyte-cumulus. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 793-800
28. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG (2003) Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulu-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 9: 35-8
29. Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K *et al.* (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135: 111-21
30. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Trans R *et al.* (2007) Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 22: 3069-77
31. Assou S, Haouzi D, Mahmoud L *et al.* (2008) A non invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 14: 711-9
32. Hamel M, Dufort I, Robert C *et al.* (2008) Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 23: 1118-27
33. Van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC *et al.* (2008) Differential gene expression incumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 14: 157-68
34. Royere D, Feuerstein P (2008) Cumulus gene expression and oocyte competence. New approaches for non invasive embryo quality assessment. *Eshre Campus Workshop, Tours 11-12 April*
35. Köks S, Velthut A, Sarapik A *et al.* (2010) The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated antral follicles. *Mol Hum Reprod* 16 : 229-40
36. Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I *et al.* (2010) Cumulus gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod Epub ahead of print*
37. Royère D, Feuerstein P, Cadoret V *et al.* (2009) Non invasive assessment of embryo quality: proteomics, metabolomics and oocyte-cumulus dialogue. *Gynecol Obstet Fertil* 37: 917-20

D. K. Gardner

Embryo metabolism and *in vitro* culture

Introduction

The mammalian pre-implantation embryo, perhaps more than any other cell type, has proved difficult to culture successfully. A primary reason for this is that during the period, spanning fertilization to implantation, the embryo undergoes remarkable changes in gene expression, biosynthesis, physiology, and metabolism. In effect, each day of development is analogous to trying to culture a different cell type. Understanding the underlying metabolic changes during development has, therefore, been of great value in optimizing culture conditions for the pre-implantation embryo. In this chapter, the dynamics and regulation of metabolism are considered, and the development and application of novel culture systems for the human embryo described.

Nutrition and metabolism of the embryo

Successful early embryo development is dependent on the embryo's ability to generate energy through appropriate metabolic pathway(s) at specific times during the pre-implantation/pre-attachment period. The significance of energy metabolism during mammalian embryo development cannot be understated, as impairment of metabolism is associated with developmental delay, loss of viability, or complete arrest (1, 2).

Unlike most somatic cells in culture, the mammalian embryo does not utilize glucose as a major energy source until after compaction. Rather than using this hexose, the early embryo utilizes pyruvate, lactate, and/or amino acids (3–6) to generate the required energy. Pyruvate enters the embryo both passively and by means of a facilitated carrier (7), and is the preferred nutrient for the cleavage-

stage embryo of several species including humans (8, 9). Although lactate is taken up by the pronucleate oocyte and is metabolized to some degree, until recently it was thought that the pronucleate oocyte had an absolute requirement for pyruvate to support the first cleavage division (10). A primary function of pyruvate conversion to lactate in cells is to regenerate NAD^+ for subsequent use in glycolysis when under anaerobic conditions, and for the embryo this is of greatest significance at the blastocyst stage. Cytosolic regeneration of NAD^+ is required as the cytoplasmic and mitochondrial pools of NADH are not shared. Rather, the reducing power between these two distinct cellular compartments is transferred through specific systems such as the malate-aspartate shuttle. It has recently been demonstrated that in the pre-implantation embryo the malate-aspartate shuttle is involved in the metabolism of carboxylic acids and certain amino acids (11). Significantly, it has now been resolved that the pronucleate oocyte does not have an absolute requirement for pyruvate as speculated over 40 years ago (10), but rather it can undergo viable development in the complete absence of pyruvate, provided that lactate and aspartate are present at the appropriate levels (11). Furthermore, perturbations in the activity of this shuttle results in compromised embryonic and fetal development (12), revealing the physiological significance of the shuttle during embryo development.

The pronucleate oocyte and blastocyst differ in their ability to metabolize pyruvate and lactate. Such differences can be accounted for by a change in the intracellular NAD-NADH ratio, which in turn is affected by the ratio of pyruvate-lactate (13). Therefore, by changing the ratio of certain medium components one can inadvertently change the ratio of important intracellular regulators. For example, a gradient of lactate in the culture medium can have a significant effect on mouse

embryo viability. Exposure of the cleavage-stage embryo to a high lactate concentration ($\approx 23\text{mM}$), is associated with increased viability. However, post-compaction viability is improved when embryos are exposed to lower lactate levels ($\sim 5\text{ mM}$) (14). Significantly, the cleavage-stage embryo and blastocyst have completely different requirements and utilization of carboxylic acids. Interestingly, the redox status created by the pyruvate:lactate ratio affects glucose metabolism (13), highlighting the complexities and integrated nature of metabolic processes.

The early embryo is characterized by low levels of oxidative metabolism and low oxygen consumption, whereas the later stages (i.e., post-compaction) exhibit both high levels of glycolysis and high oxygen consumption (15–17). The relatively low level of metabolism in the pre-compacted embryo reflects the quiescent state of the oocyte, which remains energetically dormant within the ovary for a considerable amount of time. As the oocyte and zygote have relatively low levels of biosynthesis prior to embryonic genome activation and expression, there exists a high ATP/ADP ratio within the blastomeres (18), which in turn allosterically regulates carbon flux through the glycolytic pathway (19). As the embryo becomes increasingly transcriptionally active (20) and protein synthesis increases (21), and as the blastocoel is formed through the action of the basolateral ATPases (22), the ATP/ADP ratio falls as a result of an increase in energy demand and an increased glycolytic flux becomes possible.

The human blastocyst exhibits high levels of glycolysis (9, 23) even in the presence of adequate levels of oxygen for oxidative metabolism, termed 'aerobic glycolysis' also known as the 'Warburg effect'. One interpretation of this type of metabolism is the embryo's adaptation to its imminent invasion of the endometrium, which remains avascular for a period of up to 12 h, and will therefore be relatively anoxic (24, 25). It is plausible that glycolysis will be the predominant means of generating energy during implantation (2). A further explanation for the idiosyncratic metabolism of the mammalian blastocyst is that a high level of aerobic glycolysis is a common characteristic of proliferating cells such as tumors, with which the mammalian blastocyst shares several traits (1, 26–28). As well as being used to generate energy for blastocoel expansion and mitosis, high levels of glucose utilization will be required for the synthesis of triacylglycerols and phospholipids and to provide precursors for complex sugars of mucopolysaccharides and glycoproteins. Glucose metabolized by the pentose phosphate pathway

(PPP) generates ribose moieties required for nucleic acid synthesis and the NADPH required for the biosynthesis of lipids and other complex molecules (29). NADPH is also required for the reduction of intracellular glutathione, an important antioxidant for the embryo (30). The production of nucleic acids is a key biosynthetic role of glucose in the blastocyst. It is therefore feasible that high levels of aerobic glycolysis in the blastocyst will ensure that there is sufficient substrate available for biosynthetic pathways, such as DNA replication, RNA transcription, and synthesis of new membranes, at the required times during cellular proliferation (31). This in turn suggests that there are times within the cell cycle during which the PPP is more active than others.

As well as considerable capacity for the formation of lactate from glucose, the mammalian blastocyst also exhibits high oxidative activity (16, 17). Interestingly, the malate-aspartate shuttle of different tumors can contribute between 20% and 80% of the total respiratory rate (32, 33). As the mammalian blastocyst has a high respiratory quotient combined with high levels of lactate production, it is plausible that glycolysis can be used to derive ATP oxidatively through the malate-aspartate shuttle (11).

Composition of oviduct and uterine fluids

The concentration of all individual components of the fluids of the reproductive tract remains to be fully characterized, but we know that the developing embryo is exposed to ions, carbohydrates, amino acids, fatty acids, ketone bodies, albumin, glycosaminoglycans, glycoproteins, and growth factors (34, 35).

During the pre-implantation period, the human embryo has access to a specific and changing nutrient pool within the reproductive tract. Analysis of fluid within the human fallopian tube and uterine fluids revealed that carbohydrate levels do change with the day of estrous or menstrual cycle (36). Significantly, glucose levels are at their lowest (0.5 mM) and pyruvate (0.32 mM) and lactate (10.5 mM) levels at their highest in the fallopian tube at the time when the early embryo is present. In contrast, in the uterus, glucose is present at a much higher level (3.15 mM), whereas pyruvate (0.1 mM) and lactate (5.87 mM) are significantly lower than in the fallopian tube (36). Such nutrient availability mirrors the energy requirements of the developing embryo.

Furthermore, oviduct and uterine fluids of all mammalian species studied so far are characterized by high levels of free amino acids (37–41). Specifically, the amino acids alanine, aspartate, glutamate, glycine, serine, proline, and taurine are present at high concentrations. The fact that both oocytes and embryos possess specific transport systems for amino acids (42, 43), readily take them up from the surrounding culture medium (44, 45), and maintain an endogenous pool (46) indicate that amino acids have a physiological role in the pre-implantation/pre-attachment period of mammalian embryo development. *In vitro* analysis of the embryo has confirmed that amino acids are key regulators of embryo development (1).

Culture media for the human embryo

An important consideration, especially when one is trying to formulate culture media, is that looking at individual substrates may be misleading, as the embryo will be exposed to and utilizes several nutrients at one time, with complicated and important interactions existing between them. Indeed, the mammalian embryo possesses a considerable degree of plasticity and can adapt to the absence of one substrate by increasing its utilization of others (7). Furthermore, inadequate culture conditions *in vitro* induce serious metabolic aberrations in the embryo, whereby the pattern of energy metabolism is significantly different from that of embryos developed *in vivo* (14, 40, 47, 48). It appears that the more unphysiological the culture conditions are, the greater the metabolic stress placed on the embryo, which in turn is associated with loss of developmental competence (1).

It is evident that the composition of the media used has a significant effect on embryo development and viability (4, 6, 49, 50). Today, in contrast to 15 years, one can purchase ready-to-use embryo culture media from several companies. All but gone are days of in-house media preparation. One reason for this is the impact of regulatory bodies that oversee human *in vitro* fertilization (IVF). Another reason is that modern embryo culture media have increased in complexity and are therefore considerably more difficult to prepare and to ensure the highest quality.

Initially, human IVF used media developed for tissues culture (i.e., Ham's F10) or those media derived from the original culture media developed for F1 mice embryos back in the 1970s (51). Neither of the approaches can be considered opti-

mised, and in the mid-1980s, media designed specifically for the human embryo started to appear (52, 53). Subsequently, there was resurgence of interest in mammalian embryo culture, and in the following years, several changes to media were made. One of the most significant developments in embryo culture media was the recognition that amino acids fulfil several important niches during the pre-implantation developmental period. The laboratories of Gwatkin (54, 55), Pedersen (56), Bavister (57), and Gardner (58, 59) all determined that specific amino acids had a positive impact on embryo development, whereas interestingly some amino acids actually exhibited a negative effect. What did become clear, however, was that during the pre-implantation period the embryo changes its utilization of amino acids (60). A developing theme was that the cleavage-stage embryo was stimulated by those amino acids present at high levels in oviduct fluid, whereas at later stages, the post-compacted embryo requires a wider array of amino acids.

Among those amino acids found to stimulate the cleavage-stage embryo were alanine, glutamate, glycine, proline, serine, and taurine i.e. those at high levels in the oviduct. Interestingly, such amino acids are used by simple and unicellular organisms to assist in the regulation of intracellular homeostasis (1, 61, 62). *In vitro* studies on the cleavage-stage mammalian embryo have revealed that such amino acids are in fact used by the embryo to regulate such intracellular functions (63, 64). Significantly, specific amino acids are essential for the maintenance of cellular physiology. Prior to the generation of the first transporting epithelium at compaction, the individual blastomeres of the embryo have limited means of controlling their intracellular environment, and are therefore at the mercy of the surrounding fluids. An adaptive response to this situation faced by unicellular organisms is the use of amino acids to stabilize protein function (65, 66). Amino acids can do this by acting as osmolytes (63, 67, 68) to protect against ionic stress, as antioxidants (69) and as buffers of intracellular pH (64). It is therefore proposed that specific amino acids not only serve as a suitable energy source for the embryo (70) but can act as regulators of energy metabolism (1) and therefore confer a considerable degree of protection for intracellular function (62). Furthermore, post-compaction when the embryo has created a transporting epithelium, such amino acids are not required to regulate intracellular function. This indicates that the embryo post-compaction is far more robust an entity than the cleavage stages (71).

Of general interest, those amino acids that appear at high levels within the mammalian oviduct have a striking homology to those found in Eagle's non-essential amino acids (72), defined as those amino acids not required by somatic cells in culture. Subsequently there have been numerous publications using the "non-essential" group and their effects on mammalian pre-implantation embryos. However, it must be pointed out that this term has nothing to do with embryology, and with hindsight perhaps a more suitable name will be used in the future. Those amino acids classified as essential (i.e., required by somatic cells in culture) cannot substitute for the non-essential amino acids prior to compaction in fulfilling these important intracellular niches (64).

Lessons learned from such work include that the oocyte, pronucleate oocyte, and cleavage stages are dependent on specific amino acids to regulate intracellular function. It is therefore paramount that such amino acids are included in all media that the oocyte and early embryos are exposed to. Subsequently, if one wishes to culture embryos to the blastocyst stage then a more comprehensive array of amino acids is required.

To summarize; the embryo changes its carbohydrate preference as it develops (73), which reflect changes in its energy metabolism (1). Concomitantly, the embryo changes its requirements for amino acids to sustain development and differentiation (60). Significantly, the embryo *in vivo* is exposed to gradients of nutrients (36), gradients which appear to mirror the changing physiology and needs of the embryo.

Consequently, two schools of thought exist: one is that embryos should be cultured in successive media to accommodate the changes in nutrient preferences in metabolism (40). The second is that one simply needs to provide the embryo with all the nutrients at one concentration throughout the entire pre-implantation period and then let the embryo use what it requires (6). In our experience, although the latter approach does support blastocyst development in a number of species (74), by applying a more dynamic approach to embryo culture, that is using media in sequence (or sequential media), one gets faster-growing embryos, that results in blastocysts with more cells and higher viability (75, 76).

For over a decade, sequential media have been used clinically by numerous ART programs. Although it can be difficult to compare data from different clinics, because of potential differences in patient populations, etc., one can derive a good indication

of the efficacy by examining their oocyte donor data. In such cases, the oocytes are typically from women less than 30 years old, and therefore represent a source of gametes with high viability. Oocyte donors therefore not only represent an excellent means to quantify the ability of a laboratory to culture human embryos but also serve as an invaluable group of patients for use in quality management. Using sequential culture media, combined with blastocyst transfer, implantation rates (fetal heart beat) of 65% can be attained, with a clinical pregnancy rate of greater than 85% when two embryos are transferred (77). Clearly, such new sequential media are highly effective in a clinical setting (78).

Problems with static culture *in vitro*

Although embryo culture media have become more physiological, for example with the inclusion of amino acids, and as a result have become more effective, one still faces the problems of working outside the female reproductive tract and in a polystyrene culture dish. This can hardly be considered physiological. This means that the culture *in vitro* can lead to the development of artifacts that could harm the embryo. The best-documented example of this is the production of ammonium from amino acids (58, 79).

Although amino acids are metabolized by embryos and subsequently release ammonium *in vivo*, this ammonium is subsequently removed by the epithelial cells of the female reproductive tract, passed through the circulation and subsequently detoxified by the urea cycle in the liver. However, in a static culture system any ammonium produced by embryonic metabolism simply builds up in the medium (58). To add insult to injury, the amino acids themselves (especially glutamine) are labile at 37°C and spontaneously deaminate to release ammonium (58). In humans, ammonium production by the embryo is far greater than that in mice (58, 80), indicating that human embryos have a high utilization of amino acids and that they actively change the composition of their environment *in vitro*. The reason that this is a cause for concern is that ammonium has been documented to affect several cellular processes in embryos including decreased blastocyst development, impaired inner cell mass formation, perturbed metabolism, increased apoptosis, and altered gene expression (71, 79, 81, 82). More alarmingly, if embryos are transferred after exposure to ammonium in culture, the resultant fetuses may be retarded, and in some cases exhibit neural tube defects (59, 83).

Several possible remedies to this problem have been attempted including *in situ* transamination of free amino acids to glutamate by adding enzymes and substrates to the medium (84). Although effective, this approach is far from practical. An alternative approach is to remove the most labile amino acid, glutamine, and replace it with a stable dipeptide form such as alanyl or glycyl glutamine (85, 86). This approach greatly decreases the production of ammonium in the medium. However, given that the deamination of amino acids other than glutamine can still produce toxic levels of ammonium, resulting in neural tube defects post transfer in mice (59, 86), it is most important that the medium be renewed every 48h.

Supplements

The most common supplement is human serum albumin (HSA), typically in the form of albumin derived from blood. Although effective, such a source of albumin carries with it the finite possibility of disease transmission, especially in the form of prions. An alternative to blood-derived albumin is recombinant human albumin. This not only has been shown to be equally as effective (87), but also has the added advantage of increasing the ability of embryos to survive cryopreservation (88).

Other components of human serum documented to be an effective supplement to albumin are α - and β -globulins (89). However, their efficiency is yet to be determined in prospective randomized trials. The most abundant macromolecules within the oviduct are mucins (90). However, their role in embryo development remains to be elucidated. Another macromolecule present within the female reproductive tract, and present at increasing levels in the uterus at the time of implantation in the mouse, is the glycosaminoglycan hyaluronan (91). Unlike other glycosaminoglycans, hyaluronan contains no protein moieties and can therefore be synthesized *in vitro* under FDA-approved conditions using recombinant technology. The supplementation of hyaluronan to embryo culture media not only results in increased cryo-tolerance of the embryos of several species including humans (88, 92–96), but enhances implantation post transfer (97, 98). One supplement that was popular in the early days of IVF, serum, is no longer considered favorably. The exposure of gametes and embryos to serum induces trauma, resulting in altered organelle ultra structure, perturbed metabolism (specifically loss of oxidative capacity), altered gene expression, aberration of

imprinting, and ultimately altered fetal development (99–101). It is therefore the opinion of the author that no gamete or embryo should be exposed to whole serum.

Gas phase, pH, and incubation chambers

Embryo culture media typically utilize a bicarbonate/ CO_2 buffering system to regulate the pH. This is achieved by the inclusion of 20–25 mM NaHCO_3 in the culture medium and the use of a 5–7% CO_2 atmosphere using a tissue culture chamber. Historically, embryo culture media are used at pH 7.4. However, analysis of the intracellular pH (pHi) of the mammalian embryo has revealed that it is actually around 7.2–7.3 (102–104); therefore, there has been a trend to decrease the pH of human embryo culture medium to 7.2–7.35.

Interestingly, the actual pH of the culture medium does not necessarily reflect that of the oocyte and the embryo (102). Rather, by including specific amino acids in the culture medium, the embryo is able to buffer its changes in media pH (64). Furthermore, the ratios of the carboxylic acids lactate and pyruvate also impact intracellular pH (102). However, it would appear prudent to have a medium pH of 7.2–7.35, as one does not wish to go over a pH of 7.4. If one sets the medium pH to 7.4, then it quickly increases when the embryos culture dish is taken out of the incubator, culminating in a rapid increase in medium pH that will affect embryonic development.

It is therefore important to monitor the pH of the media and CO_2 environment within the incubator. The pH of a CO_2 /bicarbonate buffered medium is not easy to quantitate. A pH electrode can be used, but one must be quick and the same technician must take all readings to ensure consistency. Solid-state probes are now available with a higher degree of accuracy. An alternative approach is to take samples of medium and measure the pH with a blood-gas analyzer. A final method necessitates the presence of phenol red in the culture medium and the use of Sorenson's phosphate buffer standards. This method allows visual inspection of a medium's pH with a tube in the incubator but is accurate to only 0.2 pH units (85). Typically, Fyrite has been employed to quantitate CO_2 within the chamber used. However, the accuracy of such a procedure is rather low. Fortunately, there are now available new hand-held infrared (IR) CO_2 analysis meters with very high accuracy (to 0.1%) (e.g., Vaisala, Helsinki, Finland).

Historically, embryo culture has been preformed at ambient O_2 , which is around 20%. This is in spite of the fact that the levels of O_2 in the female reproductive tract are significantly less at only around 5–7% (105–108). Furthermore, in several mammalian species it has been demonstrated that embryo development and subsequent viability are increased when embryos are cultured in O_2 concentration of just 5% (109–113). The pathologies associated with the use of high O_2 include retarded embryo development, altered metabolism, perturbed gene expression, and a changed proteome, culminating in loss of viability (71, 113, 114). Recent clinical data support the move to a reduced oxygen concentration for the culture of human embryos (115, 116).

Some clinics have been deterred from employing a low O_2 environment because of the concerns of the cost associated with the purchase of new incubators capable of regulating both CO_2 and O_2 concentrations. However, compared with a conventional CO_2 incubator, multi-gas incubators are not that much more expensive (only around 10–20%). Their capacity to maintain their internal environment is further enhanced by the inclusion of inner glass doors, which prevents the gas phase from being totally disrupted throughout the chamber when the main door is opened. Alternatives to multi-gas are modular chambers or even desiccators. Such chambers are purged with the gas from a mixed cylinder (e.g., 5% O_2 , 6% CO_2 , 89% N_2). Inside such chambers, embryos are effectively isolated from the laboratory and environment within the incubator (113). Although effective, this approach is not very practical for a busy IVF clinic. For practicality, multi-gas chambers are the preferred method. Realistically, one should have two chambers per 40–50 patients (117): one chamber for media equilibration in dishes or test tubes and the other chamber for gamete and embryo culture only. Should one utilize a tissue culture incubator, ensure that the CO_2 sensor is infra red and not a thermocouple type, as the latter can be responsible for too much pH drift caused by fluctuations in humidity. The O_2 concentration in multi-gas chambers is regulated by the injection of N_2 to purge the ambient O_2 down to that required, typically 5–7%. Such N_2 can be supplied from N_2 cylinders, a liquid N_2 tank with appropriate regulator, or an N_2 generator. Your choice will be influenced by the number of chambers required, which in turn is determined by patient volume.

Conclusions

It is evident that the pre-implantation period of embryonic development is highly dynamic and

underlying all of the changes from fertilization to implantation are changes in nutrient uptake and utilization. Regulation of energy metabolism is key to maintaining embryo viability, and a loss in metabolic regulation is associated with a loss of viability. Therefore, analysis of metabolism not only has been useful in the development of modern culture media, but also will plausibly form the basis of viability assays aimed at selecting the most viable embryo for transfer (118). Modern culture media are able to support development of human embryos through to the blastocyst stage. Whether embryos are transferred during the cleavage stages or late at the blastocyst stage, it is evident that pregnancy rates around the world have increased significantly over the past decade. These increases can be largely attributed to more effective laboratory conditions.

References

1. Gardner DK (1998) Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49: 83–102
2. Lane M, Gardner DK (1996) Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 11: 1975–1978
3. Leese HJ (1991) Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf Rev Reprod Biol* 3: 35–72
4. Bavister BD (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1: 91–148
5. Gardner DK, Lane M (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 3: 367–382
6. Summers MC, Biggers JD (2003) Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 9: 557–582
7. Gardner DK, Leese HJ (1998) The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* 104: 423–429
8. Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, *et al.* (1989) Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 4: 188–191
9. Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ (1990) Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 5: 104–108
10. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 560–567
11. Lane M, Gardner DK (2005) Mitochondrial malate–aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. *J Biol Chem* 280: 18361–18367
12. Mitchell M, Cashman KS, Gardner DK, *et al.* (2009) Disruption of mitochondrial malate–aspartate shuttle activity in mouse blastocysts impairs viability and fetal growth. *Biol Reprod* 80: 295–301
13. Lane M, Gardner DK (2000) Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62: 16–22
14. Gardner DK, Sakkas D (1993) Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. *Hum Reprod* 8: 288–295

15. Mills RM, Brinster RL (1967) Oxygen consumption of pre-implantation mouse embryos. *Exp Cell Res* 47: 337–344
16. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 44: 476–485
17. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, *et al.* (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 106: 299–306
18. Leese HJ, Biggers JD, Mroz EA, Lechene C (1984) Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem* 140: 443–448
19. Biggers JD, Gardner DK, Leese HJ (1989) Control of carbohydrate metabolism in preimplantation mammalian embryos. In: Rosenblum IY, Heyner S (eds) *Growth factors in mammalian embryos*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 19–36
20. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26: 90–100
21. Frei RE, Schultz GA, Church RB (1989) Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86: 637–641
22. Benos DJ (1981) Developmental changes in epithelial transport characteristics of preimplantation rabbit blastocysts. *J Physiol* 316: 191–202
23. Van den Bergh M, Devreker F (2001) Glycolytic activity: a possible tool for human blastocyst selection. *Reprod BioMed Online* 3(Suppl. 1): 8
24. Rogers PAW, Murphy CR, Gannon BJ (1982) Absence of capillaries in the endometrium surrounding the implanting rat blastocyst. *Micron* 13: 373–374
25. Rogers PA, Murphy CR, Rogers AW, Gannon BJ (1983) Capillary patency and permeability in the endometrium surrounding the implanting rat blastocyst. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 241–249
26. Hume DA, Weidemann MJ (1979) Role and regulation of glucose metabolism in proliferating cells. *J Natl Cancer Inst* 62: 3–8
27. Morgan MJ, Faik P (1981) Carbohydrate metabolism in cultured animal cells. *Biosci Rep* 1: 669–686
28. Mandel LJ (1986) Energy metabolism of cellular activation, growth, and transformation. *Curr Top Memb Trans* 27: 261–291
29. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1980) The pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J Biol Chem* 255: 5616–5626
30. Rieger D (1992) Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 37: 75–93
31. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS (1985) The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep* 5: 393–400
32. Greenhouse WV, Lehninger AL (1976) Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. *Cancer Res* 36: 1392–1396
33. Greenhouse WV, Lehninger AL (1977) Magnitude of malate-aspartate reduced nicotinamide adenine dinucleotide shuttle activity in intact respiring tumor cells. *Cancer Res* 37: 4173–4181
34. Leese HJ (1988) The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 82: 843–856
35. Hunter RH (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 39: 176–181
36. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J (1996) Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65: 349–353
37. Perkins JL, Goode L (1967) Free amino acids in the oviduct fluid of the ewe. *J Reprod Fertil* 14: 309–311
38. Casslen BG (1987) Free amino acids in human uterine fluid. possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med* 32: 181–184
39. Miller JG, Schultz GA (1987) Amino acid content of pre-implantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* 36: 125–129
40. Gardner DK, Leese HJ (1990) Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J Reprod Fertil* 88: 361–368
41. Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, *et al.* (2005) Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 64: 992–1006
42. Van Winkle LJ (1988) Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 947: 173–208
43. Van Winkle LJ (2001) Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol Reprod* 64: 1–12
44. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, *et al.* (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 17: 999–1005
45. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, *et al.* (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19: 2319–2324
46. Schultz GA, Kaye PL, McKay DJ, Johnson MH (1981) Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and pre-implantation embryos. *J Reprod Fertil* 61: 387–393
47. Menke TM, McLaren A (1970) Mouse blastocysts grown *in vivo* and *in vitro*: carbon dioxide production and trophoblast outgrowth. *J Reprod Fertil* 23: 117–127
48. Lane M, Gardner DK (1988) Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 13: 991–997
49. Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner DK (eds) *Handbook of *in vitro* fertilization*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 85–114
50. Gardner DK, Pool TB, Lane M (2000) Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med* 18: 205–218
51. Gardner DK (2008) Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev* 20: 9–18
52. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985) Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44: 493–498
53. Menezo Y, Testart J, Perrone D (1984) Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 42: 750–755
54. Gwatkin RB (1966) Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro*. *J Cell Comp Physiol* 68: 335–344
55. Gwatkin RB, Haidri AA (1973) Requirements for the maturation of hamster oocytes *in vitro*. *Exp Cell Res* 76: 1–7
56. Spindle AI, Pedersen RA (1972) Hatching attachment, and outgrowth of mouse blastocysts *in vitro*: Fixed nitrogen requirements. *J Exp Zool* 186: 305–318
57. Bavister BD, McKiernan SH. Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. In: Bavister BD (ed) *Preimplantation embryo development*. Springer-Verlag, New York, pp 57–72
58. Gardner DK, Lane M (1993) Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48: 377–385
59. Lane M, Gardner DK (1994) Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 102: 305–312

60. Lane M, Gardner DK (1997) Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 109: 153–164
61. Lane M (2001) Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* 55: 225–236
62. Lane M, Gardner DK (2005) Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reprod Fertil Dev* 17: 371–378
63. Dawson KM, Collins JL, Baltz JM (1998) Osmolarity-dependent glycine accumulation indicates a role for glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 59: 225–232
64. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK (1998) Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 13: 3441–3448
65. Kinne RK (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. *J Exp Zool* 265: 346–355
66. Ballantyne JS, Chamberlin ME (1995) Regulation of cellular amino acid levels. In: Strange K (ed) *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 111–122
67. Van Winkle LJ, Haghighat N, Campione AL (1990) Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *J Exp Zool* 253: 215–219
68. Biggers JD, Lawitts JA, Lechene CP (1993) The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 34: 380–390
69. Li J, Foote RH, Simkin M (1993) Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol Reprod* 49: 33–37
70. Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ (1992) Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4: 547–557
71. Gardner DK, Lane M (2005) Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 17: 361
72. Eagle H (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130: 432–437.
73. Leese HJ, Barton AM (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 72: 9–13
74. Gardner DK, Lane M (2002) Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. In: Cibelli R, Lanza K, Campbell AK, West MD (eds) *Principles of cloning*, Chapter 9, Elsevier Science, pp 187–213
75. Gardner D, Lane M (2003) Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 6: 470–481
76. Reed LC, Lane M, Gardner DK (2003) In vivo rates of mouse embryo development can be attained in vitro. *Theriogenology* 59: 349
77. Schoolcraft WB, Gardner DK (2000) Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil Steril* 74: 482–486
78. Wilson M, Hartke K, Kiehl M, *et al.* (2004) Transfer of blastocysts and morulae on day 5. *Fertil Steril* 82: 327–333
79. Virant-Klun I, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, *et al.* (2006) Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 85: 526–528
80. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76: 1175–1180
81. Lane M, Gardner DK (2003) Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 69: 1109–1117
82. Zander DL, Thompson JG, Lane M (2006) Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod* 74: 288–294
83. Sinawat S, Hsaio WC, Flockhart JH, *et al.* (2003) Fetal abnormalities produced after preimplantation exposure of mouse embryos to ammonium chloride. *Hum Reprod* 18: 2157–2165
84. Lane M, Gardner DK (1995) Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate. *J Exp Zool* 271: 356–363
85. Gardner DK, Lane M (1999) Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner DK (eds) *Handbook of in vitro fertilization*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 205–264
86. Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA (2004) Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 9: 59–69
87. Bungum M, Humaidan P, Bungum L (2002) Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 4: 233–236
88. Lane M, Maybach JM, Hooper K, *et al.* (2003) Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol Reprod Dev* 64: 70–78
89. Weathersbee PS, Pool TB, Ord T (1995) Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J Assist Reprod Genet* 12: 354–360
90. Pool TB (2002) Recent advances in the production of viable human embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 4: 294–302
91. Carson DD, Dutt A, Tang JP (1987) Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev Biol* 120: 228–235
92. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, *et al.* (2002) Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124: 141–153
93. Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Brena P, *et al.* (2006) Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol Reprod Dev* 73: 1503–1511
94. Palasz AT, Brena PB, Martinez MF, *et al.* (2008) Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote* 16: 39–47
95. Dattena M, Mara L, Bin TA, Cappai P (2007) Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. *Mol Reprod Dev* 74: 42–47
96. Balaban B, Urman B (2005) Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 10: 485–491
97. Gardner DK, Rodriguez-Martinez H, Lane M (1999) Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum Reprod* 14: 2575–2580
98. Urman B, Yakin K, Ata B, *et al.* (2008) Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 90: 604–612
99. Gardner DK (1994) Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int* 18: 1163–1179

100. Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, *et al.* (1995) Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53: 1385–1391
101. Khosla S, Dean W, Brown D, *et al.* (2001) Culture of pre-implantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 64: 918–926
102. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK (1998) Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Mol Reprod Dev* 50: 434–442
103. Lane M, Baltz JM, Bavister BD (1998) Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen (Na⁺/H⁺) antiporter. *Biol Reprod* 59: 1483–1490
104. Phillips KP, Leveille MC, Claman P, Baltz JM (2000) Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 15: 896–904
105. Mastroianni L, Jr, Jones R (1965) Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 147: 99–102
106. Ross RN, Graves CN (1974) O₂ levels in female rabbit reproductive tract. *J Anim Sci* 39: 994
107. Maas DH, Stein B, Metzger H (1984) PO₂ and pH measurements within the rabbit oviduct following tubal microsurgery: reanastomosis of previously dissected tubes. *Adv Exp Med Biol* 169: 561–570
108. Fischer B, Bavister BD (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99: 673–679
109. Quinn P, Harlow GM (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J Exp Zool* 206: 73–80
110. Harlow GM, Quinn P (1979) Foetal and placenta growth in the mouse after pre-implantation development *in vitro* under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Aust J Biol Sci* 32: 363–369
111. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, *et al.* (1990) Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of pre-implantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* 89: 573–578
112. Batt PA, Gardner DK, Cameron AW (1991) Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 3: 601–607
113. Gardner DK, Lane M (1996) Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 11: 2703–2712
114. Katz-Jaffe MG, Linck DW, Schoolcraft WB, Gardner DK (2005) A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction* 130: 899–905
115. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, *et al.* (2009) A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod* 24: 300–307
116. Nanassy L, Peterson CA, Wilcox AL, *et al.* (2009) Comparison of 5% and ambient oxygen during days 3–5 of *in vitro* culture of human embryos. *Fertil Steril* (Epub ahead of print)
117. Gardner DK, Lane M (2009) Culture systems for human embryo. In: Gardner DK, Weissman A, Howles C, Shoham Z, (eds) *Textbook of assisted reproductive techniques laboratory and clinical perspectives*, 3rd edn. Inform Healthcare, London, pp 219–240
118. Gardner DK, Sakkas D (2003) Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer – a review. *Placenta* 24 Suppl. B: S5–S12

Y. Ménézou, A. Hazout,
A. Veiga, E.J. Servy,
P. Cohen-Bacrie,
J. Chouteau, A.M. Junca
et M. Dumont

Culture embryonnaire prolongée et éclosion assistée

Culture embryonnaire prolongée

Introduction

La culture prolongée correspondait au départ à une nécessité : les biotechnologies chez les animaux domestiques à intérêt zootechnique nécessitent, pour le transfert embryonnaire, un transfert au stade blastocyste. En effet, le transfert aux stades précoces, après fécondation *in vitro* et culture de courte durée, n'est tout simplement pas possible : les embryons sont expulsés de l'utérus. Seul le transfert de morula tardives (5 jours) ou de blastocyste est opérant. Les problèmes de culture de l'embryon du stade 1 au blastocyste se heurtent, dans de nombreux cas, à un blocage au moment du cycle cellulaire correspondant à la transition du contrôle maternel au contrôle embryonnaire (MZT ou *maternal to zygotic transition*) : souris : 2-4 C, homme : 4-8 C, vache, lapin : 8-16 C. Ce cycle cellulaire dure en moyenne 24 heures pendant lesquelles démarrent les premières transcriptions embryonnaires ; l'embryon prend son autonomie par rapport aux réserves d'ARN et de protéines stockées pendant la croissance de l'ovocyte, qui se sont épuisées pendant les premières divisions. Il est par ailleurs toujours très difficile de reproduire efficacement les conditions *in vivo* pour les reproduire en culture *in vitro*. Les rendements dépassent très rarement 50 %. La coculture, *i.e.* la culture de l'embryon avec des cellules somatiques, a alors été une étape évidente.

La coculture des embryons de bovins avec des vésicules trophoblastiques, impliquant un système embryotrophique autocrine, a été la première technologie permettant l'obtention de veaux vivants par culture embryonnaire d'embryons du stade 1-cellule au blastocyste puis transfert embryonnaire (1, 2). Puis, naturellement, les cellules épithéliales du tractus génital femelle (utilisation d'un effet paracrine) ont été utilisées (3). Les premiers essais chez les primates concernaient les cellules tubaires humaines (4) et utérines (singe) (5). Ensuite, la démonstration que la culture embryonnaire *in vitro* n'était pas hormonodépendante (6) a permis le passage à des lignées établies d'origine

non génitale, notamment les cellules Vero, cellules épithéliales de rein de singe, utilisées en pharmacie industrielle pour la fabrication des vaccins (7-10), largement employées en FIV humaine, et les cellules BRL (*buffalo rat liver*) utilisées chez les bovins. Si l'utilisation de la coculture perdure pour les utilisations biotechnologiques vétérinaires, cette technique a été plutôt abandonnée pour la FIV humaine, surtout en ce qui concerne l'utilisation de lignées établies.

Depuis, deux types de milieux définis de culture sont actuellement utilisés : 1) les milieux dits « séquentiels » : un premier milieu est utilisé jusqu'à l'activation génomique, puis un autre est employé à partir du stade j3 ; 2) les milieux utilisés de la fécondation à l'obtention du blastocyste sans modification de formule.

Différentes techniques

Le développement embryonnaire préimplantatoire est biphasique. Les premières divisions se réalisent à partir des réserves maternelles, stockées durant la croissance ovocytaire. Cette première phase est nécessairement plus fragile. Ainsi, toute anomalie du stockage impliquant la division cellulaire et/ou la protection contre des agressions extérieures (ROS notamment) ou les régulations (réparation de l'ADN : « DNA repair ») peuvent amener soit à un arrêt de développement, soit au déclenchement de l'apoptose. Dans un deuxième temps, entre les stades 4 et 8 cellules, les transcriptions embryonnaires démarrent, l'embryon devient plus autonome et est alors capable de gérer plus efficacement les variations d'environnement. Le cycle de l'activation génomique est le plus long, il dure 24 heures, pour la plupart des mammifères, et c'est là que les arrêts de développement sont les plus fréquents. Cependant, cette vision est quand même un peu schématique, dans la mesure où des transcrits maternels importants perdurent aussi jusqu'au stade blastocyste où ils s'expriment.

Coculture

Elle peut être définie comme la culture simultanée de cellules somatiques avec l'embryon. Les premiers

essais datent des débuts des années 1980 et ont été liés à l'essor fantastique du transfert embryonnaire bovin, quand a été possible la FIV bovine.

La possibilité que la production des facteurs trophiques embryonnaires ne soit pas sous dépendance hormonale a été montrée d'abord chez la souris et les bovins par l'utilisation de cellules d'animaux prépubères (6), puis de cellules désynchronisées (11). Il est à remarquer que les systèmes de cocultures avec des cellules endométriales humaines ne plaident pas plus en faveur de l'hormonodépendance de la culture jusqu'au stade blastocyste, tout en ayant le désavantage de l'accessibilité et de la quantité de matériel cellulaire disponible. Il faut également prendre en considération le fait que les fibroblastes seuls sont de bien médiocres effecteurs du développement embryonnaire. De fait, cette efficacité trophique semble bien liée aux épithéliums transporteurs. C'est pourquoi les cellules Vero, cellules pérennisées, faciles à cultiver et très contrôlées, ont eu un succès important du fait de leur facilité d'utilisation. De fait, la majorité des informations quant aux régulations de la formation du blastocyste – effet paternels et maternels (8, 12, 13), sélection cytogénétique (14) ; jusqu'à la congélation (14, 15) et la biopsie (16) des blastocystes – ont été obtenues avec les cellules Vero. Cependant, il faut également noter que des techniques de cocultures autologues ont été mises au point à partir soit de biopsies d'endomètres (17, 18), soit de cellules du cumulus (19). Cependant, le problème des cellules non pérennisées réside dans un possible vieillissement qui peut altérer les capacités trophiques et dans le fait que ces cellules supportent assez mal le « repiquage ».

Milieux séquentiels

Ils sont basés sur l'aspect biphasique du développement embryonnaire préimplantatoire. Le premier milieu, de la fécondation au stade 8 cellules, doit être plus « protecteur ». Si nous prenons l'exemple des radicaux libres, inducteurs incontournables de l'apoptose embryonnaire, l'embryon possède, avant l'activation génomique, une capacité limitée à les neutraliser. *In vivo*, il est entouré de systèmes de protection redondants dans le tractus génital femelle. Par ailleurs, dans les conditions *in vitro*, il y a une génération spontanée de radicaux libres dans certains milieux trop « simples » (20). Il a été soutenu que certains acides aminés (AA), dont les AA essentiels soufrés, sont toxiques lors de la première phase de culture (G séries) (21). Ce concept est incorrect et par ailleurs dangereux : la déprivation des acides aminés soufrés est non seulement inductrice d'apoptose mais elle peut provoquer des anomalies d'empreinte. Par ailleurs, les acides

aminés soufrés entrent très fortement dans la protection antiradicalaire. Certains de ces milieux de première phase médiocres peuvent également augmenter le risque de jumeaux monozygotiques par absence d'acides aminés soufrés et excès de glucose, générateurs de radicaux libres via l'activité mitochondriale. Le risque mentionné de la formation excessive d'ammoniaque ne tient pas plus, dans la mesure où le carbonate d'ammonium formé dans les milieux de culture est très instable et libère l'ammoniac qui est éliminé par les flux gazeux. Il faut noter à ce propos que l'ammoniac libéré dans la coculture est recyclé par les cellules du support cellulaire. La teneur en glucose est réduite dans ces milieux de première phase afin de diminuer les risques d'apoptose induite par les radicaux libres.

Le milieu de deuxième phase est généralement plus riche et complet.

Il est à noter que la culture du stade zygote au stade blastocyste dans un seul milieu (global) est réalisable pour l'embryon humain qui a une certaine plasticité. Elle est quasi impossible pour les espèces domestiques à intérêt zootechnique.

Différences coculture/milieux simples

Il est assez communément admis que la coculture aboutit à de meilleurs résultats que les milieux dits « simplifiés », qu'ils soient séquentiels ou non (10, 22, 23). L'éclosion et la synthèse d'hCG sont notamment plus précoces. Dans notre expérience, la différence en faveur de la coculture a été très importante, surtout concernant la viabilité des blastocystes congelés. Il est plus que certain que les facteurs de croissance sont responsables de cette différence (24). Ils conjuguent effets trophiques et antiapoptotiques (GMCSF, IGF1). De fait, ces facteurs de croissance agissent dans un ensemble harmonieux : certains sont inhibiteurs d'autres activateurs. Ceci est spécialement vrai pour la régulation, dans le jeune blastocyste, du ratio masse cellulaire interne/trophoblaste (fig. 1).

Comme certaines cytokines (IL-6 mais surtout le LIF), ils améliorent la formation de blastocystes et l'éclosion. Le PAF semble également efficace. À l'heure actuelle, seul le GMCSF semble devoir avoir une application commerciale. Il faut noter que la plupart de ces facteurs de croissance souvent étudiés individuellement sont présents simultanément dans les systèmes de coculture : ceci est spécialement vrai pour le LIF et l'IL-6. Il faut noter que GP130, récepteur d'IL-6 et du LIF et le récepteur bêta du LIF sont présents sous forme de RNA, dans l'ovocyte et le jeune embryon. Le LIF intervient via la voie JAKs/STAT et freine l'apoptose (Ménézo et Tosti, communication personnelle). Ainsi, le même effecteur peut, de plus, utiliser

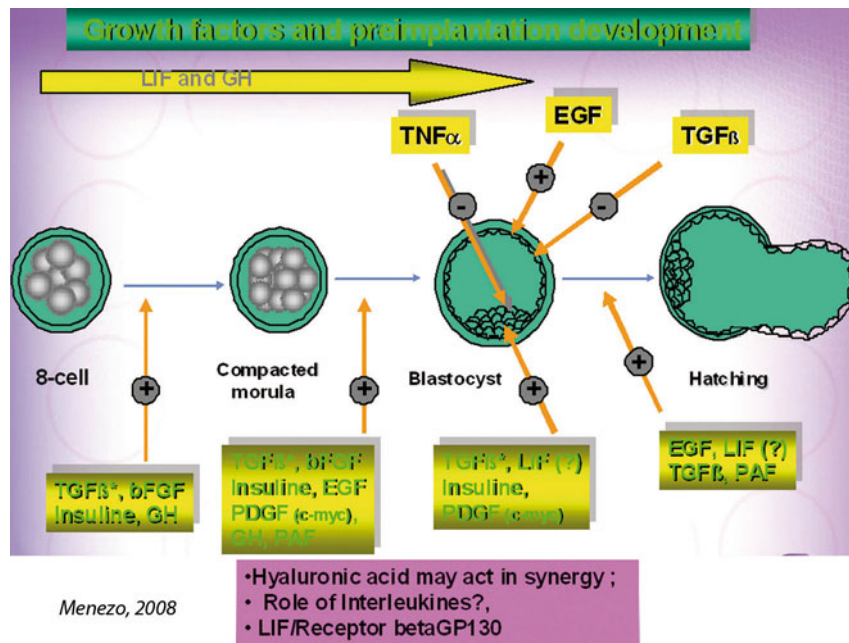


Fig. 1 – Facteurs de croissance et développement *in vitro* de l'embryon préimplantatoire.

deux récepteurs différents. D'une façon globale, la coculture donne de meilleurs résultats que tout facteur de croissance ajouté individuellement. C'est bien l'objet du débat quant à l'addition d'un facteur de croissance spécifique dans les milieux de culture. Encore une fois, c'est probablement l'équilibre entre effets activateurs et effets inhibiteurs qui permet, comme *in vivo* dans le tractus génital, une croissance harmonieuse. Les cellules épithéliales sécrètent aussi des anti-radicaux libres, protecteurs de l'embryon (hypotaurine, glutathion, etc.) (25). Une des conséquences immédiatement observable est l'absence de jumeaux monozygotes en coculture, au contraire des milieux séquentiels, parfois mal conçus (26). De toute façon, la formation de radicaux libres est spontanée dans les milieux de culture, incubés *in vitro* en présence d'oxygène (20).

Pourquoi la culture prolongée ?

De fait, tout transfert embryonnaire avant l'activation génomique est un geste « aveugle », même si certains critères cinétiques et morphologiques ont été respectés. Comme le stade morula compacte est un stade « fragile », impliquant un remodelage cellulaire total, le transfert au stade blastocyste devient une évidence. La controverse quant à l'aspect de la sélection des meilleurs embryons a perduré. D'un point de vue cytogénétique, le nombre d'anomalies chromosomiques est réduit au stade blastocyste, ce qui peut permettre une

sélection pour les porteurs de translocation (27). Cette sélection n'est cependant pas parfaite, pas plus d'ailleurs qu'elle ne l'est *in vivo* (voir trisomies). Par ailleurs, il peut se produire des régulations chromosomiques, dans le sens d'une amélioration, entre les stades de segmentation précoces et le blastocyste. Des embryons diagnostiqués « déséquilibrés » aux stades précoces par diagnostic préimplantatoire se retrouvent « normaux » au stade blastocyste (28). Certaines cellules anormales peuvent ainsi être exclues et ne pas participer à la compaction. Ces observations, associées à l'efficacité toute relative du diagnostic préimplantatoire, des aneuploïdies et autres déséquilibres chromosomiques, ont amené à une contestation vigoureuse de cette technique (29). Certaines équipes, notamment australiennes, privilégient d'ailleurs le diagnostic génétique des embryons au stade blastocyste (30, 31).

Les conséquences de cet aspect sélectif de la culture prolongée amènent à choisir le stade blastocyste toutes les fois que l'on veut privilégier le transfert d'un seul embryon : utérus malformé, volonté délibérée de la patiente de ne pas avoir de jumeaux, etc. En présence d'échecs répétés de transfert aux stades précoces, il est important de déterminer les capacités réelles de développement des embryons conçus. Seule la culture prolongée pourra apporter un élément de réponse. Par ailleurs, il faut ajouter que l'analyse de la qualité des blastocystes sur les critères morphologiques est aisée. La qualité et la densité de la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire), le début d'expansion sont des éléments favorables faciles à observer (fig. 2). Il

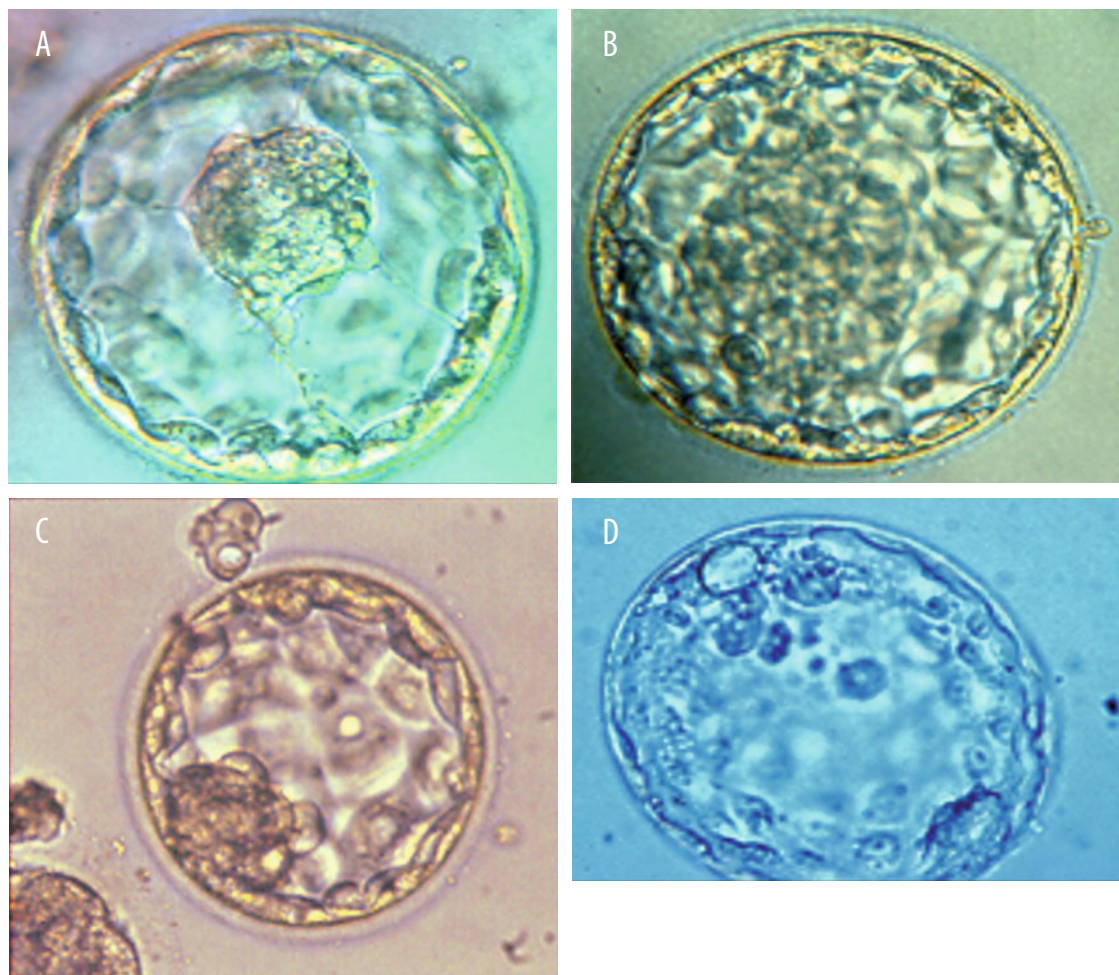


Fig. 2 – A : blastocyste expansé. La masse cellulaire interne est positionnée vers le haut. Noter les connexions émanant du bouton embryonnaire (Photo A. Veiga, avec permission) ; B : blastocyste expansé. Masse cellulaire interne positionnée en bas ; C : blastocyste en début d’expansion. Image plus classique avec le bouton embryonnaire de belle qualité, dense, compact positionné latéralement ; D : blastocyste très médiocre. Pas de masse cellulaire interne formée.

faut ajouter que le transfert des blastocystes *in utero*, 5/6 jours post-ponction, correspond à une période où la motricité utérine commence à s’apaiser, réduisant ainsi les risques d’expulsion de l’embryon (32). Par ailleurs, les blastocystes surnuméraires peuvent être congelés.

L’heure n’est plus à la contestation de l’effet positif du transfert au stade blastocyste (33), d’autant plus que le reproche que l’on avait fait quant à l’augmentation des jumeaux monozygotiques est infondé (34). Nous avons pu ainsi montrer que c’est l’utilisation d’un milieu de qualité médiocre et mal protégé contre les effets des radicaux libres, lors des premières phases de culture, qui amènera une apoptose et en conséquence un risque accru de jumeaux monozygotiques (34). Avec les grands nombres, il apparaît que la culture prolongée ne modifie pas le sex-ratio en faveur des garçons, comme cela a été soutenu au début de son utilisation (tableau I). Le taux d’interruption médicale de la grossesse est

inférieur à 1 % (12/1971) et celui de mort < 3 mois est inférieur à 0,5 % (9/1968). Le poids des enfants à la naissance n’est pas majoré (35). Ce paramètre est important dans la mesure où il aurait pu être source d’inquiétude par analogie avec ce qui se passe chez les espèces domestiques à intérêt zootechnique où le poids à la naissance est majoré (*large calf syndrome*).

Le taux d’implantation par embryon se situe à 20-25 % pour un embryon 6-8 cellules à 3 jours et est doublé par un transfert au stade blastocyste à j5. Une baisse du taux d’implantation est géné-

Tableau I – Transfert de blastocystes et sex-ratio (données personnelles).

Blastocystes transférés	Filles	Garçons
Congelés	208	242
Frais coculture	378	412
Frais séquentiels	359	360
Total	945	1 014

ralement observée quand les blastocystes apparaissent plus tardivement et sont transférés à j6. Quand ils sont obtenus à j7, il faut passer par la congélation car les transferts de blastocystes frais ne donnent pas de grossesse, alors que les blastocystes décongelés, transférés dans des utérus plus jeunes d'un point de vue hormonal, aboutissent à des naissances, confirmant ainsi l'importance du respect de la fenêtre embryonnaire dans l'efficacité de l'implantation chez la femme.

La congélation au stade blastocyste

D'un point de vue assez simpliste, deux théories s'opposent. Doit-on éviter de prolonger la culture en suggérant que la structure embryonnaire sera altérée et rendue moins apte à la congélation ? Ainsi, faut-il congeler aux stades embryonnaires précoces, en sachant par ailleurs que la congélation entre 4 et 8 cellules à j2 ou j3 sera encore une fois un geste aveugle, ou doit-on congeler aux stades blastocystes ? D'autant plus que la sélection des meilleurs embryons à j3 est très aléatoire (36), ce que confirment les observations d'Iwarson *et al.* (37), montrant un taux très élevé d'anomalies chromosomiques pour les embryons congelés aux stades précoces de leur développement. Là encore, la technique de culture jusqu'au stade blastocyste est intéressante, et c'est la protection contre les radicaux libres qui fera la différence car une peroxydation excessive des lipides des membranes les déforme et les rend beaucoup plus rigides donc plus fragiles et « cassantes » (38).

Cependant, il est extrêmement important d'ajouter deux paramètres :

- le premier est purement cryobiologique. Une cellule se congèle d'autant mieux qu'elle possède un rapport nucléocytoplasmique élevé *i.e.* qu'elle ne contient pas beaucoup d'eau : c'est le cas des cellules du blastocyste, pauvres en eau et de taille réduite, contrairement aux cellules des embryons plus précoces ;
- le second réside dans le fait que, même endommagé par la congélation, un blastocyste ayant perdu un certain nombre de cellules peut aisément survivre et donner après transfert des enfants viables et sains (fig. 3). Pour autant, tous les blastocystes ne sont pas congelables, spécialement ceux dont le bouton embryonnaire est dispersé (fig. 2D).

Enfin, pour déterminer la qualité et l'efficacité d'un programme de congélation, il est important de définir les paramètres suivants, très rarement mentionnés dans la littérature (39).

Le *pourcentage d'embryons surnuméraires congelés* : il est parfois soutenu que la culture prolongée

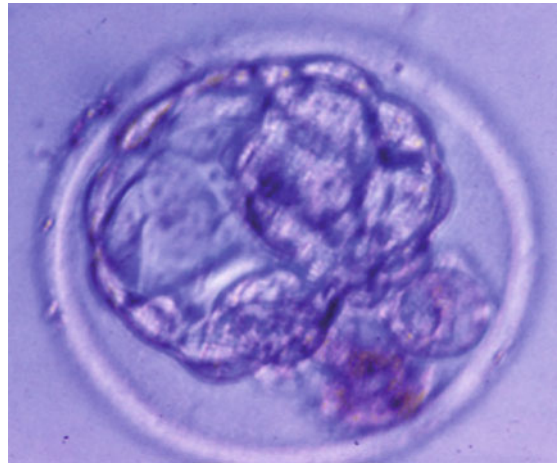


Fig. 3 – Blastocyste après décongélation. Certaines cellules lysées demeurent à la périphérie du blastocyste qui se réorganise. Ce blastocyste transféré seul a donné un bébé de sexe masculin.

diminue le nombre d'embryons susceptibles d'être congelés : encore une fois la sélection des meilleurs n'est pas prise en compte pour les embryons précoces ; de plus, rarement plus d'un tiers des embryons surnuméraires sont congelés sur la base des critères morphologiques. Les critères étudiés à retenir et disponibles dans la littérature quant à la congélation des blastocystes sont le pourcentage des couples ayant une congélation, le pourcentage de récupération des embryons après décongélation, et le « take home baby rate » par embryon congelé et par embryon transféré (tableau II). Pour le transfert, nous avons toujours privilégié une récupération d'une nuit. Ceci permet une bien meilleure évaluation.

En ce qui concerne la vitrification, il existe un point favorable indéniable : la durée de la manipulation technique 10-15 minutes pour la vitrification contre près de 3 heures pour la congélation lente programmée. L'aspect « sécurité sanitaire » avec une augmentation potentielle de contamination d'une paillette ouverte à l'autre semble sur le point d'être réglé (40). Il apparaît pourtant immédiatement un élément que l'on peut qualifier de défavorable : la très forte concentration en cryoprotecteurs toxiques contrairement au glycérol utilisé pour la congélation lente qui, lui, est un composé physiologique non toxique. Par ailleurs, il faut noter que l'éthylène glycol est un composé potentiellement toxique et mutagène (41). Pour la congélation au stade blastocyste, il n'y pas encore réellement d'évidence qu'une technique surpasse l'autre. Ce n'est sans doute pas à ce stade que la vitrification se révélera la plus intéressante (42). Il faut simplement noter qu'en zootechnie la congélation lente demeure toujours la technique la plus employée.

Tableau II – Congélation lente aux stades précoces et au stade blastocyste.

	Van der Elst <i>et al.</i> (43)	Senn <i>et al.</i> (44)	Katterra <i>et al.</i> (45)	Kattera <i>et al.</i> (45)	Kaufman <i>et al.</i> (46)	Behr <i>et al.</i> (47)
Stade embryon	précoce	précoce	précoce FIV	précoce ICSI	blastocyste	blastocyste
Nbre embryons décongelés	3 807	600	223	219	1 239	ND
% récupération	49,1	73,7	73,9	74,8	83	ND
Taux G/T (%)	9,4	10,9	19,0	16,0	21,7	36,0
Taux I/Embryon transféré	4,7	5,9	ND	ND	13,4	16,0
THBR/100 embryons transférés	3,2	4,3	6,4	4,4	ND	27,0
THBR/100 embryons congelés	1,4	3,2	4,5	3,2	10,9	ND

G : grossesse clinique ; T : transfert ; I : implantation ; THBR : *take home baby rate*.

Conclusion

Très critiqué à ses débuts, le transfert au stade blastocyste est dorénavant incontournable, au point que l'on puisse se demander à quoi servent les études randomisées encore tout récemment publiées, notamment par ceux qui l'ont abondamment attaqué. Indépendamment de l'apport des blastocystes pour l'étude des cellules souches, la culture prolongée a permis une réduction, par une meilleure sélection, du nombre d'embryons transférés. Une meilleure connaissance des phénomènes de maturation, activation de l'ovocyte, régulation du développement embryonnaire précoce et de ses blocages, pathologies du sperme, passe par la formation ou non du blastocyste *in vitro*. Pour autant, il est nécessaire de rester vigilant, notamment dans l'utilisation des systèmes de culture et leur modification. Il faut encore noter que la coculture est toujours abondamment utilisée pour cultiver les embryons de fort intérêt technologique (clonage, etc.). L'addition de facteur(s) de croissance doit nécessairement être abordée et discutée, car elle correspond à la situation *in vivo*, où nombreux sont présents. Mais c'est l'équilibre de leurs interactions qui pose encore question. Cet aspect ne peut être abordé que dans le cadre d'études *in vitro* sur l'embryon humain car, encore une fois, les modèles animaux, des murins aux bovins, caprins ou ovins ne sont pas informatifs. Seul ce type d'évaluation est source d'intérêt et de progrès contrairement à la « pêche à la ligne », ou fishing, qui peut permettre des coups de chances, par ailleurs peu fréquents en recherche.

Éclosion assistée
(A. Veiga et Y. Ménézo)

L'éclosion (*hatching*) de l'embryon est un phénomène indispensable à l'implantation. La sortie de l'embryon se produit environ sept jours post-fécondation et il est le résultat de la lyse de la zone pellucide (ZP) par les lysines embryonnaires mais aussi par les protéases utérines. L'idée à la base de l'éclosion assistée, ou *assisted hatching*, est que les conditions de culture *in vitro*, notamment une teneur en oxygène élevée, ont un effet « durcisseur » sur la ZP (*zona hardening*). Ce processus putatif aurait pour conséquence de rendre plus difficile l'éclosion du blastocyste et affecterait ainsi les chances d'implantation des embryons transférés. D'où l'idée de perforer cette ZP avant le transfert embryonnaire (48). L'éclosion assistée peut se faire par traitement au tyrode acide à un pH voisin de 2, ou à l'aide de laser qui permet d'avoir une reproductibilité certaine quant à la taille de l'orifice réalisé. Il faut noter que le traitement au tyrode acide est, d'un point de vue de la physiologie et de la biochimie de l'embryon, redoutable. En effet, aux stades préimplantatoires, où l'éclosion assistée est généralement réalisée, l'embryon n'est pas capable de se défendre contre le stress acide (49).

Un certain nombre d'études ont été réalisées dans le but de démontrer l'efficacité de l'éclosion assistée. Elles ont été faites surtout chez des patientes pour lesquelles le diagnostic était généralement médiocre : âge avancé avec FSH de base élevée, échecs d'implantation itératifs etc. ou anomalies supposées de la structure de la ZP (irrégulière, épaisse). Les données obtenues sont pour le moins contradictoires.

De fait, une méta-analyse de la Cochrane a clairement établi une insuffisance de preuves éviden-

tes (50) et les conséquences à tirer sont les suivantes :

- l'éclosion assistée n'augmente pas le taux d'implantation et de grossesse en FIV, pour les premières tentatives ;
- elle augmenterait les taux d'implantation chez des femmes ayant eu plusieurs échecs d'implantation ;
- il n'y a pas l'évidence d'un bénéfice pour les patientes d'âge avancé, pour les patientes ayant des embryons avec ZP épaisse, ou pour les embryons congelés ;
- en conséquence, il n'y a pas assez d'évidences, quant à un éventuel bénéfice, pour recommander l'éclosion assistée en routine de FIV/ICSI.

De fait, il est possible que l'on soit ici en présence d'un ratio risque/bénéfice assez confus : l'apport bénéfique possible apporté par la perforation étant contrecarrée par l'effet délétère lié à la technologie nécessaire pour réaliser cette perforation : pH fortement acide ou ionisation liée au faisceau laser.

Références

1. Camous S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y (1984) Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fert* 72: 479-85
2. Heyman Y, Menezo Y, Chesne P *et al.* (1987) In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27: 59-68
3. Gandolfi F, Moor RM (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 81: 23-8
4. Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H *et al.* (1989) Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 4: 706-13
5. Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA *et al.* (1989) The effect of rhesus epithelial cell monolayers on in vitro growth of rhesus embryos. *Theriogenology* 39: 197
6. Menezo Y, Hamidi J, Khatchadourian C *et al.* (1989) The murine prepuberal oviduct supports early embryo development in vitro. *Develop Growth Differ* 31: 551-5
7. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC (1990) Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 42: 301-6
8. Menezo Y, Hazout A, Dumont M *et al.* (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 7 (Suppl 1): 101-6
9. Menezo Y, Janny L (1996) Is there a rationale for tubal transfer in human ART? *Hum Reprod* 11: 1818-20
10. Turner K, Lenton EA (1996) The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production in vitro. *Hum Reprod* 11: 1966-74
11. Thibodeaux JK, Menezo Y, Roussel DJ *et al.* (1992) Coculture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. *J Dairy Sci* 75: 1448-55
12. Janny L, Menezo Y (1996) Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Develop* 45: 31-7
13. Menezo Y, Dale B (1995) Paternal contribution to successful embryogenesis. *Hum Reprod* 10: 1326-8
14. Menezo Y, Veiga A (1997) Cryopreservation of blastocysts. In: Gmel V, Leung PCK, eds. *In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, 10th World Congress of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Vancouver, Monduzzi: 49-53
15. Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N *et al.* (1992) Freezing co-cultured human blastocysts. *Fertil Steril* 58: 977-80
16. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M *et al.* (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5: 351-4
17. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S *et al.* (1995) Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 63: 109-14
18. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J *et al.* (1999) Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2638-46
19. Quinn P, Margalit R (1996) Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 13: 9-14
20. Martin-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo J *et al.* (2008) Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online* 17: 652-61
21. Lane M, Hooper K, Gardner DK (2001) Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J Assist Reprod Genet* 18: 519-25
22. Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E *et al.* (2003) Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 80: 1162-8
23. Domínguez F, Gadea B, Mercader A *et al.* (2010) Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 93: 774-82
24. Richter KS (2008) The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20: 292-304
25. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y (1990) Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Reprod* 5: 737-43
26. Menezo Y, Sakkas D (2002) Monozygotic twinning: is it related to apoptosis in the embryo? *Hum Reprod* 17: 247-8
27. Menezo Y, Chouteau J, Veiga A (2001) In vitro fertilization and blastocyst transfer for carriers of chromosomal translocation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96: 193-5
28. Veiga A, Gil Y, Boada M *et al.* (1999) Confirmation of diagnosis in preimplantation genetic diagnosis (PGD) through blastocyst culture: preliminary experience. *Prenat Diagn* 19: 1242-7
29. Fauser BC (2008) Preimplantation genetic screening: the end of an affair? *Hum Reprod* 23: 2622-5
30. Boada M, Carrera M, De La Iglesia C *et al.* (1998) Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet* 15: 302-7
31. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT *et al.* (2005) Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 84: 1628-36
32. Fanchin R, Ayoubi JM, Olivennes F *et al.* (2000) Hormonal influence on the uterine contractility during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 15 Suppl 1: 90-100

33. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N *et al.* (2007) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 17: CD002118
34. Cassuto G, Chavrier M, Menezo Y (2003) Culture conditions and not prolonged culture time are responsible for monozygotic twinning in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 80: 462-3
35. Menezo Y, Veiga A, Pouly JL (2000) Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties. *Theriogenology* 53: 599-610
36. Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J *et al.* (2002) Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 77: 1191-5
37. Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J *et al.* (1999) A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum Genet* 104: 376-82
38. Pryor WA, Stanley JP, Blair E (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11: 370-9
39. Menezo Y (2004) Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115 (Suppl 1): S12-5
40. Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L *et al.* (2009) Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. *Reprod Biomed Online* 19: 700-7
41. Klug S, Merker HJ, Jäckh R (2001) Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis. *Toxicol In Vitro* 15: 635-42
42. Youssry M, Ozmen B, Zohni K *et al.* (2008) Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 16: 311-20
43. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Vitrier S *et al.* (1997) Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates. *Hum Reprod* 12: 1513-21
44. Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P, Germond M (2000) Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* 74: 946-52
45. Kattera S, Shrivastav P, Craft I (1999) Comparison of pregnancy outcome of pronuclear- and multicellular-stage frozen-thawed embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* 16: 358-62
46. Kaufman RA, Menezo Y, Hazout A *et al.* (1995) Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 64: 1125-9
47. Behr B, Gebhardt J, Lyon J, Milki AA (2002) Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *Fertil Steril* 77: 697-9
48. Cohen J (1991) Assisted hatching of human embryos. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 8: 179-90
49. Dale B, Menezo Y, Cohen J *et al.* (1998) Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod* 13: 964-70
50. Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C *et al.* (2005) Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD001894

H. N. Sallam

Aspects cliniques du transfert embryonnaire

Introduction

En dépit de multiples évolutions dans la reproduction médicalement assistée, le taux d'implantation de l'embryon replacé en fécondation *in vitro* (FIV) et en injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) demeure faible. En 1995, Edwards a remarqué que, malgré le remplacement d'embryons de bonne qualité, 85 % de ces embryons ne sont pas implantés (1). Ce bas taux de succès a été justifié par la mauvaise réceptivité de l'endomètre et la mauvaise aptitude de l'implantation de l'embryon ou par la technique suboptimale du transfert de l'embryon (TE). L'objectif de cet article est de décrire la technique du transfert de l'embryon, d'évaluer les modifications variées suggérées, afin d'augmenter la chance de grossesse au maximum et de discuter les différentes approches disponibles pour gérer les difficultés du transfert de l'embryon.

Technique du transfert de l'embryon

D'habitude, le transfert de l'embryon (TE) est effectué de deux à cinq jours après avoir recueilli l'ovocyte. Actuellement, la plupart des transferts est effectuée dans la position gynécologique (2, 3), bien que la position du genou poitrine soit recommandée par certains auteurs. La procédure est effectuée sous des conditions stériles ; la patiente drapée, un spéculum est inséré dans le vagin et le col de l'utérus est exposé. Le mucus cervical est aspirée à l'aide d'un aspirateur de mucus, puis le col de l'utérus est nettoyé à l'aide d'un tampon imbibé avec du sérum salin ou du milieu de culture.

Plusieurs genres de cathéter en plastique sont utilisés pour le TE, ils varient selon la longueur, le diamètre, la dureté et la mémoire et ils n'ont pas de toxicité pour l'embryon. Les cathéters sont pré-chargés ou chargés, cela dépend des embryons, s'ils sont chargés directement dans le cathéter ou

si l'enveloppe externe est posée en premier dans la cavité de l'utérus, tout en utilisant une corde directrice ou un obturateur.

Au moment du transfert, le cathéter est ajusté sur la seringue de 1 mL du genre tuberculine et rempli avec le milieu de culture. Ensuite, les embryons sont chargés dans l'extrémité distale du cathéter dans un volume de 15 à 25 μ L du milieu de culture. Si le genre du cathéter préchargé est utilisé, le cathéter passe à travers le col de l'utérus à environ 1 à 2 cm au-dessous du fond de l'utérus. Cela est déterminé grâce aux marques centrimétriques qui sont sur le cathéter. La longueur de la cavité de l'utérus devrait être mesurée précédemment en utilisant une sonde utérine ou les ultrasons. Puis, les embryons sont déposés dans la cavité de l'utérus en pressant doucement le piston de la seringue. Le cathéter est laissé à sa place durant 30 secondes environ, puis il est doucement retiré. Le cathéter est ensuite vérifié sous le microscope pour examiner les embryons restants, si ceux-ci sont trouvés, ils pourraient être rechargés et transférés de nouveau.

En cas d'usage d'un cathéter post-chargé, l'enveloppe externe passe en premier à travers le col de l'utérus jusqu'à environ 1 cm au-dessus de l'orifice cervical interne (4). Ensuite, l'intérieur du cathéter qui contient les embryons est avancé de 1 à 2 cm au-dessous du fond de l'utérus. Les embryons sont ensuite déposés doucement dans la cavité de l'utérus.

Au début de la FIV, les patientes devaient rester au lit jusqu'à 12 heures (2, 3). Plus tard, elles devraient rester jusqu'à 30 minutes après l'opération. Néanmoins, plusieurs études récentes ont montré que cela n'est pas nécessaire (5-7).

Facteurs affectant le transfert de l'embryon

En dépit de son apparence simple, la technique du TE a une importance considérable dans la

maximisation des chances de grossesse, si elle est accomplie méticuleusement. Davantage d'informations sur les divers facteurs qui entraînent l'augmentation de son succès sont, actuellement, disponibles et ceux-ci seront ici discutés sous la lumière des évidences récentes.

Avant le transfert de l'embryon

Avant le commencement du TE, il faut prendre en considération les facteurs suivants.

Sélection de l'embryon

L'adoption de la FIV et de l'ICSI dans le traitement de l'infécondité a été toujours accompagnée d'une augmentation de grossesses multiples avec des conséquences diverses : médicales, sociales et économiques (8). En réaction à ces conséquences, la plupart des programmes de FIV/ICSI a introduit, actuellement, une politique qui réduit le nombre des embryons transférés, d'habitude de deux à trois embryons. Plus récemment, une politique du transfert d'un unique embryon (TUE) a été demandée et plusieurs études ont rapporté que la pratique de cette politique ne diminue pas le taux de succès (9). L'application de ces politiques nécessite une bonne sélection de l'embryon et divers critères ont été utilisés dans ce but. La sélection est essentiellement basée sur des critères morphologiques (10, 11). De même, Fisch *et al.* (12) ont décrit des résultats gradués de l'embryon et, récemment, nous avons expérimenté à l'aide d'un ordinateur assisté par un système pour la sélection de l'embryon (13). D'autres critères utilisés pour la sélection des embryons sont : le clivage précoce (14, 15), la culture prolongée de l'embryon jusqu'à la phase de blastocyste (16, 17), ainsi que la réalisation du diagnostic préimplantatoire pour la sélection de l'embryon (18). Plus récemment, de Boer *et al.* ont combiné deux critères de sélection en effectuant une analyse du globule polaire au cinquième jour et six blastocystes avant le transfert d'un unique embryon (19). D'autres méthodes de la sélection de l'embryon comportent le taux de la respiration de l'embryon (20), la consommation du glucose (21) et le taux de mouvement des acides aminés (22), mais tous ces critères sont encore dans la phase d'expérimentation.

Choix du cathéter

Le choix du cathéter utilisé pour le TE a été sujet de débat dans certaines études qui montrent que les cathéters mous sont meilleurs que les cathéters durs, d'autres études montrent le contraire. Alors qu'un troisième groupe d'études a trouvé qu'il n'existe aucune différence de résultats entre les dif-

férents cathéters utilisés pour le TE. Néanmoins, deux méta-analyses des essais randomisés (RCTs) ont montré, récemment, que les cathéters mous sont associés à un taux de grossesse clinique plus élevé, comparé aux cathéters durs (23, 24). Dans la méta-analyse de Abou-Setta *et al.*, l'OR (95 % CI) pour les grossesses cliniques utilisant les cathéters mous était de 1,49 (1,26-1,77), pendant qu'il était, dans la méta-analyse de Bucket, de 1,34 (1,17-1,53) (fig. 1) (23, 24). Le taux des grossesses évolutives/enfants ramenés à la maison augmentait significativement, [OR = 1, 25 (95 % CI = 1,02-1,53)] (23).

Faux transfert de l'embryon

On a suggéré qu'effectuer un faux essai de TE avant le transfert effectif diminue la fréquence des difficultés de transfert et augmente le taux de grossesse et d'implantation (25). Ceci pourrait être effectué pendant la phase lutéale du cycle précédant (26), au moment du recueil ovocytaire (27) ou immédiatement avant le transfert réel (28). La technique cherche à permettre au médecin de choisir le meilleur cathéter convenable pour un utérus donné et la technique aide à cartographier la direction de l'axe de l'utérus (29).

Une récente publication met en question la valeur d'effectuer un faux TE et montre que la rétroversion de l'utérus dans un faux TE change souvent de position pendant la procédure réelle (30). Les auteurs ont suggéré que le guidage échographique pendant le transfert réel est une meilleure méthode pour juger la direction de l'axe de l'utérus. C'est ce que notre groupe a montré dans une publication précédente (31). Par ailleurs, Shamonki *et al.* ont suggéré qu'effectuer le faux transfert sous guidage échographique pourrait être bénéfique pour la préparation du transfert effectif (32, 33).

Milieu du transfert de l'embryon

D'habitude, le milieu de TE se complète d'une hausse concentration du sérum (34) décomposé du patient, sérum synthétique remplaçant (SSS) (35), sérum albumine humaine (HAS) (36) et même le sérum de cordon ombilical (37). Dans une publication récente, Simon *et al.* comparent deux genres du milieu de TE : un genre complémentaire de 10 % SSS et l'autre complémentaire de 0,5 mg/mL acide hyaluronique et ont annoncé des taux comparables de grossesse et d'implantation (38). Dans une étude différente, Loutradi *et al.* ont évalué l'emploi d'une grande concentration de hyaluronan dans un milieu de TE et ont trouvé qu'il n'avait aucun effet important statistiquement sur le taux de grossesse (39). Ces deux études constituent un pas important vers le progrès du milieu de TE sans les additifs tirés du sang. Une fibrine jointe a été ajoutée au milieu de TE tentant d'améliorer le résultat de la FIV, et deux

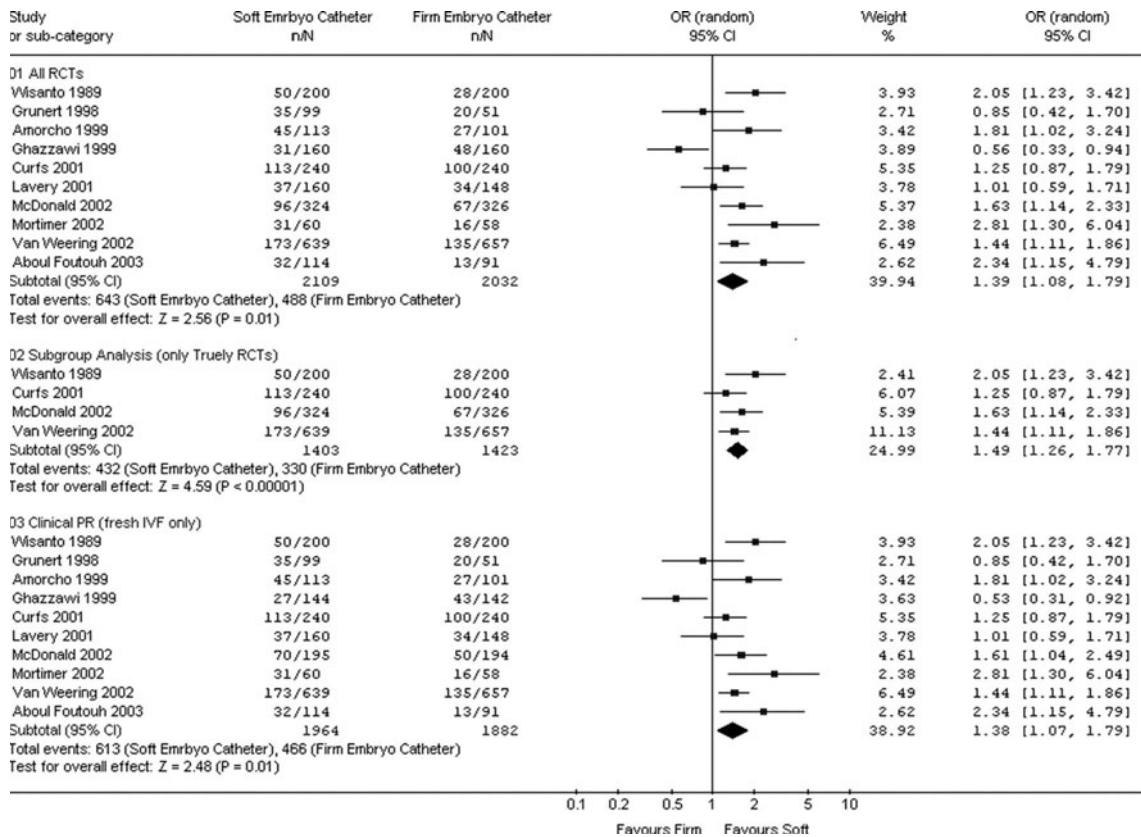


Fig. 1 – Les méta-analyses des taux des grossesses cliniques pour toutes les études randomisées (RCT) (modèle des effets aléatoires), les études randomisées réelles (modèle d'effet fixe) et les études randomisées de FIV uniquement cycles frais (modèle des effets aléatoires). D'après Abou-Setta *et al.*, avec la permission de *Hum Reprod* (23).

essais randomisés (RCTs) ont été menés. Une étude a montré une amélioration non significative dans le taux de grossesse (40), alors qu'une autre étude a montré un bienfait chez les patientes âgées (41). Récemment, un troisième essai randomisé (RCT) a trouvé que le traitement de l'embryon avec une fibrine séreuse (la séreuse de l'embryon) avant le TE a mené à une amélioration significative des taux de grossesse cliniques et évolutives et d'implantation (42).

Échographie avant le transfert de l'embryon

L'échographie est utilisée avant le TE pour étudier la configuration et le contenu de la cavité utérine et de l'endomètre. Deux rapports récents ont montré que l'échographie avant le TE était utile à dépister l'hydrométrie développée récemment chez les patientes avec hydrosalpinx. L'aspiration du fluide de l'utérus n'a pas aidé à cause de sa prompte réaccumulation, et les auteurs ont recommandé la cryoconservation des embryons pour un transfert futur après l'ablation de l'hydrosalpinx (43, 44). L'échographie est aussi utilisée pour mesurer l'épaisseur de l'endomètre avant le TE. On a suggéré une valeur de 8 mm comme point de coupure au-dessous duquel l'implantation ne pourra pas avoir

lieu. On a toujours pensé qu'un endomètre excessivement épais empêche l'implantation. Néanmoins, une publication récente a rapporté la survenue de grossesse chez deux femmes dont les endomètres épais mesurent 16 et 20 mm (45). L'échographie est aussi utilisée pour mesurer la paroi de l'endomètre avant le TE. Jarvela *et al.* ont trouvé que la présence d'une paroi homogène de l'endomètre semble prédire un résultat déficitaire à la FIV, pendant qu'une triple ligne de la paroi et une baisse du volume de l'endomètre semblent être associées à la conception (46). De même, le volume de l'endomètre pourrait être mesuré à l'aide de l'échographie 3-D, et un volume de l'endomètre < 2,5 ml, le jour du transfert de l'embryon, est associé à une faible probabilité d'implantation (47).

L'échographie est aussi utilisée pour étudier la réceptivité de l'endomètre avant le TE en mesurant le flux du sang sous-endométrial à l'aide de Doppler (48) couleur et également la puissance Doppler 3-D (49). Récemment, Chien *et al.* ont effectué des examens de Doppler avant le TE et ils ont trouvé que les valeurs de l'indice de résistance (IR) artériel moyen de l'utérus et de l'indice de pulsatilité (IP) sont significativement inférieures chez le groupe de patientes enceintes, comparé à celles du groupe de patientes

qui ne sont pas enceintes (50). De même, Ng *et al.* ont trouvé que chez la femme traitée par FIV ou ICSI, la vascularisation endométriale et sous-endométriale était significativement supérieure chez celles qui ont mené une grossesse jusqu'à l'accouchement, à celles qui ont subi une fausse couche (51). Dans une étude différente, le même groupe a rapporté que le flux du sang de l'endomètre et le flux du sang du sous-endomètre, mesurés par la puissance Doppler 3D, n'étaient pas seuls de bons prédicteurs de grossesse pendant le traitement (52) de la FIV, contrairement aux résultats des études précédentes (53, 54). Évidemment, plus d'études sont demandées pour cette partie, afin d'évaluer le rôle de l'échographie avant le TE, et de vérifier si les embryons devraient être congelés et transférés dans un cycle subséquent, si on prédit une faible implantation.

Nécessité d'une vessie remplie

Lewin *et al.* ont suggéré que l'accomplissement du TE avec la vessie remplie mène à rendre l'utérus droit pendant la procédure et augmente le taux de grossesse clinique (55). Néanmoins, dans une étude récente faite par Lorusso *et al.*, ces résultats n'ont pas été confirmés (56). Actuellement, il existe un besoin d'effectuer de plus vastes essais randomisés (RCTs), afin d'évaluer la nécessité d'une vessie remplie pendant le TE.

Lavage du mucus cervical avant le TE

On a suggéré dans des essais non randomisés que le lavage vigoureux du canal cervical à l'aide du milieu de culture, avant le transfert de l'embryon, augmente le taux de grossesse clinique après la FIV (57). Néanmoins, dans un essai RCT, nous ne pouvons pas confirmer ces résultats (58). À l'opposé, on a exprimé un souci, qu'après cette pratique, quelques milieux de culture pourraient entrer dans la cavité utérine et affecter l'implantation de l'embryon. Dans un essai récent de RCT, Berkkanoglu *et al.* ont trouvé que la présence du milieu de culture à l'intérieur de la cavité de l'utérus pendant le TE n'affecte pas la grossesse ni le taux d'implantation (59).

Expérience du « transféreur »

Le facteur médecin peut être une variable importante dans la technique du TE. Dans une étude rétrospective de 854 nouveaux TE par Hearn-Stokes *et al.*, une différence significative dans le taux de grossesse a été trouvée entre les dix cliniciens engagés (60). Les mêmes résultats ont été rapportés par Angelini *et al.* (61). À l'opposé, deux études ont trouvé que des infirmières bien entraînées étaient compétentes comme les cliniciens à effectuer le TE avec des différences non significatives dans la grossesse et le taux d'implantation (62, 63). Cela a été récemment confirmé dans un essai

RCT (64). Tentant d'établir le nombre minimal de TE nécessaire pour acquérir une bonne expérience, Papageorgiou *et al.* ont trouvé que le taux de grossesse clinique, accomplie par des condisciples pendant l'entraînement qui ont effectué 50 TE, était comme celui accompli par des cliniciens seniors qui ont plus d'expérience (65).

Pendant le transfert de l'embryon

Une fois les facteurs précédents pris en considération, les étapes suivantes pourraient être réalisées afin d'augmenter le résultat du TE au maximum.

Position de la patiente

En 1986, Englert *et al.* ont mené un essai RCT qui compare la position genou-poitrine et la position dorsale pendant le TE (66). On a trouvé une différence non significative dans le taux de grossesse clinique chez les deux groupes de patientes étudiés. Ce travail n'a pas été répété. Tentant de chercher la relation entre la position de la patiente pendant le TE et l'incidence de la grossesse extra-utérine, Rubic-Pujcelj *et al.* ont trouvé que l'incidence était de 3,5 %, lorsque le TE était effectué dans la position genou-poitrine, comparé à 5,4 %, lorsque le TE était effectué dans la position gynécologique, mais cette différence n'était pas statistiquement significative (67).

Technique douce et atraumatique

Certaines publications (non pas toutes les publications) ont rapporté qu'une technique douce et atraumatique du TE est nécessaire pour augmenter les chances de grossesse au maximum. Les difficultés pendant le TE comprennent la difficulté à franchir le canal cervical, la nécessité d'utiliser le *volcellum* (*tenaculum*) et la présence de sang après le TE. Dans une publication récente, Alvero *et al.* ont trouvé qu'à part ces facteurs la présence de sang sur ou dans le cathéter, seulement, diminue la grossesse clinique et le taux d'implantation significativement (68), ce que les conclusions des études précédentes ont confirmé (69, 70). Également, Tomas *et al.* ont trouvé que le degré de difficulté est un facteur indépendant pour prédire le résultat de grossesse (71). À l'opposé, Silberstien *et al.* ont trouvé que le tubage d'une résistance interne de l'orifice par l'enveloppe malléable et le sang sur le cathéter du transfert, après le TE, n'ont pas d'effet opposé sur le taux d'implantation, ni sur le taux de grossesse clinique (72). Afin d'aider à résoudre cette question, nous avons poursuivi une méta-analyse de dix essais contrôlés et nous avons trouvé que les difficultés du TE étaient associées à la diminution des taux de grossesse [OR = 0,73 (95 % CI = 0,63-0,85)] (fig. 2). On pense que l'effet des transferts difficiles sur la

Comparison: 01 Difficult versus easy transfers

Outcome: 01 Pregnancy rate

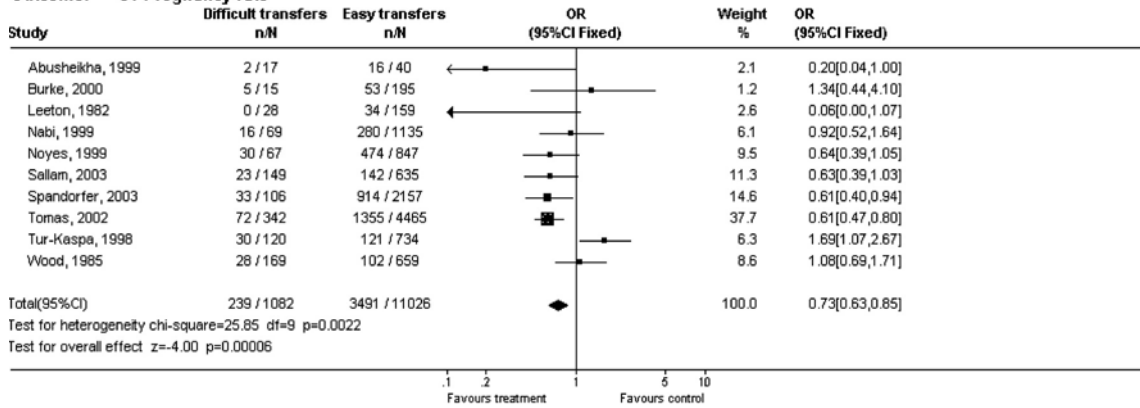


Fig. 2. – Les méta-analyses des études randomisées montrant que les transferts difficiles de l'embryon sont associés à la réduction significative du taux de la grossesse. D'après Sallam, avec la permission de *Curr Opin Obstet Gynecol* (146).

grossesse et sur le taux d'implantation est dû au traumatisme de l'endocol et l'endomètre. Cevrioglu *et al.* ont effectué une hystéroscopie diagnostique immédiatement, après un faux transfert de l'embryon, et ont trouvé une concordance significative statistiquement entre la difficulté de transfert perçue et le degré d'endommagement de l'endomètre. Des transferts difficiles étaient associés à plus de dommages endocervicaux et endométriaux et plus de sang sur le cathéter (73). Dans une autre étude, Marconi *et al.* ont utilisé la microhystéroscopie pour présenter toutes les lésions possibles faites par de divers cathéters de TE et ont trouvé que le cathéter Wallace était moins traumatique pour l'endomètre comparé au cathéter Tomcat et le set de Frydman (74). À l'opposé de ces conclusions, Murray *et al.* ont utilisé l'hystéroscopie et trouvé qu'il n'y avait pas d'association claire entre la difficulté de transfert perçue et la quantité de dommages de l'endomètre (75). En conséquence, la cause de la diminution de grossesse et du taux d'implantation associée aux transferts difficiles demeure un sujet de spéculation. En effet, une étude non publiée a trouvé qu'un taux de grossesse élevé est observé, lorsque l'endomètre était éraflé, à l'aide du cathéter de TE, avant de réaliser le transfert effectif (Z. Ben-Rafael, communication personnelle.)

Réduire la contractilité de l'utérus

Tenant d'améliorer le taux d'implantation, divers médicaments ont été suggérés afin de diminuer la contractilité de l'utérus pendant le TE. En 2001, Fanchin *et al.* ont montré, dans un essai RCT, que l'administration vaginale de progestérone, commençant le jour où l'ovocyte est recueilli, diminue la fréquence de la contractilité utérine le jour du TE et augmente le taux d'implantation (76). À l'opposé, dans un autre essai de RCT, Baruffi *et al.* ont comparé l'administration de 400 mg de progesté-

rone dans le vagin, dès le soir du recueil ovocytaire et son ajout le soir du TE ; il a trouvé une différence non significative de grossesse et de taux d'implantation entre les deux régimes (77). D'autres médicaments sont utilisés pour diminuer la contractilité de l'utérus y compris le glycéryl trinitrate (GTN), Piroxicam® et Atosiban®. Dans un essai de RCT, Shaker *et al.* ont trouvé que l'administration sublinguale du GTN avant le TE a mené à une technique douce, un temps plus court de la manipulation cervicale et un taux de grossesse plus élevé (78). Plus récemment, dans un essai RCT, Moon *et al.* ont trouvé que l'administration linguale de 10 mg de Piroxicam® une à deux heures avant le TE augmente la grossesse clinique et le taux d'implantation significativement (79).

Analgesie et anesthésie

On a suggéré que diverses méthodes d'analgesie ou même d'anesthésie pendant le TE peuvent être associées à un taux de grossesse plus élevé. En 1998, van der Ven *et al.* ont trouvé une différence non significative dans le taux de grossesse entre les patientes qui ont eu une anesthésie générale pendant le TE et celles qui ne l'ont pas eue (80). On a aussi utilisé l'acupuncture et l'hypnose pendant le TE. Dans un essai RCT publié en 2002, Paulus *et al.* ont trouvé que les patientes, qui ont reçu l'acupuncture pendant le TE, ont un taux de grossesse plus élevé significativement que celles qui ne l'ont pas reçue (81). Deux autres essais RCT ont été menés récemment (82, 83). La première étude a confirmé ces résultats (82), alors que la deuxième étude a rapporté un mode pour augmenter le taux de grossesse avec l'acupuncture qui avait une faible signification statistique (83). Il en est de même, mais dans un essai non randomisé, pour Levitas *et al.* qui ont rapporté que l'hypnose pendant le TE a

mené à un taux d'implantation et un taux de grossesse clinique significativement plus élevés (84).

Transfert de l'embryon guidé par l'échographie

Le transfert de l'embryon, guidé par l'échographie abdominale, a été d'abord suggéré par Strickler *et al.* en 1985 (85). La technique permet au clinicien de voir le bout du cathéter du TE et le côté exact du dépôt de l'embryon, de confirmer que la bulle d'air associée à l'embryon n'est pas déplacée après le TE (86). On a utilisé les cathéters avec un écho dense pour aider la visualisation immédiate et pour minimiser les manipulations intra-utérines (87). L'échographie peut aussi être utilisée pour mesurer l'angle cervical de l'utérus immédiatement avant le TE (fig. 3) et donc, tourner le cathéter, afin de minimiser le traumatisme du canal cervical et/ou de l'endomètre (31).

Plusieurs études qui évaluent la technique ont été publiées et deux récentes méta-analyses ont confirmé que le guidage abdominal échographique pour le TE a augmenté significativement le taux de grossesse clinique [OR = 1,42 (95 % CI = 1,17-1,73)]

(fig. 4) et le taux de grossesse évolutive [OR = 1,49 (95 % CI = 1,22-1,82)] (fig. 5) comparé à la méthode de la « touche clinique » (88, 89).

On a aussi décrit le guidage échographique transvaginal pour le TE. Zoolcott et Stanger ont utilisé la technique pour observer les mouvements de l'embryon associé avec la bulle d'air et pour suivre les contractions sous-endométriales du myomètre pendant le TE (90). Alors que Anderson *et al.* ont trouvé que cela améliore les résultats chez les patientes, dont les cycles de la fécondation *in vitro* ont précédemment échoué (91). Plus récemment, Letterie et Gergely *et al.* ont aussi décrit 3-D et 4-D (92, 93). Les deux études ont suggéré que ces techniques avancées donnent une meilleure précision pour indiquer la meilleure place pour le dépôt de l'embryon (92, 93). Dans une étude intéressante, Baba *et al.* ont utilisé l'échographie 3-D transabdominale et transvaginale, afin d'étudier la place de l'implantation de l'embryon en relation avec le côté du dépôt de l'embryon. On a trouvé que 80 % des embryons se sont implantés dans les parties où ils ont été transférés initialement (94).

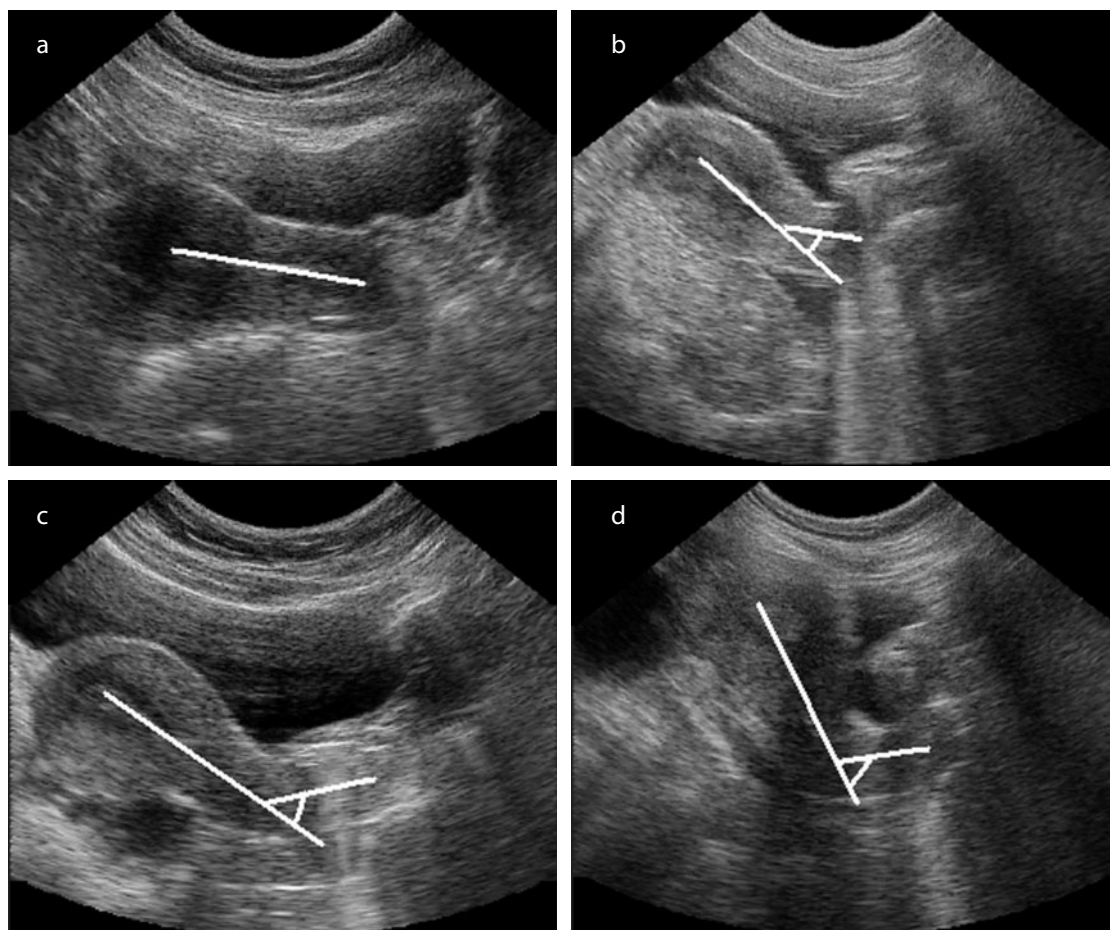


Fig. 3 – Mesurer l'angle utéro-cervical avant le transfert de l'embryon. a : il n'y a pas d'angle ; b : petit angle (< 30 degrés) ; c : angle modéré (30 à 60 degrés) ; d : angle large (> 60 degrés). D'après Sallam *et al.*, avec la permission de Hum Reprod (31).

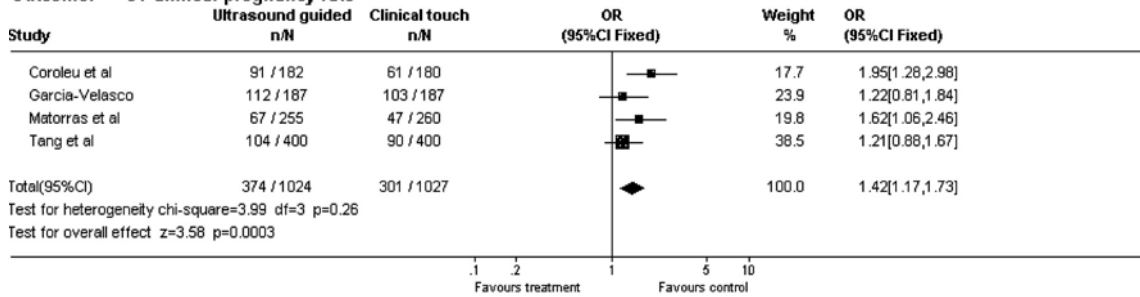
Comparison: 01 Ultrasound versus clinical touch**Outcome: 01 Clinical pregnancy rate**

Fig. 4 – Les méta-analyses des études randomisées montrant que les transferts de l'embryon guidés par l'ultrason transabdominal sont associés à l'augmentation des taux de grossesses cliniques dans les FIV et ICSI. D'après Sallam et Sadek avec la permission de *Fertil Steril* (88).

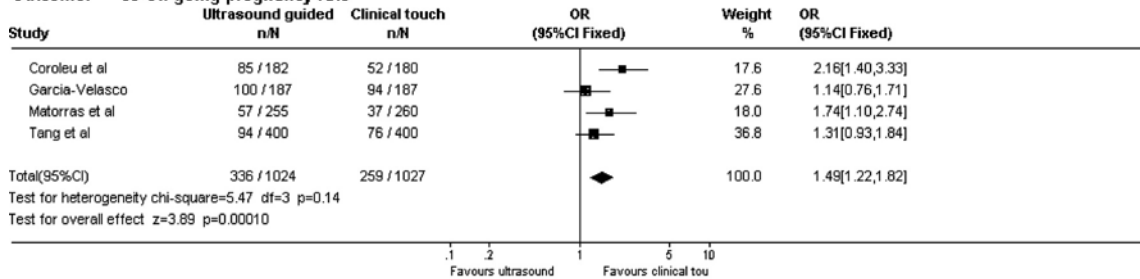
Comparison: 01 Ultrasound versus clinical touch**Outcome: 03 On-going pregnancy rate**

Fig. 5 – Les méta-analyses des études randomisées montrant que les transferts de l'embryon guidés par l'ultrason transabdominal sont associés à l'augmentation des taux de grossesses évolutives dans les FIV et ICSI. D'après Sallam and Sadek avec la permission de *Fertil Steril* (88).

L'air dans le cathéter du transfert de l'embryon

En 1995, Krampfl *et al.* ont suggéré que le fait d'encadrer l'embryon, qui contient un milieu, par des bulles d'air, présente plusieurs avantages, surtout la possibilité de suivre l'air sur l'écran de l'échographie, afin de localiser l'embryon après le TE. Ils ont trouvé que cette technique n'affecte pas le taux de grossesse (95). Ces résultats ont été confirmés dans un essai de RCT récent mené par Moreno *et al.* (96). À l'opposé, Eytan *et al.*, en utilisant un modèle de laboratoire transparent pour la cavité de l'utérus, ont trouvé que la présence de l'air a bloqué le déplacement du liquide transféré vers le fond et ont suggéré que le cathéter du TE doit contenir des volumes d'air minimaux, afin d'augmenter les chances pour l'embryon d'atteindre la place de l'implantation (97). Si ce modèle imite les conditions de vie du TE, il demeure qu'il a besoin d'être observé et par de plus vastes essais de RCT, afin de clarifier cette question.

L'intervalle de temps entre le chargement de l'embryon et le déchargement de l'embryon

Matorras *et al.* ont récemment étudié l'effet de l'intervalle de temps entre le chargement du cathéter du TE au dépôt de l'embryon dans la cavité utérine sur le taux de réussite (98). Ces auteurs ont trouvé

que, plus cet intervalle se prolonge, plus les taux de grossesse et d'implantation diminuent, et qu'un intervalle de plus de 120 secondes réduit le pronostic. Ils ont recommandé d'accélérer la procédure du TE autant que possible.

Place du dépôt de l'embryon

La meilleure place pour le dépôt de l'embryon a été sujette à débats, mais la plupart des études semblent avoir approuvé que le dépôt embryonnaire, dans la portion supérieure de la cavité utérine et loin du fond, est associé à une meilleure implantation. Dans un essai de RCT, Coroleu *et al.* ont trouvé que le taux d'implantation était significativement élevé lorsque l'embryon était déposé à 2 cm au-dessous du fond de l'utérus, comparé au dépôt embryonnaire à 1 cm au-dessous du fond (99). Récemment, Pope *et al.* ont confirmé ces résultats en effectuant une analyse à plusieurs variables logistiques de régression sur 699 TE. Ils ont trouvé, que pour chaque millimètre supplémentaire de l'embryon déposé loin du fond, les chances de grossesse clinique augmentent de 11 % (100). Ces mêmes résultats ont été rapportés par Frankfurter *et al.* qui ont étudié des TE filmés sur une cassette vidéo (101) et ont procédé à une étude prospective (102).

D'autres études ont suggéré que la meilleure place pour le dépôt de l'embryon est dans la partie moyenne de la cavité de l'utérus. Dans un essai de RCT, Franco *et al.* ont trouvé des différences non significatives statistiquement dans le taux de grossesse clinique ou le taux d'implantation, lorsque les embryons étaient déposés dans la moitié supérieure comparée à la moitié inférieure de l'utérus (103). Par la suite, le même groupe a procédé à une étude prospective et il a trouvé que le taux d'implantation et le taux de grossesse étaient supérieurs lorsque la position du bout du cathéter était près de la partie moyenne de la cavité endomètre. Ils ont conclu que la position relative du bout du cathéter au sein de la cavité utérine était plus importante que sa distance exacte du fond (104). Plus récemment, ils ont rapporté que lorsque les embryons étaient transférés dans la partie centrale de la cavité de l'utérus, le taux d'implantation dans la partie moyenne augmentait, comparé au taux prévu dans les grossesses conçues naturellement (105).

Utilisant le guidage échographique 3-D, Gergely *et al.* ont tenté de déposer les embryons au point de potentiel maximum d'implantation (PPI), qui est défini en étant le point d'intersection de deux lignes imaginaires formées par le prolongement du parcours de la trompe de Fallope dans la cavité de l'utérus. Ils ont trouvé que les embryons déposés sur le (PPI) étaient associés à de bons taux d'implantation et de grossesse (93). De même, Silbershtein *et al.* ont trouvé qu'en déposant les embryons dans la portion centrale de l'utérus, l'incidence des embryons retenus dans le transfert du cathéter a diminué (106).

On a aussi trouvé que la place de dépôt de l'embryon influence l'incidence des grossesses extra-utérines, dans deux études non randomisées. En 1993, Nazari *et al.* ont rapporté une incidence inférieure de grossesses extra-utérine, lorsque les embryons étaient déposés loin du fond (107). Les mêmes résultats ont été récemment confirmés par Pope *et al.* (100).

Utilisation du volsellum (clamp de Podzi)

Il est parfois nécessaire de tenir le col de l'utérus avec un *tenaculum* (*volsellum*) pendant le TE, afin de franchir le canal cervical avec le bout du cathéter. On a trouvé que cette pratique augmente la sécrétion d'oxytocine et les contractions sur la zone jonctionnelle (108, 109). En même temps, une étude non randomisée a suggéré qu'une fréquence plus élevée des contractions de l'utérus le jour du TE réduit le résultat de la FIV, c'est peut-être à cause de l'expulsion des embryons hors de la cavité de l'utérus, mais cette étude n'a pas été confirmée (110). En conséquence, plusieurs études sont nécessaires pour évaluer l'effet réel de tenir le

col de l'utérus avec un *volsellum* sur le résultat de la FIV et de l'ICSI.

Retrait immédiat du cathéter de transfert embryonnaire

Depuis le début de la FIV, l'usage était de laisser le cathéter à l'intérieur de la cavité utérine pendant 30 secondes après le TE, tentant d'améliorer les taux de grossesse et d'implantation. Néanmoins, un essai de RCT a trouvé des différences statistiquement non significatives dans les taux de grossesse entre le retrait immédiat du cathéter après le TE et la sortie du cathéter après 30 secondes. Les auteurs ont conclu que soit l'intervalle d'attente est insuffisant pour détecter une différence, soit le temps de rétention avant de retirer le cathéter n'est pas un facteur qui influence le taux de grossesse (111).

Pression douce sur le col de l'utérus pour réduire l'expulsion de l'embryon au minimum

On a suggéré que la pression douce sur le col de l'utérus, pendant le TE, pourrait minimiser l'expulsion des embryons replacés. Dans un essai de RCT récent, Mansour a trouvé que l'application mécanique d'une pression douce sur la portion vaginale du col de l'utérus, en utilisant le spéculum pendant sept minutes après le TE, améliore significativement les taux de grossesse clinique et d'implantation (112). Néanmoins, ce travail intéressant n'a pas été répété.

Embryons retenus et doubles transferts embryonnaires

La rétention d'un ou de plusieurs embryons dans le cathéter à la suite du TE présente au médecin un choix difficile, car leur retransfert immédiat pourrait déplacer l'embryon qui est déjà dans la cavité de l'utérus (113). Néanmoins, Lee *et al.* ont mené une étude rétrospective et il a trouvé que le retransfert immédiat des embryons retenus n'a pas d'effet opposé sur le résultat de la grossesse (114).

En accord avec ces résultats, des études, récemment publiées, ont suggéré que les embryons peuvent être transférés en deux occasions séparées, afin de maximiser le taux de grossesse, confirmant ainsi un travail précédent par Abramovici *et al.* (115). Phillips *et al.* et Loutradis *et al.* ont trouvé que le TE consécutif du stage de clivage de l'embryon et des blastocystes, dans le même cycle, protège contre l'échec et maximise les chances de grossesse (116, 117). Les mêmes résultats ont été rapportés par Goto *et al.* et Machtinger *et al.* (118, 119).

Après le transfert de l'embryon

Dès que le TE a été effectué, les facteurs suivants doivent être pris en considération.

Repos au lit après le transfert de l'embryon

Au début de la FIV, le prolongement du repos au lit était conseillé tentant d'améliorer le taux de grossesse. Néanmoins, les études suivantes ont montré que cela n'est pas nécessaire (5-7, 120). Ceci a été récemment confirmé selon un essai RCT par Amarín et Obeidat (2004), qui ont trouvé une différence non statistiquement significative dans le taux de grossesse clinique entre les patientes qui ont eu une heure de repos au lit (21,5 %) et celles qui ont eu 24 heures de repos au lit (18,2 %) à la suite du TE. Ce qui est intéressant, c'est que le taux d'implantation était significativement supérieur chez celles qui se sont reposées pendant une heure seulement (14,4 % *versus* 9 %) (121).

Rapports sexuels après le transfert de l'embryon

L'effet des rapports sexuels après le transfert de l'embryon a été aussi sujet de débat de peur que cela puisse mener à des contractions utérines et/ou d'infection. Néanmoins, dans un essai de RCT, Tremellen *et al.* ont trouvé que le taux de grossesse chez les femmes, qui ont eu des rapports sexuels pendant la période du périfert, n'était pas significativement différent, comparé à celles qui se sont abstenues de rapports sexuels pendant la même période. Ce qui est intéressant c'est que le taux d'implantation était significativement élevé dans le groupe qui a eu des rapports sexuels comparé au groupe qui s'est abstenu (122).

Médicaments après le transfert de l'embryon

On a proposé et utilisé divers médicaments après le TE tentant d'améliorer le résultat de la FIV et l'ICSI. Dans un essai de RCT, Waldenström *et al.* ont étudié l'effet de l'administration routinière d'une petite dose d'aspirine® (75 mg/jour) à la suite du TE et ils ont trouvé que le taux de naissance était significativement plus élevé chez les femmes qui ont pris le médicament (123). Néanmoins, deux essais RCT récents n'ont pas pu confirmer ces résultats (124, 125).

On a aussi suggéré l'administration de sildénafil, afin d'améliorer la réception de l'endomètre pendant le TE. Néanmoins, Check *et al.* ont trouvé que chez les femmes dont l'endomètre n'a pas atteint 8 mm d'épaisseur, ni l'estradiol vaginal ni le sildénafil n'ont pu améliorer significativement l'épaisseur de l'endomètre ni le flux du sang dans un cycle subséquent (126).

Plusieurs études ont montré que la présence d'agents microbiens dans le col de l'utérus ou au bout du cathéter du TE était associée à un taux de grossesse diminué (127-129). Par conséquent, l'administration routinière des antibiotiques à la suite du TE a été suggérée, mais, jusqu'à lors,

cette suggestion n'est confirmée par aucun essai RCT (130).

Transfert difficile de l'embryon

En dépit de toutes ces précautions, le TE ne peut être effectué chez certaines patientes, à cause du col de l'utérus étroit ou fermé ou à cause de la distorsion anatomique causée par le(s) myome(s) ou par des interventions chirurgicales précédentes. Dans ces cas, on peut prendre en considération une ou plusieurs des procédures suivantes.

Transfert transabdominal et transmyométrial de l'embryon

Certains cliniciens avaient essayé d'effectuer le TE transabdominal après être incapables d'introduire le cathéter dans la cavité utérine. En 1987, Lenz et ses collègues ont appliqué le TE transabdominal échoguidé chez dix patientes, mais aucune d'elles n'est devenue enceinte. D'autre part, Groutz *et al.* ont essayé le TE transmyométrial et le transcervical échoguidés chez 40 patientes, ayant une sténose cervicale ou des implantations ratées à plusieurs reprises après la FIV (131). Quatre patientes sont devenues enceintes : une après le TE transmyométrial et trois après le TE transcervical (132). La responsabilité de ces résultats médiocres a été imputée à l'augmentation des contractions de la zone jonctionnelle qui se produisent après cette procédure (133).

Transfert transvaginal et transmyométrial de l'embryon

Le TE transvaginal et transmyométrial échoguidé a été également utilisé. Kato *et al.* ont appliqué cette procédure chez 104 patientes et ont rapporté un taux de grossesse clinique de 36,5 % par tentative (134). En 1996, Sharif *et al.* ont appliqué la même procédure chez 13 patientes qui ont eu un essai de TE transcervical difficile, ou impossible, immédiatement avant le transfert réel. Quatre patientes sont devenues enceintes dont trois avec des grossesses cliniques (135). Plus récemment, Lai *et al.* ont rapporté une grossesse réussie chez une patiente avec une atrésie cervicale congénitale, qui a eu simultanément un TE transmyométrial et transtubaire après une FIV (136).

Dilatation cervicale

La dilatation cervicale est une autre solution pour les patientes ayant une sténose cervicale ou ayant raté auparavant un TE et doit être préférablement appliquée pendant un cycle précédant le cycle du traitement. Abuscheikha *et al.* ont appliqué la dilatation cervicale chez 57 patientes, qui n'ont pas réussi à être enceinte après un TE difficile ayant eu lieu auparavant, à cause d'une sténose cervicale.

18 femmes (31,6 %) ont achevé la grossesse et chez 40 patientes (70,2 %), le TE suivant a été qualifié de « facile », alors que pour les 17 autres patientes (29,8 %) ce fut difficile (137). Plus récemment, dans un essai RCT, Prapas *et al.* ont appliqué la dilatation cervicale d'un à trois mois avant la FIV chez les patientes ayant un TE préalablement difficile et ont rapporté un taux significativement élevé de grossesse, d'implantation et de naissance vivante (138). La dilatation cervicale a été également appliquée le jour du recueil ovocytaire chez des patientes suspectes d'une sténose cervicale mais les résultats étaient insatisfaisants. Groutz *et al.* ont appliqué la procédure dans 41 cycles de traitement chez 22 patientes ayant une histoire d'un TE extrêmement difficile. Seule une grossesse clinique et une autre extra-utérine ont résulté de cette procédure (139).

Correction hystéroscopique de la sténose cervicale

La canalisation hystéroscopique pour les patientes ayant une histoire d'un transfert difficile a été également suggérée. Noyes *et al.* ont appliqué la correction chirurgicale de la sténose cervicale chez huit patientes ayant une histoire d'un TE extrêmement difficile. Douze FIV avec TE postopératoire chez ces femmes ont résulté dans huit grossesses cliniques. Le taux de l'implantation de ces cycles a été 42,2 % (140). Des résultats similaires ont été rapportés par Pabucco *et al.* (141).

Usage de tiges hygroscopiques pour la dilatation cervicale lente

La dilatation lente du canal cervical, utilisant les tiges hygroscopiques pour les patientes ayant une histoire d'un transfert difficile, a été également rapportée. Glatstein *et al.* ont utilisé des lamineuses chez deux patientes avec une sténose cervicale et une histoire de plusieurs cycles ratés de FIV. Les deux patientes sont devenues enceintes (142). Plus récemment, Serhal *et al.* ont utilisé les tiges hygroscopiques cervicales chez 54 patientes. De celles-ci, 79,5 % ont eu un TE ultérieur facile et 55 % sont devenues enceintes (143).

Utiliser des cathéters spéciaux du TE

Des tentatives variées ont été effectuées pour mettre au point des cathéters spéciaux consacrés aux TE difficiles (144, 145). Toutefois, il n'y a pas de cathéters idéals qui aient acquis un usage largement accepté dans ces cas.

Congeler l'embryon et le transférer lors d'un cycle suivant

Bien sûr, si l'on a à utiliser une des procédures mentionnées ci-dessus, le fait de congeler les embryons et les transférer lors d'un cycle suivant reste toujours un choix logique (146).

Conclusion

On peut soutenir que le transfert de l'embryon est l'étape la plus critique de la reproduction assistée et doit être, à ce titre, effectué de façon délicate et méticuleuse. Un minimum de 50 transferts est souvent indispensable pour que les cliniciens acquièrent l'expérience nécessaire. Le meilleur endroit pour le dépôt de l'embryon est le centre de la cavité de l'utérus, 2 cm au-dessous du fond. Un test de transfert préalable à un transfert réel facilite ce dernier. Les transferts difficiles et l'infection cervicale sont associés aux taux bas de grossesse, mais le transfert immédiat des embryons retenus n'est point préjudiciable. Les tentatives aléatoires ont montré que l'usage de l'échographie et des cathéters mous, par opposition aux cathéters solides, est associé à de meilleurs taux de grossesse. Elles ont montré également que la présence d'air dans les cathéters, leur enlèvement immédiat, le fait de rester au lit après le TE, les rapports sexuels et l'usage de l'aspirine après le TE n'affectent pas les résultats. Beaucoup d'études sont nécessaires pour évaluer l'importance de la vessie pleine, le lavage du canal cervical avant le TE, le meilleur moyen de transfert et la meilleure position de la patiente. D'autres études sont également nécessaires pour déterminer lequel de ces deux moyens est plus utile : l'analgésie ou l'anesthésie et si une médication particulière, servant à réduire les contractions utérines et l'augmentation de la circulation du sang de l'endomètre, peut améliorer les taux de réussite chez ces femmes malheureuses.

Références

1. Edwards RG (1995) Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation. *Hum Reprod* 10 (Suppl 2): 60-6
2. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in-vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 737-56
3. Jones HW Jr, Acosta AA, Garcia JE *et al.* (1983) On the transfer of conceptuses from oocytes fertilized in-vitro. *Fertil Steril* 39: 241-3
4. Neithardt AB, Segars JH, Hennessy S *et al.* (2005) Embryo afterloading: a refinement in embryo transfer technique that may increase clinical pregnancy. *Fertil Steril* 83: 710-4
5. Sharif K, Afnan M, Lenton W *et al.* (1995) Do patients need to remain in bed following embryo transfer? The Birmingham experience of 103 in-vitro fertilization cycles with no bed rest following embryo transfer. *Hum Reprod* 10: 1427-9
6. Botta G, Grudzinskas G (1997) Is a prolonged bed rest following embryo transfer useful? *Hum Reprod* 12: 2489-92
7. Sharif K, Afnan M, Lashen H *et al.* (1998) Is bed rest following embryo transfer necessary? *Fertil Steril* 69: 478-81
8. El-Toukhy T, Khalaf Y, Braude P (2006) IVF results: optimize not maximize. *Am J Obstet Gynecol* 194: 322-31

9. Gerris JM (2005) Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Hum Reprod Update* 11: 105-21
10. Kovacs G, MacLachlan V, Rombauts L *et al.* (2003) Replacement of one selected embryo is just as successful as two embryo transfer, without the risk of twin pregnancy. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 43: 369-71
11. De Neubourg D, Gerris J (2003) Single embryo transfer – state of the art. *Reprod Biomed Online* 7: 615-22
12. Fisch JD, Sher G, Adamowicz M, Keskinetepe L (2003) The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 80: 1352-8
13. Manna C, Patrizi G, Rahman A, Sallam H (2004) Experimental results on the recognition of embryos in human assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 8: 460-9
14. Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 19: 2103-8
15. Ciray HN, Ulug U, Bahceci M (2004) Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 8: 219-23
16. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D *et al.* (2004) Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 81: 551-5
17. Milki AA, Hinckley MD, Westphal LM, Behr B (2004) Elective single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 81: 1697-8
18. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP *et al.* (1997) Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in-vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 68: 1128-31
19. De Boer KA, Catt JW, Jansen RP *et al.* (2004) Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 82: 295-8
20. Lopes AS, Greve T, Callesen H (2007) Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 67: 21-31
21. Sallam HN, El-Kassar Y, Hany Abdel-Rahman A *et al.* (2006) Glucose consumption and total protein production by preimplantation embryos in pregnant and non-pregnant women – possible methods for embryo selection. *Fertil Steril* 86 (Suppl): S114
22. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG *et al.* (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 17: 999-1005
23. Abou-Setta AM, Al-Inany HG, Mansour RT *et al.* (2005) Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 20: 3114-21
24. Buckett WM (2006) A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril* 85: 728-34
25. Mansour R, Aboulghar M, Serour G (1990) Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54: 678-81
26. Knutzen V, Stratton CJ, Sher G *et al.* (1992) Mock embryo transfer in early luteal phase, the cycle before in-vitro fertilization and embryo transfer: a descriptive study. *Fertil Steril* 57: 156-62
27. Sallam HN (2003) Embryo transfer – the elusive step. In: *Progress in Obstetrics and Gynaecology*. Studd J. ed. Edinburgh and London: Churchill Livingstone: 363-80
28. Sharif K, Afnan M, Lenton W (1995) Mock embryo transfer with a full bladder immediately before the real transfer for in-vitro fertilization treatment: the Birmingham experience of 113 cases. *Hum Reprod* 10: 1715-8
29. Urman B, Aksoy S, Alatas C *et al.* (2000) Comparing two embryo transfer catheters. Use of a trial transfer to determine the catheter applied. *J Reprod Med* 45: 135-8
30. Henne MB, Milki AA (2004) Uterine position at real embryo transfer compared with mock embryo transfer. *Hum Reprod* 19: 570-2
31. Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF *et al.* (2002) Ultrasound measurement of the uterocervical angle before embryo transfer: a prospective controlled study. *Hum Reprod* 17: 1767-72
32. Shamonki MI, Spandorfer SD, Rosenwaks Z (2005) Ultrasound-guided embryo transfer and the accuracy of trial embryo transfer. *Hum Reprod* 20: 709-16
33. Shamonki MI, Schattman GL, Spandorfer SD *et al.* (2005) Ultrasound-guided trial transfer may be beneficial in preparation for an IVF cycle. *Hum Reprod* 20: 2844-9
34. Feichtinger W, Kemeter P, Menezo Y (1986) The use of synthetic culture medium and patient serum for human in-vitro fertilization and embryo replacement. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 3: 87-92
35. Psalti I, Loumaye E, Pensis M *et al.* (1989) Evaluation of a synthetic serum substitute to replace fetal cord serum for human oocyte fertilization and embryo growth in-vitro. *Fertil Steril* 52: 807-11
36. Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC (1991) Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril* 56: 98-101
37. Laverge H, De Sutter P, Desmet R *et al.* (1997) Prospective randomized study comparing human serum albumin with fetal cord serum as protein supplement in culture medium for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12: 2263-6
38. Simon A, Safran A, Revel A *et al.* (2003) Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril* 79: 1434-8
39. Loutradi KE, Prassas I, Bili E *et al.* (2007) Evaluation of a transfer medium containing high concentration of hyaluronan in human in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 87: 48-52
40. Feichtinger W, Strohmer H, Radner KM, Goldin M (1992) The use of fibrin sealant for embryo transfer: development and clinical studies. *Hum Reprod* 7: 890-3
41. Ben-Rafael Z, Ashkenazi J, Shelef M *et al.* (1995) The use of fibrin sealant in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Fertil Menopausal Stud* 40: 303-6
42. Valojerdi MR, Karimian L, Yazdi PE *et al.* (2006) Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. *J Assist Reprod Genet* 23:207-12
43. Hinckley MD, Milki AA (2003) Rapid reaccumulation of hydrometra after drainage at embryo transfer in patients with hydrosalpinx. *Fertil Steril* 80: 1268-71
44. Hofmann GE, Warikoo P, Jacobs W (2003) Ultrasound detection of pyometra at the time of embryo transfer after ovum retrieval for in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 80: 637-8
45. Quintero RB, Sharara FI, Milki AA (2004) Successful pregnancies in the setting of exaggerated endometrial thickness. *Fertil Steril* 82: 215-7
46. Jarvela IY, Sladkevicius P, Kelly S *et al.* (2005) Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 26: 765-9
47. Zollner U, Zollner KP, Specketer MT *et al.* (2003) Endometrial volume as assessed by three-dimensional ultrasound is a predictor of pregnancy outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 80: 1515-7
48. Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Tan SL (1995) Endometrial thickness, morphology, vascular penetration and veloci-

- metry in predicting implantation in an in-vitro fertilization program. *Ultrasound Obstet Gynecol* 6: 191-8
49. Kupesic S, Bekavac I, Bjelos D, Kurjak A (2001) Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization procedures. *J Ultrasound Med* 20: 125-34
 50. Chien LW, Lee WS, Au HK, Tzeng CR (2004) Assessment of changes in utero-ovarian arterial impedance during the peri-implantation period by Doppler sonography in women undergoing assisted reproduction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 23: 496-500
 51. Ng EH, Chan CC, Tang OS *et al.* (2007) Endometrial and subendometrial vascularity is higher in pregnant patients with livebirth following ART than in those who suffer a miscarriage. *Hum Reprod* 22: 1134-41
 52. Ng EH, Chan CC, Tang OS *et al.* (2006) The role of endometrial and subendometrial blood flows measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in the prediction of pregnancy during IVF treatment. *Hum Reprod* 21: 164-70
 53. Chien LW, Au HK, Chen PL *et al.* (2002) Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 78: 245-51
 54. Maugey-Laulom B, Commenges-Ducos M, Jullien V *et al.* (2002) Endometrial vascularity and ongoing pregnancy after IVF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 104: 137-43
 55. Lewin A, Schenker JG, Avrech O *et al.* (1997) The role of uterine straightening by passive bladder distension before embryo transfer in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 14: 32-34
 56. Lorusso F, Depalo R, Bettocchi S *et al.* (2005) Outcome of in-vitro fertilization after transabdominal ultrasound-assisted embryo transfer with a full or empty bladder. *Fertil Steril* 84: 1046-8
 57. MacNamee P (1999) Vigorous flushing the cervical canal with culture medium prior to embryo transfer. Paper presented at the World Congress of IVF, Sydney
 58. Sallam HN, Farrag F, Ezzeldin A *et al.* (2000) The importance of flushing the cervical canal with culture medium prior to embryo transfer. *Fertil Steril (Suppl 1)*: 64-65
 59. Berkkanoglu M, Isikoglu M, Seleker M, Ozgur K (2006) Flushing the endometrium prior to the embryo transfer does not affect the pregnancy rate. *Reprod Biomed Online* 13: 268-71
 60. Hearn-Stokes RM, Miller BT, Scott L *et al.* (2000) Pregnancy rates after embryo transfer depend on the provider at embryo transfer. *Fertil Steril* 74: 80-6
 61. Angelini A, Brusco GF, Barnocchi N *et al.* (2006) Impact of physician performing embryo transfer on pregnancy rates in an assisted reproductive program. *J Assist Reprod Genet* 23: 329-32
 62. Barber D, Egan D, Ross C *et al.* (1996) Nurses performing embryo transfer: successful outcome of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 11:105-8
 63. Sinclair L, Morgan C, Lashen H *et al.* (1998) Nurses performing embryo transfer: the development and results of the Birmingham experience. *Hum Reprod* 13: 699-702
 64. Bjuresten K, Hreinsson JG, Fridstrom M *et al.* (2003) Embryo transfer by midwife or gynecologist: a prospective randomized study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82: 462-6
 65. Papageorgiou TC, Hearn-Stokes RM, Leondires MP *et al.* (2001) Training of providers in embryo transfer: what is the minimum number of transfers required for proficiency? *Hum Reprod* 16: 1415-9
 66. Englert Y, Puisant F, Camus M *et al.* (1986) Clinical study on embryo transfer after human in-vitro fertilization. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 3: 243-6
 67. Ribic-Pucelj M, Tomazevic T, Vogler A, Meden-Vrtovec H (1995) Risk factors for ectopic pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 12: 594-8
 68. Alvero R, Hearn-Stokes RM, Catherino WH *et al.* (2003) The presence of blood in the transfer catheter negatively influences outcome at embryo transfer. *Hum Reprod* 18: 1848-52
 69. Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF *et al.* (2003) Impact of technical difficulties, choice of catheter, and the presence of blood on the success of embryo transfer – experience from a single provider. *J Assist Reprod Genet* 20: 135-142
 70. Goudas VT, Hammitt DG, Damario MA *et al.* (1998) Blood on the embryo transfer catheter is associated with decreased rates of embryo implantation and clinical pregnancy with the use of in-vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 70: 878-82
 71. Tomas C, Tikkinen K, Tuomivaara L *et al.* (2002) The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy. *Hum Reprod* 17: 2632-5
 72. Silberstein T, Weitzen S, Frankfurter D *et al.* (2004) Cannulation of a resistant internal os with the malleable outer sheath of a coaxial soft embryo transfer catheter does not affect in-vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Fertil Steril* 82: 1402-6
 73. Cevrioglu AS, Esinler I, Bozdogan G, Yerali H (2006) Assessment of endocervical and endometrial damage inflicted by embryo transfer trial: a hysteroscopic evaluation. *Reprod Biomed Online* 13: 523-7
 74. Marconi G, Vilela M, Bello J *et al.* (2003) Endometrial lesions caused by catheters used for embryo transfers: a preliminary report. *Fertil Steril* 80: 363-7
 75. Murray AS, Healy DL, Rombauts L (2003) Embryo transfer: hysteroscopic assessment of transfer catheter effects on the endometrium. *Reprod Biomed Online* 7: 583-6
 76. Fanchin R, Righini C, de Ziegler D *et al.* (2001) Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 75: 1136-40
 77. Baruffi R, Mauri AL, Petersen CG *et al.* (2003) Effects of vaginal progesterone administration starting on the day of oocyte retrieval on pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet* 20: 517-20
 78. Shaker AG, Fleming R, Jamieson ME *et al.* (1993) Assessments of embryo transfer after in-vitro fertilization: effects of glyceryl trinitrate. *Hum Reprod* 8: 1426-8
 79. Moon HS, Park SH, Lee JO *et al.* (2004) Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 82: 816-20
 80. Van der Ven H, Diedrich K, Al-Hasani S *et al.* (1988) The effect of general anaesthesia on the success of embryo transfer following human in-vitro fertilization. *Hum Reprod (Suppl 2)*: 81-3
 81. Paulus WE, Zhang M, Strehler E *et al.* (2002) Influence of acupuncture on the pregnancy rate in patients who undergo assisted reproduction therapy. *Fertil Steril* 77: 721-4
 82. Westergaard LG, Mao Q, Krogslund M *et al.* (2006) Acupuncture on the day of embryo transfer significantly improves the reproductive outcome in infertile women: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 85: 1341-6
 83. Smith C, Coyle M, Norman RJ (2006) Influence of acupuncture stimulation on pregnancy rates for women undergoing embryo transfer. *Fertil Steril* 85: 1352-8
 84. Levitas E, Parmet A, Lunenfeld E *et al.* (2006) Impact of hypnosis during embryo transfer on the outcome of in-vitro fertilization-embryo transfer: a case-control study. *Fertil Steril* 85: 1404-8

85. Strickler RC, Christianson C, Crane JP *et al.* (1985) Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril* 43: 54-61
86. Coroleu B, Barri PN, Carreras O *et al.* (2006) Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 21: 1809-15
87. Letterie GS, Marshall L, Angle M (1999) A new coaxial catheter system with an echodense tip for ultrasonographically guided embryo transfer. *Fertil Steril* 72: 266-8
88. Sallam HN, Sadek SS (2003) Ultrasound-guided embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 80: 1042-6
89. Buckett WM (2003) A meta-analysis of ultrasound-guided versus clinical touch embryo transfer. *Fertil Steril* 80: 1037-41
90. Woolcott R, Stanger J (1997) Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum Reprod* 12: 963-6
91. Anderson RE, Nugent NL, Gregg AT *et al.* (2002) Transvaginal ultrasound-guided embryo transfer improves outcome in patients with previous failed in-vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 77: 769-75
92. Letterie GS (2005) Three-dimensional ultrasound-guided embryo transfer: a preliminary study. *Am J Obstet Gynecol* 192: 1983-7
93. Gergely RZ, de Ugarte CM, Danzer H *et al.* (2005) Three dimensional/four dimensional ultrasound-guided embryo transfer using the maximal implantation potential point. *Fertil Steril* 84: 500-3
94. Baba K, Ishihara O, Hayashi N *et al.* (2000) Where does the embryo implant after embryo transfer in humans? *Fertil Steril* 73: 123-5
95. Kramp E, Zegermacher G, Eichler C *et al.* (1995) Air in the uterine cavity after embryo transfer. *Fertil Steril* 63: 366-70
96. Moreno V, Balasch J, Vidal E *et al.* (2004) Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer. *Fertil Steril* 81: 1366-70
97. Eytan O, Elad D, Zaretsky U, Jaffa AJ (2004) A glance into the uterus during in-vitro simulation of embryo transfer. *Hum Reprod* 19: 562-69
98. Matorras R, Mendoza R, Exposito A *et al.* (2004) Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Hum Reprod* 19: 2027-30
99. Coroleu B, Barri PN, Carreras O *et al.* (2002) The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled, ultrasound-guided study. *Hum. Reprod* 17: 341-6
100. Pope CS, Cook EK, Arny M *et al.* (2004) Influence of embryo transfer depth on in-vitro fertilization and embryo transfer outcomes. *Fertil Steril* 81: 51-8
101. Frankfurter D, Silva CP, Mota F *et al.* (2003) The transfer point is a novel measure of embryo placement. *Fertil Steril* 79: 1416-21
102. Frankfurter D, Trimarchi JB, Silva CP, Keefe DL (2004) Middle to lower uterine segment embryo transfer improves implantation and pregnancy rates compared with fundal embryo transfer. *Fertil Steril* 81: 1273-7
103. Franco JG Jr, Martins AM, Baruffi RL *et al.* (2004) Best site for embryo transfer: the upper or lower half of endometrial cavity? *Hum Reprod* 19: 1785-90
104. Oliveira JB, Martins AM, Baruffi RL *et al.* (2004) Increased implantation and pregnancy rates obtained by placing the tip of the transfer catheter in the central area of the endometrial cavity. *Reprod Biomed Online* 9: 435-41
105. Cavagna M, Contart P, Petersen CG *et al.* (2006) Implantation sites after embryo transfer into the central area of the uterine cavity. *Reprod Biomed Online* 13: 541-6
106. Silberstein T, Trimarchi JR, Shackelton R *et al.* (2005) Ultrasound-guided miduterine cavity embryo transfer is associated with a decreased incidence of retained embryos in the transfer catheter. *Fertil Steril* 84: 1510-2
107. Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A (1993) Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 60: 919-21
108. Dorn C, Reinsberg J, Schlebusch H *et al.* (1999) Serum oxytocin concentration during embryo transfer procedure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 87: 77-80
109. Lesny P, Killick SR, Robinson J *et al.* (1999) Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod* 14: 2367-70
110. Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM *et al.* (1998) Uterine contractions at the time of embryo transfer: a hindrance to implantation? *Contracept Fertil Sex* 26: 498-505
111. Martinez F, Coroleu B, Parriego M *et al.* (2001) Ultrasound-guided embryo transfer: immediate withdrawal of the catheter versus a 30 second wait. *Hum Reprod* 16: 871-74
112. Mansour R (2005) Minimizing embryo expulsion after embryo transfer: a randomized controlled study. *Hum Reprod* 20: 170-4
113. Visser DS, Fourie FL, Kruger HF (1993) Multiple attempts at embryo transfer: effect on pregnancy outcome in an in-vitro fertilization and embryo transfer program. *J Assist Reprod Genet* 10: 37-43
114. Lee HC, Seifer DB, Shelden RM (2004) Impact of retained embryos on the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 82: 334-37
115. Abramovici H, Dirnfeld M, Weisman Z *et al.* (1988) Pregnancies following the interval double-transfer technique in an in-vitro fertilization-embryo transfer program. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 5: 175-6
116. Phillips SJ, Dean NL, Buckett WM, Tan SL (2003) Consecutive transfer of day 3 embryos and of day 5-6 blastocysts increases overall pregnancy rates associated with blastocyst culture. *J Assist Reprod Genet* 20: 461-4
117. Loutradis D, Drakakis P, Dalianidis K *et al.* (2004) A double embryo transfer on days 2 and 4 or 5 improves pregnancy outcome in patients with good embryos but repeated failures in IVF or ICSI. *Clin Exp Obstet Gynecol* 31: 63-6
118. Goto S, Shiotani M, Kitagawa M *et al.* (2005) Effectiveness of two-step (consecutive) embryo transfer in patients who have two embryos on day 2: comparison with cleavage-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 83: 721-3
119. Machtinger R, Dor J, Margolin M *et al.* (2006) Sequential transfer of day 3 embryos and blastocysts after previous IVF failures despite adequate ovarian response. *Reprod Biomed Online* 13: 376-9
120. Bar-Hava I, Kerner R, Yoeli R *et al.* (2005) Immediate ambulation after embryo transfer: a prospective study. *Fertil Steril* 83: 594-7
121. Amarin ZO, Obeidat BR (2004) Bed rest versus free mobilisation following embryo transfer: a prospective randomised study. *BJOG* 111: 1273-6
122. Tremellen KP, Valbuena D, Landeras J *et al.* (2000) The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Hum Reprod* 15: 2653-8
123. Waldenström U, Hellberg D, Nilsson S (2004) Low-dose aspirin in a short regimen as standard treatment in in-vitro fertilization: a randomized, prospective study. *Fertil Steril* 81: 1560-4
124. Pakkila M, Rasanen J, Heinonen S *et al.* (2005) Low-dose aspirin does not improve ovarian responsiveness or pregnancy rate in IVF and ICSI patients: a randomized, placebo-controlled double-blind study. *Hum Reprod* 20: 2211-4
125. Duvan CI, Ozmen B, Satioglu H *et al.* (2006) Does addition of low-dose aspirin and/or steroid as a standard treatment in nonselected intracytoplasmic sperm injection cycles

- improve in-vitro fertilization success? A randomized, prospective, placebo-controlled study. *J Assist Reprod Genet* 23: 15-21
126. Check JH, Graziano V, Lee G *et al.* (2004) Neither sildenafil nor vaginal estradiol improves endometrial thickness in women with thin endometria after taking oral estradiol in graduating dosages. *Clin Exp Obstet Gynecol* 31: 99-102
 127. Egbase PE, al-Sharhan M, al-Othman S *et al.* (1996) Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 11: 1687-9
 128. Moore DE, Soules MR, Klein NA *et al.* (2000) Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 74: 1118-24
 129. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J *et al.* (2004) Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 32: 135-9
 130. Egbase PE, Udo EE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG (1999) Prophylactic antibiotics and endocervical microbial inoculation of the endometrium at embryo transfer. *Lancet* 354: 651-2
 131. Lenz S, Leeton J, Rogers P, Trounson A (1987) Transfundal transfer of embryos using ultrasound. *J In-Vitro Fert Embryo Transf* 4: 13-17
 132. Groutz A, Lessing JB, Wolf Y *et al.* (1997) Comparison of transmyometrial and transcervical embryo transfer in patients with previously failed in-vitro fertilization-embryo transfer cycles and/or cervical stenosis. *Fertil Steril* 67: 1073-6
 133. Biervliet FP, Lesny P, Maguiness SD *et al.* (2002) Transmyometrial embryo transfer and junctional zone contractions. *Hum Reprod* 17: 347-50
 134. Kato O, Takatsuka R, Asch RH (1993) Transvaginal-transmyometrial embryo transfer: the Towako method; experiences of 104 cases. *Fertil Steril* 59: 51-3
 135. Sharif K, Afnan M, Lenton W *et al.* (1996) Transmyometrial embryo transfer after difficult immediate mock transcervical transfer. *Fertil Steril* 65:1071-4
 136. Lai TH, Wu MH, Hung KH *et al.* (2001) Successful pregnancy by transmyometrial and transtubal embryo transfer after IVF in a patient with congenital cervical atresia who underwent uterovaginal canalization during caesarean section: case report. *Hum Reprod* 16: 268-71
 137. Abusheikha N, Lass A, Akagbosu F, Brinsden P (1999) How useful is cervical dilatation in patients with cervical stenosis who are participating in an in-vitro fertilization-embryo transfer program? The Bourn Hall experience. *Fertil Steril* 72: 610-2
 138. Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y *et al.* (2004) Cervical dilatation has a positive impact on the outcome of IVF in randomly assigned cases having two previous difficult embryo transfers. *Hum Reprod* 19: 1791-5
 139. Groutz A, Lessing JB, Wolf Y *et al.* (1997) Cervical dilatation during ovum pick-up in patients with cervical stenosis: effect on pregnancy outcome in an in-vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 67: 909-11
 140. Noyes N, Licciardi F, Grifo J *et al.* (1999) In-vitro fertilization outcome relative to embryo transfer difficulty: a novel approach to the forbidding cervix. *Fertil Steril* 72: 261-5
 141. Pabuccu R, Ceyhan ST, Onalan G *et al.* (2005) Successful treatment of cervical stenosis with hysteroscopic canalization before embryo transfer in patients undergoing IVF: a case series. *J Minim Invasive Gynecol* 12: 436-8
 142. Glatstein IZ, Pang SC, McShane PM (1997) Successful pregnancies with the use of laminaria tents before embryo transfer for refractory cervical stenosis. *Fertil Steril* 67: 1172-4
 143. Serhal P, Ranieri DM, Khadum I, Wakim RA (2003) Cervical dilatation with hygroscopic rods prior to ovarian stimulation facilitates embryo transfer. *Hum Reprod* 18: 2618-20
 144. El Danasouri I, Milki A (1992) A new cervical introducer for embryo transfer with soft open-end catheters. *Fertil Steril* 57: 939-41
 145. Patton PE, Stoelk EM (1993) Difficult embryo transfer managed with a coaxial catheter system. *Fertil Steril* 60: 182-3
 146. Sallam HN (2005) Embryo transfer: factors involved in optimizing the success. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17: 289-98

C. Sifer

Aspects biologiques du transfert embryonnaire

Introduction

Habituellement, le biologiste encadre la manipulation du cathéter (KT) de transfert embryonnaire (TE), défini par le clinicien, en : (i) choisissant le(s) embryon(s) à transférer selon leur qualité, (ii) chargeant les embryons et (iii) s'assurant de l'absence de retour d'embryons après le geste, tout en qualifiant la difficulté de celui-ci à l'aide de critères objectifs (présence de sang sur le KT, durée du transfert, changement de matériel, utilisation d'une pince de Pozzi). Cela lui permet de collecter des datas qui renseigneront sur les principaux paramètres d'intérêt du TE (combien et quel(s) embryon(s), quand transférer, pour qui, par qui, avec quel matériel et selon quelles modalités...), permettant ainsi d'optimiser cette procédure.

Le but de ce travail était de déterminer parmi ces paramètres biologiques encadrant le TE, lors d'une tentative de fécondation *in vitro* (FIV) classique ou avec micromanipulation (ICSI), ceux qui influençaient ou non l'obtention d'une grossesse. Pour ce faire, nous avons analysé la littérature ainsi qu'une série rétrospective de 3 299 TE frais, effectués dans notre centre de 1997 à 2006, et ayant permis d'obtenir 977 (29,6 %) grossesses cliniques (GC).

Le TE : comment ?

Sur le plan clinique, le TE était systématiquement effectué dans cette série après un KT test, effectué précédemment en consultation afin de mesurer l'hystérométrie, repérer le trajet cervical et ainsi choisir le type de KT. Sur le plan biologique, les embryons choisis pour le TE étaient dans tous les cas de cette série chargés au sein d'une colonne continue de milieu de culture après rinçage du KT. Une deuxième technique, qui encadre par deux bulles d'air la goutte de milieu de culture contenant les embryons à transférer, est disponible mais n'a pas fait l'objet d'une évaluation dans notre centre. Cependant, les données de la littérature montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre ces

deux procédures (1, 2) (fig. 1), même si la procédure avec bulles d'air serait, en repérant plus précisément le site de dépôt des embryons dans la cavité utérine, plus adaptée aux TE effectués sous échographie (3).

L'éclosion assistée, ou *hatching*, est habituellement indiquée en cas d'échec répété d'implantation d'embryons de belle qualité, d'augmentation de l'épaisseur de la zone pellucide (ZP) des embryons transférés, et parfois pour âge féminin élevé. Il peut être effectué par ouverture (mécanique, chimique ou par laser) ou amincissement (enzymatique ou par laser) de la ZP. Ces indications sont cependant mal évaluées dans la littérature (nombre d'embryon précédemment transféré ? Taille seuil de la ZP en μm ? Quel âge ?). Nous avons effectué un *hatching* dans 250 TE de notre série, avec un taux de GC égal à 28,0 %, non significativement différent du taux de GC (29,7 %) obtenu à la suite de 3 049 TE sans *hatching*. L'analyse de sous-groupes appariés est en cours et pourra peut-être préciser un domaine d'application efficace de cette méthode. En effet, une méta-analyse récente montre un bénéfice du *hatching*, seulement par ouverture de la ZP ou en cas de femmes incluses de mauvais pronostic (âge féminin ≥ 35 ans, rang de tentative > 1 , faible recrutement ovocytaire) (4). Enfin, une étude prospective randomisée, récemment effectuée dans notre laboratoire, a permis de montrer l'absence d'intérêt du *hatching* par amincissement de la ZP lors du transfert d'embryons congelés (TEC) (5).

Un enrichissement des milieux de transport des embryons en glycosaminoglycane, dérivé de l'acide hyaluronique (AH), connu pour son action dans les phénomènes d'adhésion cellulaire, alimente actuellement une controverse dans la littérature. Ainsi, les TE effectués en utilisant ce type de colle biologique seraient soit associés à une augmentation des taux de GC et d'implantation (6-8), soit sans effet sur ces deux paramètres (9-11). Afin de répondre à cette controverse, nous avons constitué une série prospective continue où tous les couples pris en charge pour une tentative de FIV/ICSI dans notre centre ont été inclus de janvier 2009 à juillet 2009 dans le groupe d'étude. Tous les TE étaient effectués en utilisant un milieu enrichi en AH. Dans le

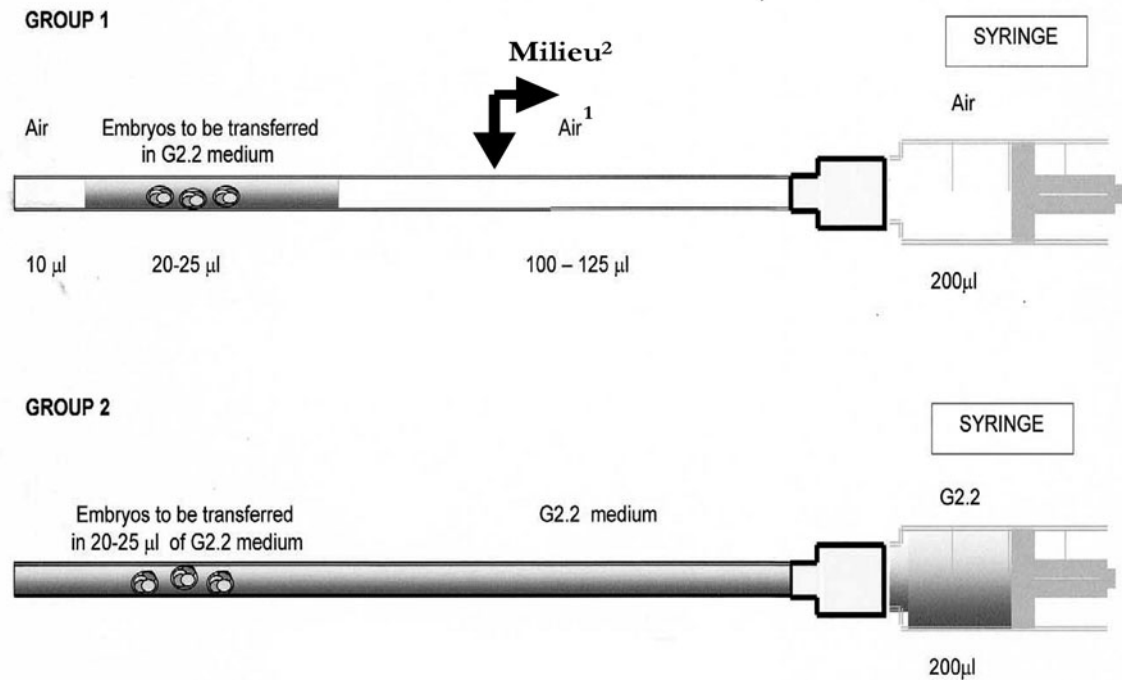


Fig. 1 – Schéma de deux différentes procédures de montage des embryons dans un cathéter de transfert embryonnaire. (Groupe 1 : bulle embryonnaire encadrée d'air ; Groupe 2 : colonne continue de milieu de culture.) Aucune différence significative n'a été rapportée entre les deux procédures concernant les taux d'implantation et de grossesse clinique (1, 2).

cadre de cette étude, cette série a été appariée, en fonction de la date d'inclusion, à une série rétrospective continue incluant toutes les tentatives de FIV/ICSI effectuées du 1^{er} janvier 2008 au 31 juillet 2008. Dans ce groupe contrôle, les TE étaient effectués à l'aide d'un milieu classique. Le critère de jugement principal était le taux de GC par transfert, comparé globalement entre les deux groupes, puis en fonction de l'âge des femmes, et de l'existence d'au moins un échec d'implantation lors d'une tentative précédente. Au total, 292 (groupe d'étude) et 296 tentatives (groupe contrôle) de FIV/ICSI ont été incluses. L'âge des femmes, la durée d'infertilité, le caractère primaire ou secondaire de l'infertilité, la durée de stimulation, l'indice de masse corporelle (IMC), la fréquence du type de traitement de stimulation ou des ovocytes, la quantité totale de FSH, les nombres moyens (i) d'ovocytes recueillis, (ii) d'ovocytes fécondés, (iii) d'embryons totaux et de bonne qualité, (iv) d'embryons transférés n'étaient pas significativement différents. En revanche, les taux de GC (32,9 % (96/292)) et d'implantation (22,2 %) étaient significativement augmentés dans le groupe d'étude lorsque comparés à ceux du groupe contrôle (25,0 % (74/296) ; $p = 0,035$; 15,4 % ; $p = 0,04$) (tableau I). Nous avons également observé que les taux de GC et d'implantation, par TE effectué en utilisant l'EmbryoGlue® (Vitrolife, Kungsbacka, Suède), étaient significativement augmentés (i) chez les femmes

de plus de 35 ans, comparé avec celui du groupe contrôle (taux de GC : 30,7 vs 19,1 % ; $p = 0,02$; implantation : 19,7 vs 11,8 % ; $p = 0,03$) ou (ii) en cas d'au moins un échec d'implantation précédent (taux de GC : 30,1 vs 18,4 % ; $p = 0,02$; implantation : 20,6 vs 12,8 % ; $p = 0,02$) (tableau I). Cette différence n'était pas retrouvée chez les femmes de moins de 35 ans ou lors de la première tentative de FIV/ICSI (tableau I) (12).

Le TE : avec quel matériel ?

Les TE effectués en utilisant un KT rigide ($n = 795$), lorsque comparés à ceux effectués avec un KT souple ($n = 2\,504$), étaient associés à une diminution significative des taux de GC (26,8 vs 30,6 % ; $p = 0,04$). Ce résultat est en accord avec celui d'une méta-analyse récente (13). Une baisse significative des taux de GC (25,0 vs 30,7 % ; $p = 0,01$) était également observée lorsque le TE était qualifié de difficile (597/3 299) (retour d'embryon, changement KT, utilisation d'une pince Pozzi, sang sur KT, temps > 2 minutes) par le biologiste, ce, en accord avec une méta-analyse récente sur ce sujet (14). Par ailleurs, le TE était plus fréquemment réputé difficile lorsque celui-ci utilisait un KT rigide plutôt qu'un KT souple (37,2 vs 12,2 % ; $p < 0,0001$).

Tableau I – Taux de grossesse clinique et d'implantation globaux ou en fonction de l'âge des femmes et du rang de tentative de FIV/ICSI utilisant ou non l'EmbryoGlue® comme milieu de transfert embryonnaire.

	Groupe d'étude (EmbryoGlue®) <i>n</i> = 292	Groupe contrôle (pas d'EmbryoGlue®) <i>n</i> = 296	<i>p</i>
Taux d'implantation (%)	22,2	15,4	0,04
Nbre grossesses cliniques (%)	96 (32,9)	74 (25,0)	0,03
Âge			
Nbre grossesses (%) < 35 ans	54/155 (34,8)	47/154 (30,5)	0,41
≥ 35 ans	42/137 (30,7)	27/142 (19,1)	0,02
Taux d'implantation < 35 ans	26,0	23,1	0,50
≥ 35 ans	19,7	11,9	0,03
Rang			
Nbre grossesses (%) = 1	50/139 (36,0)	46/144 (31,9)	0,47
>1	46/153 (30,1)	28/152 (18,4)	0,02
Taux d'implantation = 1	25,8	22,8	0,51
>1	20,6	12,8	0,02

p < 0,05 : différence significative.

Le TE : par qui ?

L'étude du suivi dans le temps du taux de GC par opérateur clinique et biologique, effectuant le geste du TE, nous a permis d'obtenir plusieurs résultats intéressants.

Tout d'abord, nous avons pu déceler une dérive importante du taux de GC par TE de 2001 à 2003 d'un de nos opérateurs biologiques (19,2 %), lorsqu'il a été comparé à la moyenne du laboratoire (29,2 % ; *p* = 0,008). Après modification et standardisation de notre procédure de chargement des embryons dans le KT, le taux de GC moyen de ce même opérateur a rejoint celui du laboratoire. Ce résultat montre l'importance du suivi des actes biologiques en AMP, permettant à la fois d'identifier d'éventuelles dérives mais aussi de mener les actions correctrices adéquates (fig. 2).

De plus, nous avons comparé les TE effectués soit par un clinicien, soit par un chirurgien et avons observé l'absence de différence significative, que ce soit concernant le taux de GC (31,2 vs 32,6 %) ou le taux de TE difficile (15,5 vs 16,5 %). Ces résultats sont conformes à ceux publiés dans la littérature (15, 16).

Enfin, nous avons vérifié que notre procédure clinique du TE ne nécessitait pas de courbe d'apprentissage pour l'obtention d'un taux optimisé de GC. En effet, en 2003, 2004 et 2005, le taux de GC des 20 premiers TE de trois opérateurs (deux chirurgiens et un clinicien), ayant une stricte connaissance de la procédure écrite, a été comparé à celui de leurs TE suivants. Aucune différence significative n'a pu être observée (opérateurs 1 : 35,0 vs 33,0 % ; 2 : 26,3 vs 26,4 % ; 3 : 30,0 vs 37,1 % ; 1 + 2 + 3 (nombre total de TE = 290) : 29,9 vs 32,4 %), ce

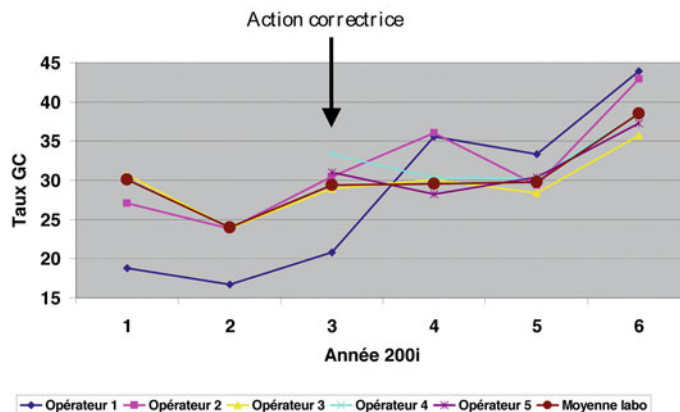


Fig. 2 – Intérêt du suivi dans le temps de la manipulation du cathéter de transfert embryonnaire par différents opérateurs biologiques. L'action correctrice menée en 2003 concernant l'opérateur 1 a permis d'augmenter, dès 2004, son taux de grossesse clinique de façon significative (*p* = 0,003).

qui est en accord avec une étude rétrospective précédemment publiée, utilisant la même procédure de TE que celle de notre étude (17).

Le TE : quand ?

Notre analyse nous a permis également de montrer qu'un TE effectué à j3 (*n* = 2 156) était associé à une augmentation significative des taux de GC lorsqu'il est comparé à j2 (*n* = 1 090) (32,1 vs 25,0 % ; *p* < 0,0001). Ce résultat est en accord avec une méta-analyse précédemment publiée sur ce sujet (18), même si cette dernière ne montre pas de différence significative entre les TE frais à j2 ou j3 concernant la comparaison des taux de grossesse évolutive et d'accouchement. Une étude récente, comparant l'issue de 339 transferts d'embryons congelés (TEC) à j2 ou j3, nous avait permis de montrer que, malgré un taux de survie identique, les taux de GC et d'enfants nés vivants étaient supérieurs à j3 (19). Il est important d'ajouter que certaines méta-analyses récentes tendent à montrer qu'un TE au stade blastocyste pourrait augmenter les taux de naissance, lorsque comparés aux TE au stade j2/j3 (20, 21). Cependant, cela semble effectif uniquement dans les cas favorables, à savoir, dans la population des femmes jeunes, de rang de tentatives 1 ou 2, avec de nombreux embryons de bonne qualité à j2/j3 de la tentative (20) (tableau II). De plus, toutes les études prospectives randomisées disponibles concernant la comparaison du taux de GC cumulé après TE frais et TEC issus d'un même cycle montrent l'absence d'avantage du TE à j5/j6 comparé à j2/j3 (22, 23). Certains auteurs concluent ainsi à la nécessaire amélioration des programmes de congélation/décongélation des

blastocystes avant de systématiser le TE à j5/j6 dans une population sélectionnée (23).

Le TE : combien d'embryon et pour qui ?

L'analyse rétrospective de nos résultats nous a permis de retenir certains critères comme prédictifs de la survenue d'une grossesse gémellaire ou unique (âge féminin ≤ 36 ans, rang de tentative 1 ou 2, ≥ 2 embryons d'excellente qualité). Ainsi, une étude prospective non randomisée, débutée en 2005, nous a permis de proposer dans une population sélectionnée le transfert d'un embryon unique (eSET) et de comparer les résultats chez les couples ayant accepté ou refusé (24). Nous avons ainsi observé, sur une période incluant 2007 (*n* = 223 transferts d'embryon unique proposés), que le taux de GC cumulé était similaire avec cependant une diminution du risque de grossesse multiple (3,6 vs 19,3 % ; *p* = 0,007) confirmant les résultats disponibles dans la littérature (25-27). Plus globalement, et depuis 2005, nous avons diminué significativement le nombre moyen d'embryons transférés, passant de 2,2 en 2005 à 1,8 en 2007 (*p* < 0,0001), ainsi que le taux de grossesse multiple par grossesse clinique (22,2 vs 12,2 % ; *p* = 0,008), sans que le taux de GC ne soit modifié (29,5 vs 34,5 %).

Conclusions

Au total, même si le TE reste un geste dont l'issue dépend de nombreux paramètres cliniques, l'évaluation de cette procédure sous l'angle biologique bénéficie clairement à l'optimisation de son effi-

Tableau II – Méta-analyses comparant l'issue clinique des transferts embryonnaires à j2/3 ou j5/6. D'après Blake (20) et Papanikolaou (21).

	j2/3	j5/6	<i>p</i>	OR [IC95 %]
G Clin (<i>n</i> = 17 ; 1 000 P)	36,2 %	40,1 %	0,05	1,29 [1,10–1,52]
Naissance (<i>n</i> = 9 ; 600 P)	29,4 %	36,0 %	0,02	1,35 [1,05–1,74]
Congel (<i>n</i> = 9)	59,9 %	41,0 %	< 0,00001	0,45 [0,36–0,56]
Échec transfert (<i>n</i> = 16)	3,4 %	8,9 %	< 0,00001	2,85 [1,97–4,11]
<i>Naissance / j random</i>				
Cycle (<i>n</i> = 4 ; 300 P)	27,1 %	33,1 %	0,1	1,32 [0,95–1,83]
j0/j1 (<i>n</i> = 3 ; 200 P)	39,2 %	37,6 %	0,8	0,94 [0,56–1,57]
j2/j3 (<i>n</i> = 1 ; 100 P)	27,4 %	47,5 %	0,008	2,40 [1,25–4,60]
<i>N° Embryon T</i>				
Égal (<i>n</i> = 5 ; 500 T)	30,9 %	38,3 %	0,02	1,41 [1,07–1,85]
j2/3 > j5 (<i>n</i> = 4 ; 200 T)	23,5 %	26,6 %	0,7	1,11 [0,6–2,07]
<i>Naissance/Pronostic</i>				
Bon (<i>n</i> = 5 ; 400 P)	28,4 %	37,1 %	0,01	1,49 [1,10–2,43]

n : nombre d'études prospectives randomisées incluses ; P : nombre de ponctions ovariennes ; j : jour ; random : randomisation ; T : transfert embryonnaire ; G Clin : taux de grossesse clinique ; OR : odd ratio ; IC95 % : intervalle de confiance 95 %.

cacité. Ainsi, même s'il semble difficile d'affirmer quand pratiquer le TE (j2, j3, j5 ?), notre expérience nous conseille (i) l'utilisation des KT souples, (ii) l'évaluation des résultats obtenus par les opérateurs cliniques et biologiques, (iii) l'utilisation dans certains cas de milieux de TE enrichi en AH et (iv) l'eSET dans une population sélectionnée, s'inscrivant dans une politique de réduction globale du nombre d'embryons transférés.

Références

- Krampl E, Zegermacher G, Eichler C *et al.* (1995) Air in the uterine cavity after embryo transfer. *Fertil Steril* 63: 366-70
- Moreno V, Balasch J, Vidal E *et al.* (2004) Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer. *Fertil Steril* 81: 1366-70
- Abou-Setta AM (2007) What is the best site for embryo deposition? A systematic review and meta-analysis using direct and adjusted indirect comparisons. *Reprod Biomed Online* 14: 611-9
- Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C *et al.* (2006) Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* CD001894
- Sifer C, Sellami A, Poncelet C *et al.* (2006) A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod* 21: 2384-9
- Friedler S, Schachter M, Strassburger D *et al.* (2007) A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. *Hum Reprod* 22: 2444-8
- Urman B, Yakin K, Ata B *et al.* (2008) Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 90: 604-12
- Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Ashtiani SK (2008) Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 90: 84-91
- Korosec S, Virant-Klun I, Tomazevic T *et al.* (2007) Single fresh and frozen-thawed blastocyst transfer using hyaluronan-rich transfer medium. *Reprod Biomed Online* 15: 701-7
- Loutradi KE, Prassas I, Bili E *et al.* (2007) Evaluation of a transfer medium containing high concentration of hyaluronan in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 87: 48-52
- Hazlett WD, Meyer LR, Nasta TE *et al.* (2008) Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer medium. *Fertil Steril* 90: 214-6
- Sifer C, Mour P, Tranchant S *et al.* (2009) Is there an interest in the addition of hyaluronan to human embryo culture in IVF/ICSI attempts?. *Gynecol Obstet Fertil* 37: 884-9
- Abou-Setta AM, Al-Inany HG, Mansour RT *et al.* (2005) Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 20: 3114-21
- Spandorfer SD, Goldstein J, Navarro J *et al.* (2003) Difficult embryo transfer has a negative impact on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 79: 654-5
- Bjuresten K, Hreinsson JG, Fridstrom M *et al.* (2003) Embryo transfer by midwife or gynecologist: a prospective randomized study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82: 462-6
- Barber D, Egan D, Ross C *et al.* (1996) Nurses performing embryo transfer: successful outcome of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 11: 105-8
- Papageorgiou TC, Hearn-Stokes RM, Leondires MP *et al.* (2001) Training of providers in embryo transfer: what is the minimum number of transfers required for proficiency? *Hum Reprod* 16: 1415-9
- Oatway C, Gunby J, Daya S (2004) Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* CD004378
- Sifer C, Sellami A, Poncelet C *et al.* (2006) Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril* 86: 1537-40
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M (2007) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* CD002118
- Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H *et al.* (2008) Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23: 91-9
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M *et al.* (2002) Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 17: 1852-5
- Guerif F, Lemseffer M, Bidault R *et al.* (2009) Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod*
- Leniaud L, Poncelet C, Porcher R *et al.* (2008) Prospective evaluation of elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer following in vitro fertilization: a two-year French hospital experience. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 159-65
- Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K *et al.* (1999) Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 14: 2581-7
- Martikainen H, Tiitinen A, Tomas C *et al.* (2001) One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum Reprod* 16: 1900-3
- Thurin A, Hausken J, Hillensjo T *et al.* (2004) Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* 351: 2392-402

V Cryopréservation

J. Donnez et M.-M. Dolmans

Congélation du tissu ovarien avant chimiothérapie : un formidable espoir pour nos jeunes patientes cancéreuses

Introduction

Gâce aux progrès récents dans le domaine oncologique, l'espérance de vie des jeunes patientes atteintes d'un cancer a fortement augmenté. Malheureusement, selon leur agressivité, les traitements chimio- et/ou radiothérapeutiques peuvent causer une défaillance ovarienne précoce et une perte irréversible de la fertilité, entraînant des effets majeurs sur la qualité de vie à long terme des patientes. Le type de chimiothérapie et la dose reçue ainsi que l'âge de la patiente déterminent le risque de ménopause précoce. Celui-ci est bien sûr augmenté en cas d'association à de la radiothérapie, en particulier les irradiations pelviennes et les irradiations corporelles totales (1, 2).

Options permettant de préserver la fertilité chez la femme

Plusieurs options permettent de préserver la fertilité chez les patientes dont la population germinale est menacée : la cryopréservation des embryons, la cryopréservation des ovocytes ou la cryopréservation du tissu ovarien (2-5). Le choix dépend de plusieurs paramètres : le type et l'urgence de la chimiothérapie, le type de cancer, l'âge de la patiente et la présence ou non d'un partenaire.

La récolte d'ovocytes et la fécondation *in vitro* avec congélation des embryons sont les seules solutions que l'on puisse offrir dans le cadre de la pratique clinique courante. Néanmoins, elles entraînent bien souvent un délai inacceptable dans le traitement du cancer dû à la stimulation ovarienne.

La cryopréservation du cortex ovarien présente l'avantage de pouvoir être appliquée sans délai et de permettre une bonne survie ovocytaire. Elle ne nécessite pas de recourir à la stimulation ovarienne et peut donc être proposée à des filles prépubères. La grande majorité des follicules présents dans le cortex ovarien sont des follicules primordiaux, qui résistent bien à la congélation. Cependant, ces follicules primordiaux contiennent des ovocytes immatures et non encore fécondables. Afin de per-

mettre la restauration de la fertilité après décongélation du tissu ovarien, il est donc nécessaire de faire croître et mûrir ces follicules afin d'obtenir des ovocytes matures pour la fécondation. Ceci peut se réaliser soit par culture de follicules *in vitro*, soit par greffe de tissu ovarien.

Indications

Les indications sont reprises au tableau I.

Greffe de tissu ovarien cryopréservé

Afin de permettre la restauration de la fertilité après décongélation du tissu ovarien, deux approches sont envisagées : la greffe de tissu ovarien et la culture de follicules *in vitro*.

Les techniques de culture de tissu ovarien avec maturation folliculaire *in vitro* ont prouvé leur efficacité chez la souris (6) – avec cependant encore un rendement extrêmement faible – mais elles ne sont pas encore au point pour l'espèce humaine. Les difficultés sont liées entre autres à la longueur du développement folliculaire humain qui pose d'énormes problèmes techniques (7).

La greffe de tissu ovarien est un modèle expérimental qui a fait ses preuves depuis de nombreuses années dans différentes espèces. On sait en effet qu'il n'est pas besoin d'anastomoses vasculaires pour que les greffons survivent, car la néovascularisation qui apparaît est suffisante pour assurer la survie et la croissance d'au moins une partie des follicules primordiaux.

L'approche de greffe de tissu cortical est actuellement la plus prometteuse. Le choix du site de ces autogreffes est très important et de très nombreux sites ont été testés dans de nombreuses espèces. Si l'on réimplante le tissu dans sa situation princeps (greffe orthotopique), on peut espérer une fertilité naturelle et une grossesse spontanée. On peut également imaginer la réimplantation dans un autre site (greffe hétérotopique), mais ce type de greffe nécessite le recours à la fécondation *in vitro* pour

Tableau I – Indications.

Malignant	Non-malignant
a) Extrapelvic diseases Bone cancer (osteosarcoma – Ewing’s sarcoma) Breast cancer Melanoma Neuroblastoma Bowel malignancy	a) Uni/bilateral oophorectomy Benign ovarian tumors Severe and recurrent endometriosis BRCA-1 or BRCA-2 mutation carriers
b) Pelvic diseases - Non-gynecological malignancy Pelvic sarcoma Sacroblastoma Rhabdomyosarcoma Sacral tumors Rectosigmoid tumors - Gynecological malignancy Early cervical carcinoma Early vaginal carcinoma Early vulvar carcinoma Selected cases of ovarian carcinoma (stage IA) Borderline ovarian tumors	b) Risk of premature menopause Turner’s syndrome Family history Benign diseases requiring chemotherapy: autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Behçet’s disease, Wegener’s granulomatosis)
c) Systemic diseases Hodgkin’s disease Non-Hodgkin’s lymphoma Leukemia Medulloblastoma	c) Bone marrow transplantation Benign hematological diseases: sickle cell anemia, thalassemia major, aplastic anemia Autoimmune diseases unresponsive to immunosuppressive therapy

obtenir une grossesse (8). L'autotransplantation de tissu ovarien cryopréservé a été décrite chez l'humain en orthotopique et en hétérotopique (2). Notre équipe a obtenu la toute première naissance après greffe orthotopique de tissu cortical ovarien décongelé chez une patiente après guérison d'un lymphome hodgkinien (9). Depuis 2004, ce succès a été confirmé dans le monde par sept autres naissances (10-14) et une seconde grossesse évolutive dans notre service.

Le protocole visant à évaluer les potentialités et les risques liés à cryopréservation ovarienne a été accepté en 1995 par le comité d'éthique de l'Université Catholique de Louvain. Depuis lors, plus de 300 patientes ont bénéficié d'une cryopréservation ovarienne avant traitement chimiothérapique dans notre service. Les indications sont reprises au tableau I.

La greffe de tissu ovarien : nécessité de poursuivre la recherche expérimentale

Ces résultats prouvent que l'autotransplantation de cortex ovarien cryopréservé est cliniquement applicable. Cependant, avant de proposer cette technique dans la pratique clinique courante, il nous paraît essentiel de poursuivre la recherche expérimentale dans ce domaine afin de : 1) maximiser les chances d'obtenir une grossesse spontanée, 2) développer

de nouvelles options pour les indications comportant un risque de métastase ovarienne (telles que leucémies, cancers du sein et de l'ovaire).

Afin de proposer le mode de transplantation qui convient le mieux en fonction de chaque situation clinique (type de cancer, risque de transmission, âge), trois options sont investiguées :

- la congélation et l'autogreffe de cortex ovarien dont nous venons de démontrer l'applicabilité en clinique ;
- la congélation et l'autogreffe de l'ovaire entier réduisant les problèmes associés à l'ischémie ;
- la cryopréservation et l'autogreffe de follicules isolés évitant le risque de retransmission de cellules malignes via le greffon.

La greffe de fragments

Plusieurs études réalisées sur modèle murin, dont celles de notre laboratoire (15, 16), montrent que la greffe de cortex ovarien humain entraîne une perte de 50 à 65 % des follicules primordiaux et de la totalité des follicules en croissance. Cette dégénérescence folliculaire serait liée à l'ischémie consécutive au délai (de 2 à 5 jours) de revascularisation du greffon, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été caractérisés (17).

Une meilleure connaissance des mécanismes de revascularisation des greffons permettra de

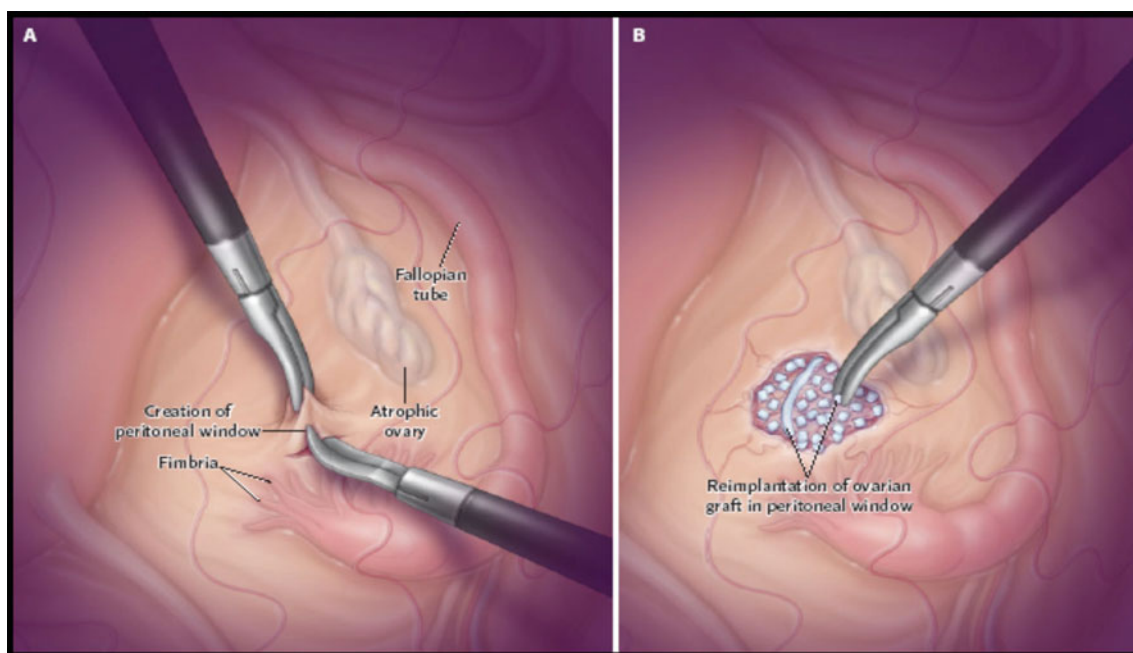


Fig. 1 – A. Au cours de la laparoscopie, une fenêtre péritonéale est créée et les bords sont coagulés afin d'induire la néoangiogenèse. B. Le jour de réimplantation, un réseau vasculaire bien développé est visible à cet endroit.

réduire les conséquences délétères de l'hypoxie et de faciliter le processus d'angiogenèse. Nos recherches portent sur la cinétique et la fonctionnalité des néovaisseaux formés au sein des greffons dans un modèle *in vivo* de greffe de fragments de tissu ovarien humain (18, 19). L'influence de différents sites de greffe sur la revascularisation et la survie du greffon est également étudiée dans ce modèle *in vivo*. Il n'existe, pour le moment, aucun consensus pour la greffe clinique en ce qui concerne le site de greffe idéal et la taille idéale des fragments à greffer, mais il faut souligner que toutes les greffes ayant mené à une grossesse ont été des greffes orthotopiques.

La greffe orthotopique peut être réalisée dans une fenêtre péritonéale (fig. 1) à proximité de la trompe (9) ou sur le ligament large (14). La première technique permet la restauration de la fertilité naturelle (20), la seconde exigeant le recours à la PMA.

La greffe orthotopique peut être réalisée par suture des fragments cryopréservés sur la médullaire ovarienne après « décortication » de l'ovaire atrophique (fig. 2). La vascularisation du stroma ovarien permet une revascularisation rapide du greffon. Tout en nous permettant de répondre aux inévitables détracteurs qui ont mis en doute la première grossesse en envisageant une ovulation à partir de l'ovaire atrophique, la décortication de l'ovaire permettait de confirmer en coupes sériées l'absence totale de follicules primordiaux (fig. 3), alors que le fragment cryopréservé et



Fig. 2 – Après « décortication » de l'ovaire, 5 larges fragments cryopréservés (8-10 x 4-5 mm) sont greffés par suture sur la médullaire ovarienne.

greffé mettait en évidence de nombreux follicules primordiaux (fig. 4).

Par rapport à la greffe hétérotopique, de nombreux arguments sont en faveur du site orthotopique :

- restauration de la fertilité naturelle ;
- greffe dans l'environnement naturel du tissu ovarien (cavité péritonéale et son mésothélium et liquide péritonéal « naturel »).

Au sein de notre institution hospitalière, six patientes ayant eu un traitement chimiothérapique agressif pour leurs ovaires ont bénéficié d'une ou deux réimplantations de tissu ovarien décongelé. Chez toutes ces patientes, la technique de greffe de fragments ovariens a permis la restauration de l'activité ovarienne après un délai de 4 à 5 mois et, dès lors, de cycles menstruels réguliers (20) (fig. 5).

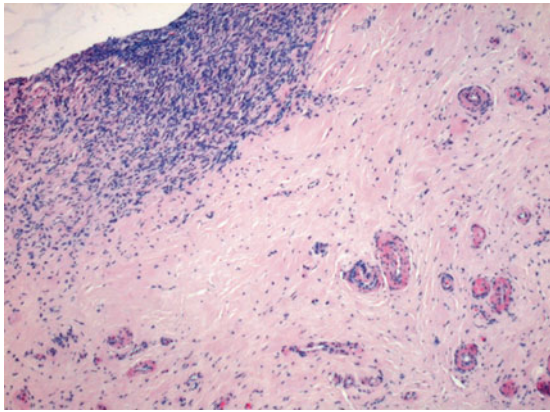


Fig. 3 – Absence de follicules primordiaux dans l'ovaire restant après chimiothérapie.

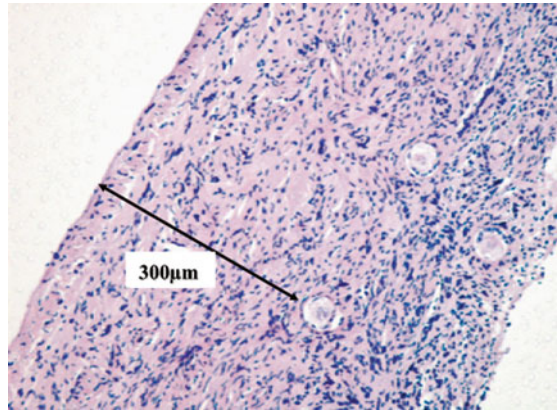


Fig. 4 – Présence de multiples follicules primordiaux dans un fragment ovarien prélevé avant chimiothérapie et cryopréservé.

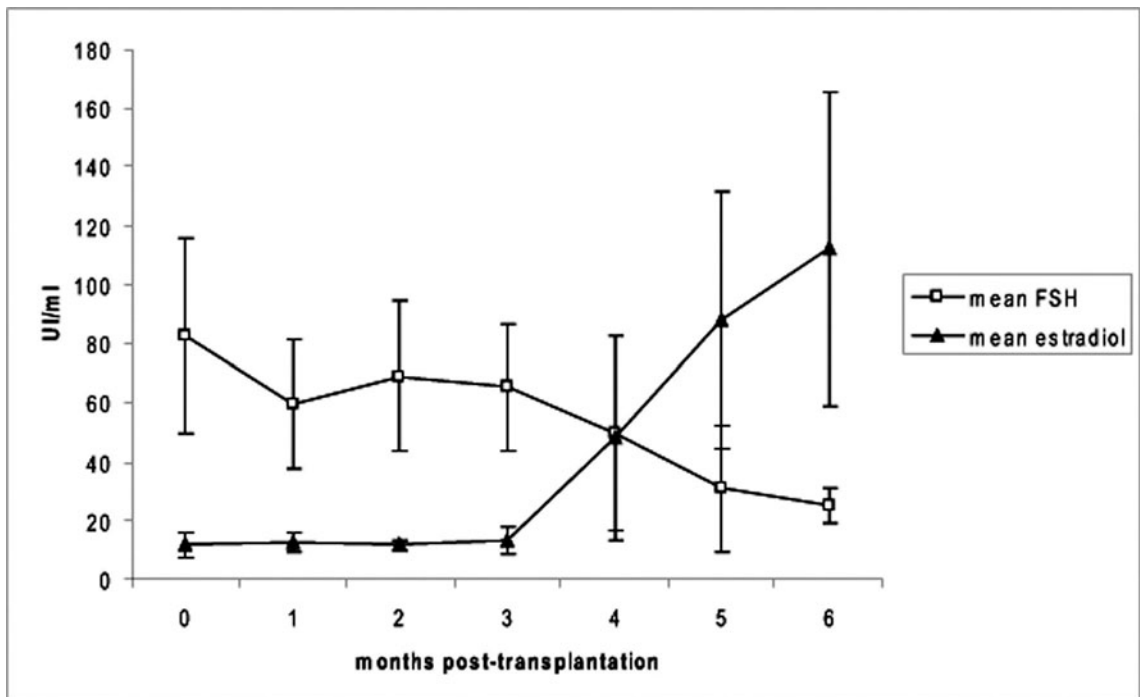


Fig. 5 – Restauration de l'activité ovarienne : environ 4 mois sont nécessaires pour observer des modifications significatives des taux sériques d'œstradiol (↑) et de FSH (↓). Cela correspond au délai nécessaire au développement de follicules antraux à partir des follicules primordiaux cryopréservés et greffés.

Cryopréservation et greffe d'ovaire entier avec pédicule vasculaire

La greffe de l'ovaire entier avec réanastomose permet d'éviter le problème de revascularisation du greffon. La greffe d'un ovaire cryopréservé avec son pédicule vasculaire a permis de rétablir la fertilité chez le rat et la brebis (21-23).

Le premier challenge, afin d'appliquer cette approche à l'ovaire humain, a consisté à mettre au point une technique de congélation adaptée à l'ovaire humain plus volumineux. Notre équipe a publié un protocole de congélation lente de l'ovaire humain

in toto impliquant une perfusion de cryoprotecteur dans l'artère ovarienne qui permet d'obtenir un bon taux de survie du stroma, des vaisseaux et des follicules (75 %) (24). Après cryopréservation, l'ultrastructure des différents compartiments cellulaires est préservée et aucun signe d'apoptose n'a été mis en évidence (pas de fragmentation d'ADN détectée par la technique de TUNEL et pas de caspase-3 active détectée par immunohistochimie) (25). L'intégrité du réseau vasculaire est maintenue, ce qui constitue un point particulièrement critique pour l'application de cette approche. L'optimisation des techniques chirurgicales de dissection, canula-

tion et perfusion de l'artère ovarienne a permis de cryopréserver plus de dix ovaires entiers (26).

La technique de prélèvement de l'ovaire entier a fait l'objet d'une publication originale par notre groupe (26), ainsi que la technique de cryopréservation de l'ovaire entier qui exige certains artifices, vu le volume de l'ovaire humain.

Nous préférons effectuer le prélèvement de l'ovaire gauche, estimant que la greffe de l'ovaire gauche à droite sera plus facile que l'inverse.

Certains points importants sont à noter (fig. 6) :

- la longueur des pédicules vasculaires doit être au minimum de 7 cm, requérant par là une dissection du ligament infundibulo-pelvien bien au-dessus de son croisement avec l'urètre ;
- la prise en charge immédiate (en salle d'opération) par une cathétérisation de l'artère ovarienne qui permettra d'éviter le possible caillotage au niveau des vaisseaux intraovariens en cas de délai important.

La greffe de follicules isolés : une nouvelle stratégie de greffe ovarienne ?

La greffe de follicules isolés présente plusieurs avantages par rapport à la greffe tissulaire :

- il n'y a pas de risque de transmission de cellules malignes dans le greffon (car le follicule primordial est une structure avasculaire protégée par sa membrane basale) ;
- la population folliculaire peut être caractérisée avant réimplantation ;
- il y a moins de problèmes liés à l'ischémie.

Cette approche a été appliquée avec succès dans un modèle expérimental de souris (27). Les protocoles d'isolement et de récupération folliculaires que nous avons mis au point préservent mieux l'intégrité des follicules humains (28) et permettent désormais d'envisager le développement de cette technique chez l'humain. Les follicules pourront être greffés au niveau du cortex ovarien de la patiente dont les cellules stromales pourraient servir de support à la croissance folliculaire.

Nous avons pu démontrer la survie et la croissance de follicules ovariens humains après isolement et xénogreffe à des souris nues (16). L'ultrastructure des follicules greffés à court terme est bien préservée et certains follicules ont débuté leur croissance folliculaire après une semaine de greffe. Après 4 mois de greffe, nous avons pu, grâce à une supplémentation en FSH, obtenir des follicules antraux. Ces résultats nous encouragent à poursuivre la recherche dans ce domaine. Le défi consiste à présenter à standardiser les techniques d'isolement folliculaire (fig. 7) et de greffe de follicules isolés et à les optimiser dans une optique d'application clinique.

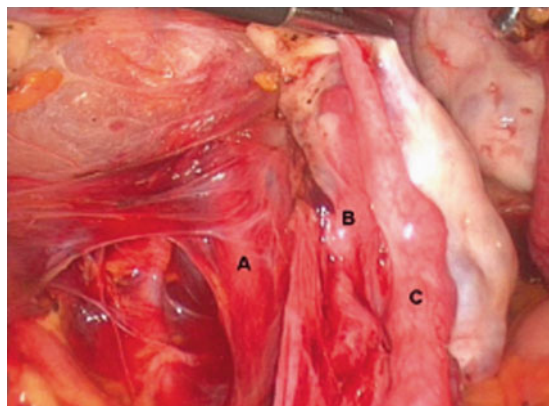


Fig. 6 – Le ligament large est disséqué au croisement entre le ligament infundibulo-pelvien et le ligament rond. A. Uretere ; B. Pédicule ovarien ; C. Trompe de Fallope.

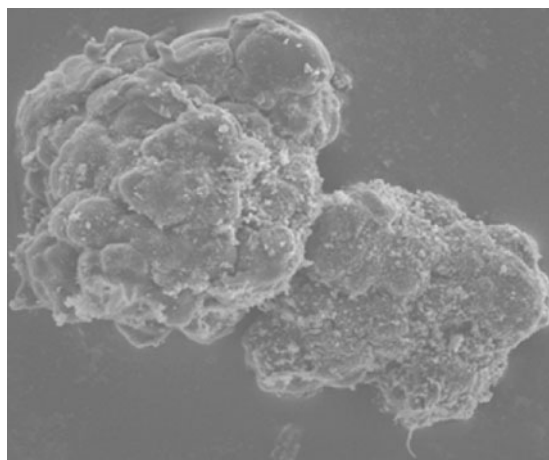


Fig. 7 – Follicules primordiaux isolés. Seule la couche unique de cellules granuleuses est visible. Il n'y a aucune cellule stromale avoisinante.

Conclusion

En conclusion, grâce aux progrès conjugués dans le domaine de l'oncologie et de la cryopréservation du tissu ovarien, non seulement l'espérance de vie des jeunes patientes devant subir une chimiothérapie a augmenté, mais également leur qualité de vie de par l'immense espoir de restauration de la fertilité que leur apporte la cryopréservation du tissu ovarien.

Références

1. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS (2005) Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 6: 209-18
2. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P *et al.* (2006) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 12: 519-35
3. Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. (2000) Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Current Op Obstet Gynecol* 12: 1-9

4. Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B *et al.* (2005) The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17: 333-38
5. Torrents E, Boiso I, Barri PN, Veiga A (2003) Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine. *Hum Reprod Update* 9: 471-81
6. Eppig JJ, O'Brien MJ (1996) Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207
7. Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Reviews* 17: 121-55
8. Oktay K, Buyuk E, Veeck L *et al.* (2004) Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 363: 837-40
9. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D *et al.* (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364: 1405-10
10. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T *et al.* (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353: 318-21
11. Demeestere I, Simon P, Emiliani S *et al.* (2007) Fertility preservation: Successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 12: 1437-42
12. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG *et al.* (2008) Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 23: 2266-72
13. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG (2008) Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *N Engl J Med* 359: 2617-8
14. Piver P, Amiot C, Agnani G *et al.* (2009) Two pregnancies obtained after a new technique of autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Hum. Reprod* 24: i15, O-035
15. Nisolle M, Godin PA, Casanas-Roux F *et al.* (2000) Histological and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 74: 122-9
16. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E *et al.* (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 134: 253-62
17. Baird, DT, Webb R, Campbell BK *et al.* (1999) Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinol* 140: 462-71
18. Van Eyck AS, Jordan B, Gallez B *et al.* (2009) Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertil Steril* 92: 374-81
19. Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O *et al.* (2010) Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertil Steril* 93: 1676-85
20. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck, AS *et al.* (2008) Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online* 16: 694-704
21. Wang X, Chen H, Yin H *et al.* (2002) Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 415: 385
22. Yin H, Wang X, Kim SS *et al.* (2003) Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischemia and genotype. *Hum Reprod* 18: 165-72
23. Bedaiwy A, Jeremias E, Gurunluoglu R *et al.* (2003) Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 79: 594-602
24. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A *et al.* (2004) Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 82: 1390-7
25. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM *et al.* (2007) Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril* 87: 1153-65
26. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM *et al.* (2007) Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. *Fertil Steril* 87: 971-5.
27. Carroll J, Gosden RG (1993) Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* 8: 1163-7
28. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A *et al.* (2006) Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod* 21: 413-20

C. Poirot

Aspects biologiques de la cryoconservation ovarienne

Introduction

L'amélioration de la survie après traitement anticancéreux des enfants, adolescentes et adultes jeunes, doit faire prendre en compte les effets à long terme de ces thérapeutiques et notamment ceux sur la fonction ovarienne. Depuis le milieu des années 1990, la question de la préservation de la fertilité féminine avant la mise en route d'un traitement potentiellement stérilisant est devenue incontournable. Ainsi, la congélation ovocytaire est de plus en plus proposée aux patientes devant subir de tels traitements. L'ovocyte peut être congelé soit au stade d'ovocyte mature, bloqué en métaphase II, soit au stade de vésicule germinative, notamment au sein du cortex ovarien.

Ainsi, la cryoconservation de cortex ovarien est de plus en plus réalisée et ce d'autant plus que les premières grossesses et naissances dans l'espèce humaine ont été rapportées après autogreffe. Cette technique présente plusieurs avantages. L'ovaire contient des centaines de follicules primordiaux de réserve, au sein desquels les ovocytes sont immatures. Ces ovocytes sont plus petits, moins actifs, moins différenciés que les ovocytes matures, comme en témoigne l'absence de zone pellucide et de granules corticaux et leur noyau est bloqué en fin de prophase de première division de méiose, ce qui leur confère une meilleure congélabilité par rapport aux ovocytes matures. Le cortex ovarien est prélevé lors d'une intervention chirurgicale, intervention qui peut s'organiser très rapidement et, en conséquence, ne retarde pas le traitement pour la maladie cancéreuse de la patiente. De plus, la congélation de cortex ovarien peut être faite quel que soit le jeune âge de la patiente (1).

Pour toutes ces raisons, la cryoconservation de cortex ovarien apparaît comme la technique de préservation de fertilité ayant le plus fort potentiel.

La maîtrise des techniques de congélation est essentielle pour donner toutes les chances aux

patientes ayant eu un cancer, de pouvoir concevoir un enfant, après guérison.

Historique de la cryoconservation de fragments d'ovaire chez l'animal

Il se déroule sur deux périodes :

- une période ancienne et pionnière qui se situe dans les années 1950 ;
- une période moderne qui commence au début des années 1990 avec les travaux de Carroll (2).

Dans les années 1950, la plupart des études sur la cryoconservation d'ovaire ont été faites chez les rongeurs.

La technique de congélation la plus utilisée a été la technique mise au point par Parkes (3, 4). Le cryoprotecteur utilisé était le glycérol, dont les qualités cryoprotectrices avaient été démontrées par Polge en 1949 pour la congélation des spermatozoïdes (5).

La descente en température s'effectuait lentement (1 °C par minute puis 2 °C par minute) jusqu'à -79 °C.

Les résultats obtenus avec cette technique de congélation avaient permis de montrer que la survie folliculaire dépendait de leur stade de maturation (seuls quelques follicules primordiaux survivaient), de leur localisation au sein du tissu ovarien (meilleure survie des follicules périphériques que des centraux), de l'âge des animaux prélevés (les follicules d'ovaires de jeunes résistaient mieux à la congélation que les fragments d'ovaires d'adultes) (6). Les ovocytes étaient plus sensibles à la congélation-décongélation que le tissu endocrinien de l'ovaire. Le délai moyen de réapparition de la fonction endocrine des fragments ovariens congelés-décongelés et greffés dépendait de la qualité de la congélation, du cryoprotecteur utilisé et de la durée de conservation à -79 °C (7).

En 1960, Parrott, avec cette technique, a obtenu pour la première fois chez la souris, des jeunes. Elle a noté, malgré tout, une diminution importante du nombre d'ovocytes viables après autopsie. Il s'agissait là des premières grossesses et naissances de jeunes après congélation d'ovocytes (8).

Paradoxalement, malgré ce résultat positif, ce fut la fin des recherches sur ce sujet jusqu'à une période plus récente.

C'est donc seulement en 1990 que l'on reparle de la congélation de tissu ovarien, avec les travaux de Carroll sur la congélation de follicules primaires de souris (2). Le protocole de descente en température utilisé par Carroll était très proche des protocoles utilisés pour la congélation embryonnaire, avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme cryoprotecteur. La descente en température débutait à la température de la glace et la première vitesse de descente en température a été de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute jusqu'à $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$, température de l'induction manuelle de la cristallisation (*seeding*). Ensuite, la descente thermique était très lente à la vitesse de $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis la descente était rapide ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jusqu'à $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le prélèvement était ensuite plongé dans l'azote liquide.

Avec cette technique, chez la souris, il a été montré qu'il était possible d'obtenir une bonne survie des ovocytes (80 %) et des cellules somatiques périovocytaires (65 %) (9). Des jeunes après congélation de follicules isolés, culture folliculaire, fécondation *in vitro* et transfert des embryons dans des souris pseudo-gestantes ou après greffe, ont été obtenus (2, 9).

L'utilisation de ce protocole de congélation, chez la brebis, a permis la naissance d'un agneau après autogreffe de fragments d'ovaire congelés et décongelés (10). Les travaux de Salle *et al.*, toujours chez la brebis, ont montré que d'autres protocoles de congélation pouvaient aboutir à des naissances (11). La vitesse de descente en température de ce protocole était, tout d'abord, de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec *seeding* semi-automatique à $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ suivie d'une conservation à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, dans l'azote liquide.

Cryoconservation de cortex ovarien chez l'humain

Les premiers travaux sur la cryoconservation de cortex ovarien humain ont été publiés, en 1996, par deux équipes différentes. Les différents protocoles de congélation testés par ces équipes ont été comparés à celui décrit par Carroll (2). Les premiers travaux publiés par l'équipe d'Hovatta (12) ont montré pour la première fois la faisabilité de la congélation de cortex ovarien humain. Ils

ont comparé l'efficacité de deux cryoprotecteurs (DMSO et l'association 1,2-propanediol (PROH)-sucrose). Le tissu ovarien de neuf patientes a été congelé en utilisant du DMSO (1,5 M) dilué dans de l'alpha MEM supplémenté avec 10 % de sérum humain. L'équilibration a été faite à la température de la glace pendant 15 minutes avant la descente en température. Les tubes contenant les fragments d'ovaire ont été congelés avec une descente de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute jusqu'à $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, température à laquelle a été fait manuellement le *seeding*. La descente en température a été ensuite de $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute jusqu'à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ et ensuite de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les tubes ont ensuite été placés dans l'azote liquide pour le stockage. Les fragments ovariens de dix patientes ont été congelés avec la combinaison PROH (1,5M)-sucrose (0,1M) comme cryoprotecteurs dilués dans de l'alpha MEM supplémenté avec 20 % de sérum humain. L'équilibration a été faite à température ambiante. La descente en température a débuté à $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. La première vitesse de descente en température a été aussi de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute mais jusqu'à $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Après le *seeding* fait à $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, la vitesse de descente en température a été de $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la descente rapide à la vitesse de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ jusqu'à $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les prélèvements ont été transférés et conservés dans l'azote liquide. Après décongélation et analyse histologique, il n'a pas été montré de différences, avant et après congélation-décongélation, quel que soit le protocole utilisé, aussi bien en termes de nombre de follicules observés qu'en termes de diamètre folliculaire et ovocytaire. Ils en ont conclu que le tissu ovarien humain pouvait être congelé et que l'association PROH-sucrose avait aussi de bonnes propriétés cryoprotectrices.

La même année, Newton *et al.* ont comparé l'effet de quatre cryoprotecteurs (DMSO, éthylène glycol (EG), PROH, glycérol) sur la survie du tissu ovarien humain après congélation (13). Le tissu ovarien utilisé provenait de huit patientes. Ces quatre cryoprotecteurs ont été utilisés de la même façon, selon le protocole décrit par Carroll (2), avec une température de *seeding* à $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'évaluation de la viabilité des greffons a été faite par l'étude du comportement des fragments ovariens après xélogreffe sous la capsule rénale de souris SCID. Les meilleurs taux de survie folliculaire ont été observés avec l'EG (84 %). Les moins bons ont été observés avec le glycérol (10 %). Les taux de survie folliculaire ont été de 74 % avec le DMSO et de 44 % avec le PROH.

Ces études ont montré que des protocoles, proches de celui qui avait permis chez la brebis, gros mammifère dont la constitution et l'organisation ovarienne sont proches de celle de la femme, d'obtenir un jeune après congélation-décongélation et

autogreffe de tissu ovarien, étaient transposables dans l'espèce humaine.

Il est donc apparu possible de proposer une cryoconservation de cortex ovarien à des patientes devant subir un traitement stérilisant. C'est donc dans le milieu des années 1990 que l'idée de préserver la fertilité des patientes ou de créer des banques d'ovocytes pour traiter l'infertilité en congelant du cortex ovarien (14, 15) apparaît dans la littérature. Il était devenu manifeste que la cryoconservation de cortex ovarien pouvait être utile pour les patientes devant subir un traitement fortement gonadotoxique.

Le premier cas décrit dans la littérature de cryoconservation de cortex ovarien pour une patiente le fut aussi en 1996 (16).

Il s'agissait d'une patiente de 23 ans souffrant d'un cancer endométrial et qui devait bénéficier d'une hystérectomie et d'une annexectomie bilatérale. Elle a demandé que son tissu ovarien soit congelé. Le cryoprotecteur utilisé a été un mélange de DMSO, PROH et glycérol et la descente en température s'est faite, manuellement, par paliers successifs ; 1 heure à 17 pouces au-dessus du niveau de l'azote liquide, puis 30 minutes à 6 pouces, 30 minutes à 3 pouces et ensuite les tubes ont été plongés dans l'azote liquide.

Dès 2000, la première tentative d'autogreffe a été réalisée pour une patiente ayant eu une congélation de cortex ovarien, à l'âge de 28 ans, motivée par des ménométrorragies incoercibles. Cette patiente avait déjà eu, à l'âge de 17 ans, une ovariectomie droite pour kyste dermoïde. Six mois après la congélation, la patiente a demandé la greffe de son tissu ovarien à cause des symptômes d'insuffisance ovarienne. Quinze semaines après la greffe, une stimulation de l'ovulation a été entreprise, aboutissant au développement d'un follicule et à une œstradiolémie à 93 pg/mL (17). Depuis, quelques dizaines de greffes de cortex ovariens ont été rapportées qui ont permis, à ce jour, la naissance de onze enfants bien portants.

Différentes étapes biologiques de la congélation de cortex ovarien

Transport du tissu ovarien du bloc opératoire au laboratoire

Le bloc opératoire étant très rarement à côté du laboratoire où vont se faire la congélation puis la conservation du tissu ovarien, l'ovaire, dès son prélèvement, doit être transporté dans les meilleures conditions vers son lieu de congélation. Le Leibovitz 15® est le milieu de transport

le plus utilisé. D'autres milieux ont été employés, comme le Brahma I® (CryoBioSystem) (18), l'IVF medium® (Medicult), un milieu de culture pour FIV (19) ou un milieu tamponné avec de l'Hepes comme l'HTF (20) ou une solution saline, par exemple de Hartmann (21).

Deux autres paramètres sont importants lors du transport : la température du milieu de transport et la durée du transport.

De nombreux auteurs ont utilisé le Leibovitz 15® à 4 °C, pour limiter les lésions dues à l'ischémie, cependant Gook *et al.* ont montré que le transport du tissu ovarien à 37 °C suivi d'une congélation avec du PROH comme cryoprotecteur n'était pas délétère (20).

En ce qui concerne la durée du transport, la majorité des auteurs préconisent une durée de transport la plus courte possible. Cependant, il a été montré qu'un temps de transport allant jusqu'à 4 heures permettait une bonne survie folliculaire (19). Ceci a été confirmé et validé lorsque cette même équipe a publié une série de cinq grossesses obtenues après autogreffe de cortex ovarien congelé-décongelé dont deux avec des fragments dont la congélation avait été précédée d'un transport d'une durée de 4-5 heures (22). Tout ceci indique qu'une durée de transport du cortex ovarien, dans de bonnes conditions, jusqu'à 5 heures, n'altère pas la qualité du tissu ovarien.

Préparation du tissu ovarien

Les cryoprotecteurs ayant un degré de pénétration limité dans les tissus et notamment dans le tissu ovarien, la présence de la médullaire ovarienne altère la survie des follicules (20). Isoler le cortex ovarien en retirant la médullaire est une étape importante pour réduire l'épaisseur du tissu ovarien et ainsi obtenir un taux de survie folliculaire optimum. Une épaisseur du cortex ovarien proche de 1 mm et une surface des fragments variant de 2 × 2 mm à 5 × 5 mm sont les dimensions les plus souvent réalisées. Néanmoins, la taille de fragments semble être un paramètre important comme le montre une étude qui a comparé la survie folliculaire au sein de fragments de cortex ovarien de vache de 10 mm de longueur, de 3 mm d'épaisseur et d'une largeur soit de 2 mm, soit de 4 mm. La solution de congélation était constituée de PROH à 1,5 M dans du TCM199 supplémenté avec 0,1 M de sucrose et 0,4 % de sérum albumine bovine. Le temps d'équilibration a été de 20 min à 20 °C et la descente en température a été de 1 °C/min jusqu'à -7 °C, température du *seeding*, puis de 0,3 °C/min jusqu'à -30 °C avant d'être plongé dans l'azote liquide. Après décongélation, une analyse histologique a été effectuée et a montré une survie folliculaire significativement

moindre ($p < 0,001$) au sein des fragments de 4 mm de large (34 %) par rapport à la survie folliculaire des fragments de 2 mm de large (56 %) (23).

Phase d'équilibration entre le tissu ovarien et les cryoprotecteurs

La pénétration des agents cryoprotecteurs dans les cellules isolées est relativement rapide, mais leur diffusion dans un tissu avec de nombreux types cellulaires est plus lente, ce qui signifie que le temps de contact ou d'équilibration avec les cryoprotecteurs doit être prolongée afin d'obtenir des concentrations en cryoprotecteurs adéquates au centre du tissu et, ce, sans exposer les cellules périphériques à un risque de toxicité. En conséquence, il est important de trouver un équilibre entre les effets toxiques d'une surexposition aux cryoprotecteurs avant la congélation et le temps d'exposition nécessaire à leur bonne diffusion dans l'entièreté du tissu à congeler.

Pour la cryoconservation d'ovaire, les quatre cryoprotecteurs étudiés ont été le PROH, le DMSO, l'éthylène glycol et le glycérol, le plus largement utilisé étant le DMSO. La survie des follicules primordiaux humains est la même qu'il ait été utilisé du DMSO ou du PROH (12). Une autre équipe a confirmé ce résultat et a montré, en plus, qu'avec l'éthylène glycol, les résultats étaient identiques ; en revanche, la survie a été significativement diminuée lorsque le glycérol était utilisé comme cryoprotecteur ($p < 0,0001$) (13). L'addition du sucrose (cryoprotecteur non pénétrant) dans les solutions de congélation n'améliore pas la survie folliculaire (24). Malgré tout, il est souvent utilisé.

Le taux de pénétration des cryoprotecteurs est variable en fonction de la température au moment de l'équilibration. Une étude comparant le taux de pénétration de quatre cryoprotecteurs, soit à 4 °C soit à 37 °C, au sein du cortex ovarien humain, a suggéré que la meilleure méthode pour préparer le cortex ovarien à la congélation était un temps d'équilibration entre le tissu ovarien et la solution de congélation de 30 minutes à 4 °C avec une solution de 1,5 M de DMSO ou d'éthylène glycol (24). En conséquence, lorsque le DMSO était le cryoprotecteur, la durée de la phase d'équilibration a été généralement de 30 minutes (13, 25). Dans la littérature, la durée de cette phase est d'une durée variant de 15 à 90 minutes (12, 20). Gook *et al.* ont observé 91 % d'ovocytes intacts dans du tissu ovarien congelé-décongelé après une phase d'équilibration de 90 minutes dans une solution de PROH-sucrose à 37 °C. Pour des temps plus courts (15, 30 et 60 minutes), les taux de survie étaient plus bas (20).

Au bout de ce temps d'équilibration, les tubes ont été placés dans un congélateur programmable.

Protocoles de descente en température

La plupart des auteurs ont utilisé un appareil de descente en température programmable de type Planer. Lorsque le cryoprotecteur était de l'éthylène glycol ou du DMSO, le programme débutait à + 4 °C (13, 25). Si le cryoprotecteur était le PROH, la descente en température débutait à température ambiante (12). La vitesse de descente en température a été le plus souvent de 2 °C/min jusqu'à la température du *seeding*, température variant de -6 °C à -9 °C. Après le *seeding*, la vitesse de descente en température a été majoritairement de -0,3 °C jusqu'à une température comprise entre -30 °C et -50 °C. La vitesse finale a été de -5 °C à -50 °C par minute jusqu'à -140 °C ou -150 °C. Le cortex a été ensuite plongé et conservé dans l'azote liquide.

Exemples de protocoles de congélation de tissu ovarien humain

Le tableau I résume les différents paramètres des protocoles de congélation de tissu ovarien utilisés par les auteurs ayant obtenu la naissance d'un enfant après une autogreffe de cortex ovarien préalablement congelé.

Ces protocoles permettent donc une bonne survie du cortex ovarien.

Protocoles de décongélation

Les techniques de décongélation utilisées dans les publications sont variables. Hovatta *et al.* ont décrit un protocole de décongélation différent en fonction du cryoprotecteur (12). Lorsque le cryoprotecteur était le DMSO, ils ont décongelé les tubes contenant les fragments ovariens à température ambiante pendant 2 minutes puis les ont immergés dans un bain-marie à + 37 °C jusqu'à décongélation complète. Les fragments ont été directement placés dans un milieu de culture et lavés trois fois avec du milieu neuf avant utilisation.

En cas d'utilisation du PROH, les tubes ont été retirés de l'azote liquide, gardés à température ambiante pendant 30 secondes et immergés dans un bain-marie à + 30 °C jusqu'à décongélation complète de la solution de congélation. Les fragments ont été ensuite transférés dans des solutions de concentrations décroissantes en PROH, chaque étape durant 5 minutes et les fragments ont été finalement transférés dans du milieu de culture (12).

La technique de Newton *et al.* a consisté, quel que soit le type de cryoprotecteur utilisé, à décongeler en agitant, dans de l'eau à température ambiante, les tubes jusqu'à décongélation, puis les fragments

Tableau I – Différents paramètres des protocoles de congélation du cortex ovarien des équipes ayant obtenu une naissance après autogreffe.

Équipes	Milieu de transport	Temps de transport	Température de transport	Taille fragments épaisseur	Cryo-protecteur	Équilibration	Appareil	Temp. de début	*1 ^{re} vitesse	Temp. seeding	Type de seeding	*2 ^e vitesse et temp. finale	*3 ^e vitesse et temp. finale
Donnez <i>et al.</i> (26)	L15 avec Glutamax®	« immediately »	DND	cubes de 2 × 2 mm 1 bande de 12 × 4 mm	1,5 mol/L DMSO	DND	Kryo 10, Series III, Planer	0° C	2° C/min	-8° C	manuel	0,3° C/min -40° C	30° C/min -150° C
Meirow <i>et al.</i> (27)	Milieu de flushing ovocytaire	Bloc adjacent au laboratoire	Température de la glace	5 × 5 mm et 1-2 mm d'épaisseur	1,5 mol/L DMSO 0,1 mol/L sucrose	min	DND	DND	1° C/min	-9° C	manuel	0,3° C/min -36° C	5° C/min -140° C
Andersen <i>et al.</i> (28)	Solution isotonique	« immediately »	DND	de 5 × 5 mm et 1-2 mm d'épaisseur	1,5 mol/L EG 0,1 mol/L sucrose	min à 4° C	Planer K10	Temp. de la glace	2° C/min	-9° C	manuel	0,3° C/min -40° C	10° C/min -140° C
Demeestere <i>et al.</i> (29)	L15	Transport rapide	DND	de 5 × 5 × 2 mm	0,1 mol/L sucrose 1,5 mol/L DMSO	min à 4° C	Planer K 360-3,3	4° C	2° C/min	-7° C	manuel	0,3° C/min -40° C	10° C/min -140° C
Silber <i>et al.</i> (30)	L15	DND	Température de la glace	Épaisseur environ 1 mm 1/3 ovaire	1,5 M/L PROH 0,2 M sucrose	Protocoles utilisés : Newton 1996 (13) et Gook 1999 (20)							

DND : donnée non documentée ; L15 : Leibovitz 15 ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; EG : éthylène glycol ; PROH : 1,2-propanediol ; temp. : température

*La descente en température se caractérise par trois phases de descente en température différentes : la première phase est celle se situant entre le début de la descente et le *seeding*, la deuxième phase est située entre le *seeding* et le début de la descente rapide en température et la troisième phase est celle située entre la fin de la descente lente en température et la fin de la congélation.

d’ovaire ont été rincés dans plusieurs bains de solution saline et de Leibovitz 15® (13).
Le tableau II récapitule les protocoles de décongélation utilisés par les auteurs ayant obtenu une naissance après congélation-décongélation et autogreffe de cortex ovarien. De la même façon que pour les techniques de congélation, on peut faire l’hypothèse que ces différents protocoles ne sont pas délétères pour la survie du tissu ovarien.

Principaux axes de recherche

Vitrification

Il a été montré, chez la souris, que la vitrification d’ovaire ou de follicules préantraux permettait d’obtenir des taux de survie importants des structures folliculaires et la naissance de jeunes après croissance folliculaire *in vitro* (31).
Bien que la vitrification soit une technique pratique et rapide, il est difficile de l’utiliser, pour le moment, en clinique humaine pour congeler du cortex ovarien. En effet, les résultats de la littérature sont encore peu nombreux et contradictoires. Dès 1995, Zhang a vitrifié des ovaires fœtaux humains. Il a évalué la viabilité des fragments d’ovaire après culture *in vitro* montrant que la congélation ultrarapide était, elle aussi, efficace (32). Gook *et al.* ont montré que la vitrification aboutissait à une survie moindre des ovocytes et à une plus grande proportion d’ovocytes vacuolés, qu’après congélation lente (20).
En 2002, une étude de la survie cellulaire, après vitrification de tissu ovarien humain a montré de meilleurs résultats lors de l’utilisation uniquement

de cryoprotecteurs pénétrants (glycérol et éthylène glycol) qu’avec un mélange de cryoprotecteurs pénétrants (DMSO, propylène glycol et glycérol) et de cryoprotecteurs non pénétrants (sucrose, tréhalose) (33). La même équipe, en analysant l’apoptose et le niveau des dérivés actifs de l’oxygène après vitrification et réchauffement de fragments ovariens humains, n’a pas mis en évidence de différences qu’ils aient utilisé une solution de vitrification composée d’éthylène glycol, de sucrose et du jaune d’œuf ou une solution composée d’éthylène glycol, de Ficoll-70 et de sucrose. Ils en ont conclu que le tissu ovarien pouvait être vitrifié (34). De même, en comparant la nécrose au sein du tissu ovarien humain après congélation lente ou vitrification, ils n’ont montré aucune différence (35), alors qu’il a été rapporté d’importants dommages après vitrification par une autre équipe (36). Une autre étude n’a pas mis en évidence de différence dans la proportion de follicules primordiaux intacts après congélation lente (72,6 %) et après vitrification (80,3 %). En revanche, elle a montré une différence significative avec le témoin (cortex ovarien non congelé) (97,6 %) ($p < 0,001$) (37). Une meilleure survie du stroma ovarien après vitrification qu’après congélation lente ($p < 0,001$) a été montrée (38). Une étude très récente a comparé la congélation lente et la vitrification en analysant la qualité folliculaire après décongélation et mise en culture, par le biais de dosages hormonaux dans le milieu de culture et en évaluant l’expression du gène de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), gène domestique qui joue un rôle important dans la glycolyse et dans de nombreux autres métabolismes. Malgré l’absence de différence morphologique des follicules, l’expression du gène de la GAPDH après vitrification était diminuée de façon très importante par rapport à son expression

Tableau II – Protocoles de décongélation du cortex ovarien utilisés par les équipes ayant obtenu des naissances après autogreffe.

Équipes	Cryoprotecteur	Milieu de base	Temps de décongélation	Étapes de décongélation
Donnez <i>et al.</i> (26)	DMSO	L15	2 min à température ambiante et 2 min à 37° C	3 lavages dans du L15
Meirow <i>et al.</i> (27)	DMSO	Milieu de <i>flushing</i> ovocytaire et 15 % de substitut de sérum	30 secondes à température ambiante et 2 min à 37° C	4 lavages, de 5 min, dans des solutions de concentrations en CPT décroissantes (1,5, 1, 0,5, 0 mol/L)
Andersen <i>et al.</i> (28)	EG	Tampon Phosphate	Dans eau à 37° C	EG à 0,75mol/L + sucrose 0,25 mol/L : 10 min PBS + sucrose 0,25mol/L : 10 min PBS : 10 min
Demeestere <i>et al.</i> (29)	DMSO	L15	2 min à température ambiante et 2 min à 37° C	4 lavages, de 5 min, dans des solutions de concentrations en CPT décroissantes (1,5, 1, 0,5, 0 mol/L)
Silber <i>et al.</i> (30)	DND	DND	DND	DND

DND : donnée non documentée.
DMSO : diméthylsulfoxyde ; EG : éthylène glycol ; L15 : Leibovitz 15 ; CPT : cryoprotecteur.

après congélation lente. Les auteurs ont conclu que la congélation lente était préférable à la vitrification, la congélation lente permettant de conserver un plus grand potentiel au développement (39).

Pour améliorer les résultats de la vitrification, la recherche d'un support adapté est aussi une préoccupation. Ainsi, l'utilisation d'aiguilles d'acupuncture permettant d'embrocher les fragments ovariens a permis d'améliorer la manipulation des fragments et leur vitrification en maximisant la vitesse de descente en température et en réduisant la toxicité des solutions de vitrification. Avec cette technique, le pourcentage de follicules intacts après vitrification (83,16 %) n'a pas présenté de différence avec celui de follicules intacts après congélation lente (82,93 %), mais il existait une différence significative après congélation (quelle que soit la technique de congélation) avec le tissu frais (90,70 %) ($p < 0,001$) (40).

Congélation de l'ovaire entier

À cause de la perte folliculaire, liée à l'ischémie au moment de la revascularisation des fragments de cortex ovarien lors de l'autogreffe, la congélation de l'ovaire entier apparaît comme une solution pour limiter ce phénomène.

Les recherches se font surtout chez la brebis bien que l'ovaire soit plus petit que celui de la femme et que l'anatomie du pédicule vasculaire soit différente, l'ovaire de brebis a la même structure histologique que l'ovaire humain et notamment un stroma fibreux et une forte densité de follicules primordiaux. La technique consiste en une perfusion des vaisseaux ovariens avec la solution de congélation et l'ovaire est ensuite placé dans un tube contenant la même solution. Cette technique a fait la preuve de son efficacité pour la première fois en 2004. La transplantation d'un ovaire entier congelé avec du DMSO comme cryoprotecteur a permis une revascularisation par réanastomose microchirurgicale chez cinq brebis sur huit (62,5 %). Trois d'entre elles ont récupéré une cyclicité normale attestée par des dosages de progestérone (41).

Les ovaires entiers peuvent être soit congelés avec un protocole de descente lente en température (42), soit par vitrification (43). Les cryoprotecteurs étudiés ont été le DMSO, le PROH (42, 44) et, pour la vitrification une solution constituée d'un mélange de DMSO, PROH et de formamide (43). Une survie folliculaire identique entre les ovaires frais et les ovaires entiers congelés a été décrite quel que soit le mode de congélation (42, 43). En revanche, après une transplantation, il a été noté, après 18-19 mois, une diminution de la survie folliculaire quand l'ovaire avait été congelé

par congélation lente, (45), voire, 6 mois après la transplantation, une absence totale de survie folliculaire lorsque l'ovaire avait été vitrifié (46).

Une restauration de la fonction ovarienne de plus de 36 mois, a été décrite (42). À partir d'ovaire entier congelé, des ovocytes ont pu être obtenus (47) malgré une faible efficacité de la procédure (25 % d'ovaires fonctionnels après vitrification et autotransplantation) et Imhof *et al.* ont obtenu une naissance (45).

Dans l'analyse des résultats, il est difficile de faire la part entre les lésions liées à la congélation et celles liées aux problèmes de revascularisation. Deux études récentes, toujours chez la brebis, montrent que la densité folliculaire est diminuée aussi bien dans les ovaires transplantés sans congélation préalable que dans les ovaires, préalablement congelés (46, 48), suggérant un problème de perfusion des ovaires.

De très rares publications rapportent une congélation d'ovaire entier dans l'espèce humaine. Il a été montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre la viabilité folliculaire quand l'ovaire était congelé entier ou en fragments et aussi avec le groupe contrôle (49). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Martinez-Madrid ne montrant pas de différence morphologique, après étude en microscopie électronique, qu'il s'agisse d'ovaires frais, congelés décongelés entiers ou seulement exposés au cryoprotecteur. Dans ces trois mêmes groupes, il n'y avait pas non plus de différence du niveau d'apoptose déterminé par la méthode TUNEL (50).

Conclusions

La congélation de tissu ovarien semble être une approche optimale afin de préserver la fonction ovarienne, car elle est applicable à toutes les patientes de moins de 35 ans et le cortex ovarien contient un grand nombre d'ovocytes. Depuis 2000, l'obtention de grossesses et de naissances après autogreffe prouve que cette technique est efficace pour restaurer la fertilité des patientes ayant subi un traitement fortement gonadotoxique. Il est donc important de proposer cette technique aux patientes devant bénéficier de tels traitements.

À ce jour, la congélation lente reste le protocole de référence pour la congélation du tissu ovarien humain.

La vitrification du tissu ovarien humain a besoin d'être améliorée avant une utilisation dans le cadre du soin.

La recherche et le développement de techniques de congélation de l'ovaire entier, ainsi que de techniques chirurgicales pour l'autotransplantation d'un ovaire entier avec son pédicule vasculaire, doivent être encouragés.

Références

- Poirot CJ, Martelli H, Genestie C *et al.* (2007) Feasibility of ovarian tissue cryopreservation for prepubertal females with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 49: 74-8
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ *et al.* (1990) Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil* 90: 321-7
- Parkes AS, Smith AU (1953) Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140: 455-70
- Parkes AS (1953) Conservation of gonadal tissue for transplantation. *Acta Physiol Lat Am* 3: 158-61
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666
- Deanesly R (1954) Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 11: 197-200
- Parkes AS (1958) Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J Endocrinol* 17: 337-43
- Parrott D (1960) The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1: 230-41
- Carroll J, Gosden RG (1993) Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* 8: 1163-7
- Gosden RG, Baird D, Wade J, Webb R (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod* 9: 597-603
- Salle B, Demirci B, Franck M *et al.* (2002) Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemiovaries into ewes. *Fertil Steril* 77: 403-8
- Hovatta O, Silye R, Krausz T *et al.* (1996) cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 11: 1268-72
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A *et al.* (1996) Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 11: 1487-91
- Aubard Y, Teissier MP, Baudet JH (1994) Cryopreservation of the ovary and ovarian tissue. *Rev Fr Gynecol Obstet* 89: 192-7
- Carroll J (1996) Development of oocyte banks and banks and systems for in-vitro development of oocytes: future directions for the treatment of infertility. *Hum Reprod* 11: 159-68
- Bahadur G, Steele SJ (1996) Case report: ovarian tissue cryopreservation for patients. *Hum Reprod* 11: 2215-6
- Oktay K, Karlikaya G (2000) Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 342: 1919
- Poirot C, Brugières L, Genestie C, Martelli H (2005) Ovarian tissue cryopreservation for prepubertal girls: indications and feasibility. *Gynecol Obstet Fertil* 33: 799-803
- Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG *et al.* (2003) Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod* 18: 2654-9
- Gook D, Edgar DH, Stern C (1999) Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 14: 2061-8
- Radford JA, Lieberman BA, Brison ARB *et al.* (2001) Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *The Lancet* 357: 1172-5
- Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG *et al.* (2008) Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 23: 2266-72
- Ferreira M, Bos-Mikich A, Frantz N *et al.* (2008) The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 10: 1-4
- Newton H, Fisher J, Arnold JRP *et al.* (1998) permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 13: 376-80
- Tryde Schmidt KL, Andersen CY, Starup J *et al.* (2004) Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer: follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 8: 448-453
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D *et al.* (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* 364:1405-10
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T *et al.* (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353: 318-21
- Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG *et al.* (2008) Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 23: 2266-72
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S *et al.* (2007) Fertility Preservation: successful Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *The Oncologist* 12: 1437-42
- Silber SJ, DeRosa M, Pineda J *et al.* (2008) A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 23: 1534-7
- dela Pena EC, Takahashi Y, Katagiri S *et al.* (2002) Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction* 123: 593-600
- Zhang J, Liu J, Xu KP *et al.* (1995) Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J Assist Reprod Genet* 12: 361-8
- Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G *et al.* (2002) Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: negative effect of disaccharides in vitrification solution. *Cryo Letters* 23: 333-44
- Rahimi G, Isachenko E, Sauer H *et al.* (2003) Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 15: 434-9
- Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V *et al.* (2004) Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online* 9: 187-93
- Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP *et al.* (2006) Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 85: 1150-6
- Li YB, Zhou CQ, Yang GF *et al.* (2007) Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J* 120: 110-4
- Keros V, Xella S, Hultenby K *et al.* (2009) Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 24: 1670-83
- Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E *et al.* (2009) Human ovarian tissue cryopreservation versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* 138: 319-27
- Wang Y, Xiao Z, Li L *et al.* (2008) Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod* 23: 2256-65
- Revel A, Elami A, Bor A *et al.* (2004) Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril* 82: 1714-5

42. Arav A, Revel A, Nathan Y *et al.* (2005) Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod* 20: 3554-9
43. Courbiere B, Massardier J, Salle B *et al.* (2005) Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* 84: 1065-71
44. Wallin A, Ghahremani M, Dahm-Kähler P, Brännström M (2009) Viability and function of the cryopreserved whole ovary: in vitro studies in the sheep. *Hum Reprod* 24: 1684-94
45. Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M *et al.* (2006) Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril* 85: 1208-15
46. Courbiere B, Caquant L, Mazoyer C *et al.* (2009) Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril* 91: 2697-706
47. Grazul-Bilska AT, Banerjee J, Yazici I *et al.* (2008) Morphology and function of cryopreserved whole ovine ovaries after heterotopic autotransplantation. *Reprod Biol Endocrinol* 11: 2-15
48. Onions VJ, Weeb R, McNeilly AS, Campbell BK (2009) Ovarian endocrine profile and long-term vascular patency following heterotopic autotransplantation of cryopreserved whole ovine ovaries. *Hum Reprod* 24: 2845-55
49. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T (2006) Cryopreservation of intact human ovary and its vascular pedicle. *Hum Reprod* 21: 3258-69
50. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM *et al.* (2007) Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril* 87: 1153-65

P. Vanderzwalmen, F. Ectors,
Y. Prapas, M. Zech,
D. Jareño, B. Lejeune,
S. Vanderzwalmen,
B. Wirleitner, N. Zech
et L. Grobet

Cryopréservation d'ovocytes et d'embryons par congélation lente ou vitrification dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation

Préambule

La cryopréservation est un procédé permettant de garder les fonctions cellulaires ou tissulaires intactes en réduisant la température en dessous de celle à laquelle se déroulent normalement les réactions biochimiques.

Depuis quelques décennies, l'assistance médicale à la procréation (AMP) tente de venir en aide aux couples présentant des problèmes d'infertilité. La cryoconservation s'est rapidement avérée comme étant une étape incontournable dans un programme d'AMP. Dans cette optique, la nécessité de conserver à long terme par cryopréservation des gamètes, des tissus reproducteurs ou des embryons est devenue impérative.

rare de récolter de 10 à 20 ovocytes sur un seul cycle. Grâce aux améliorations des systèmes de culture et une meilleure compréhension des besoins physiologiques de la fécondation et du développement du jeune embryon, la proportion des embryons viables a augmenté significativement ces dernières années. Par ailleurs, l'élaboration de normes limitant le nombre d'embryons transférés pour réduire les risques liés aux grossesses multiples, a systématisé le recours à la cryopréservation, permettant l'étalement des transferts sur plusieurs cycles. Tout comme pour l'ovocyte, la cryopréservation des embryons est aussi envisagée pour pallier certains problèmes d'ordre éthiques.

Intérêt de la cryopréservation des ovocytes et embryons

La cryopréservation d'ovocytes présente un intérêt médical incontestable dans le cadre de la préservation de la fertilité après traitement chimiothérapique ou radiothérapique. Elle peut encore être envisagée, lors d'un traitement d'AMP, pour faire face à une hyperstimulation qui contre-indique un remplacement d'embryons ou lors d'un échec de recueil de spermatozoïdes. La cryopréservation d'ovocytes peut aussi être une alternative pour pallier certains problèmes d'ordre éthique, légal ou réglementaire inhérents à la cryopréservation d'embryons surnuméraires. Un regain d'intérêt pour cette technique réside dans la constitution de banques d'ovocytes cryopréservés pour faciliter le processus de don anonyme et également pour de nombreuses femmes désireuses de préserver leur fertilité pour une procréation retardée.

Contrairement à la récolte de sperme, le prélèvement d'ovocytes, tant chez une future mère que chez une donneuse, n'est pas un acte médical anodin. Pour éviter les prélèvements répétés et ainsi diminuer les risques inhérents, une stimulation hormonale adéquate permet d'obtenir la maturation simultanée de plusieurs follicules. Il n'est pas

Principes de base

Cristaux de glace intracellulaire : à éviter !

Après une étape initiale d'exposition aux cryoprotecteurs, la cryoconservation du matériel biologique nécessite un important refroidissement ; de la température ambiante à -196°C . Il est capital que tant les milieux de conservation que les paliers de refroidissement préservent au maximum les structures cellulaires, membranaires et intracytoplasmiques.

La résistance des ovocytes et embryons au cours d'un processus de cryopréservation dépend de plusieurs facteurs qui peuvent exercer un effet nuisible sur les organites, tels que : le choc thermique, une déshydratation trop prononcée (effet de solution et choc osmotique) et la cristallisation de l'eau intracellulaire (effet mécanique).

La formation de cristaux de glace dans le compartiment intracellulaire est incompatible avec la survie cellulaire et est considérée comme la première cause de mortalité cellulaire. En effet, lors d'un refroidissement trop rapide ou si la cellule n'est pas suffisamment cryoprotégée (déshydratation non optimale), l'eau va alors pouvoir se solidifier à l'intérieur de la cellule sous forme de petits cristaux relativement instables que sont les foyers de

nucléation. Ceux-ci sont parfaitement inoffensifs jusqu'au moment du réchauffement, où ils vont se transformer brutalement en cristaux de plus grandes tailles nuisibles pour la cellule.

La survie des ovocytes ou embryons étant dépendante de la présence de glace intracellulaire présente dans les cellules au moment où elles seront plongées dans l'azote liquide, le contrôle de la formation de cristaux de glace au cours du refroidissement sera un facteur clé qui aura une influence sur la survie des ovocytes ou des embryons après refroidissement et réchauffement.

Objectif commun aux méthodes de cryopréservation : obtention d'un état intracellulaire vitreux

Plusieurs possibilités peuvent être envisagées en vue de réduire la probabilité d'apparition de foyers de nucléation précurseurs de formation de cristaux intracellulaires.

Pour ce faire, un objectif commun aux différentes méthodes de cryoconservation consiste à amener la fraction liquide intracellulaire dans les conditions de solidification où le mouvement interne des molécules sera figé dans l'état désordonné typique de la fraction liquide. Il faut donc réunir toutes les conditions nécessaires empêchant un arrangement moléculaire ordonné, comme observé lors de

la formation d'un cristal de glace. Cet état appelé « amorphe » ou « vitreux » est obtenu lorsque la solution est amenée à une température inférieure à la température de transition vitreuse (T_g) (fig. 1a). La formation d'un état intracellulaire vitreux peut être envisagée selon deux approches. La première possibilité consiste à refroidir lentement ($< 1^\circ \text{C/min}$) les cellules et à induire la formation de cristaux de glace dans le compartiment extracellulaire. L'augmentation, au cours du refroidissement, de la quantité d'eau cristallisée extracellulaire va de paire avec une augmentation de la concentration extracellulaire en solutés. Ceci a pour conséquence, en vue de respecter l'équilibre osmotique, de déshydrater l'embryon. Il en résulte une augmentation des concentrations intracellulaires en solutés. Une déshydratation suffisante et optimale, c'est-à-dire sans « effet de solution excessif » ou « salage », empêchera une cristallisation intracellulaire à cause d'une concentration appropriée en solutés, concentration qui permettra la vitrification de la solution lors de son immersion dans l'azote liquide.

La deuxième option consiste à refroidir très brutalement les cellules pour en obtenir la vitrification. Ce n'est que dans certaines conditions de vitesses de refroidissement/réchauffement et de concentration en solutés extra- et intracellulaires qu'une absence de cristaux de glace dans les compartiments intra- et extracellulaires sera possible, la

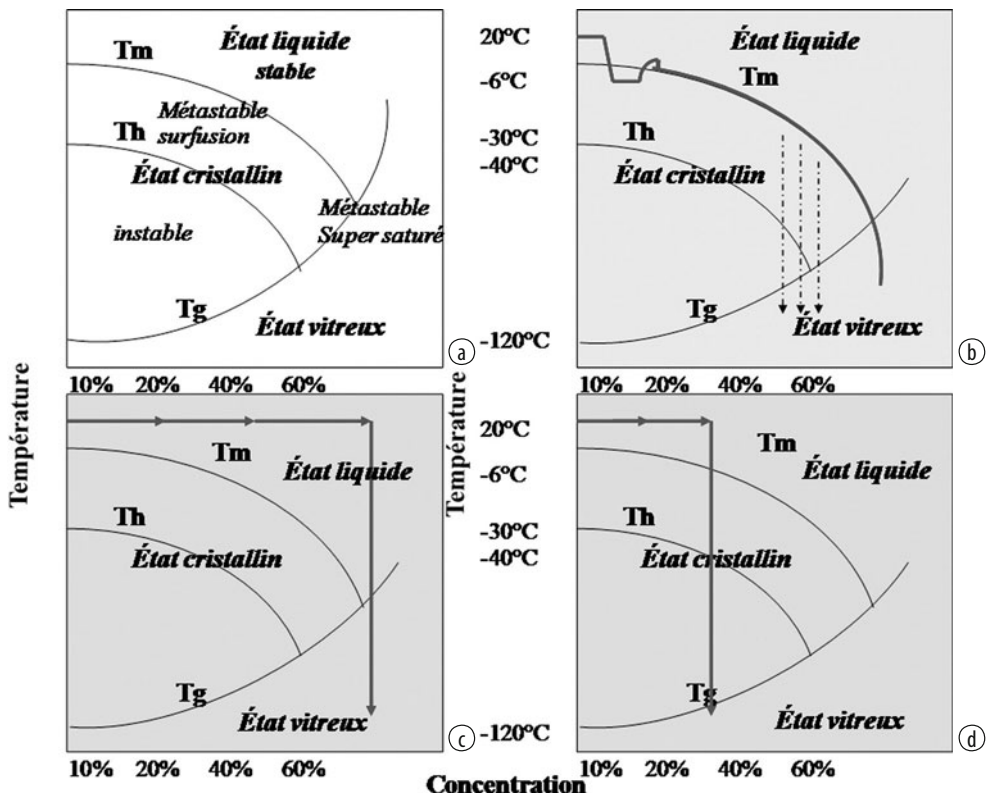


Fig. 1 – La solution est amenée à une température inférieure à la température de transition vitreuse.

phase aqueuse de tout l'échantillon passant à l'état « vitreux ».

Quelle que soit l'option choisie, les ovocytes ou embryons ne peuvent pas survivre à des températures très basses sans la présence de cryoprotecteurs hydrosolubles. Leurs caractéristiques communes consistent à abaisser le point de congélation des solutions et de limiter la vitesse de croissance des cristaux de glace. Leurs actions cryoprotectrices reposent principalement sur leur avidité à former des ponts hydrogènes avec les molécules d'eau. Ceci a pour conséquence de ralentir les mouvements de ces molécules et d'augmenter la viscosité.

Certains d'entre eux, de faibles poids moléculaires, sont capables de traverser la membrane cellulaire. Hormis le DMSO, les cryoprotecteurs pénétrants sont tous des alcools constitués de 1 à 4 carbones et avec de 1 à 3 fonctions hydroxyles. Tous les cryoprotecteurs pénétrants agissent par le biais de ponts hydrogènes qui interfèrent avec la formation de cristaux de glace. Ils empêchent ou retardent la réorganisation cristalline des molécules d'eau liée au refroidissement.

D'autres cryoprotecteurs strictement non pénétrants sont de poids moléculaire faible (saccharose = « sucrose »-tréhalose) ou élevé (Ficoll-polyvinyl glycol).

Méthodes de cryoconservation

Deux méthodes ont été développées pour favoriser l'obtention d'un état vitrifiant intracellulaire : la congélation lente et la vitrification.

Congélation lente

Les premières conservations d'embryons par le froid datent des années 1970 chez la souris (1). C'est respectivement en 1983 et 1986 que la première naissance fut annoncée respectivement par Zeilmaker (2) et Chen (3) après congélation lente d'un embryon à 8 cellules et d'un ovocyte en métaphase II.

La congélation lente ou congélation à l'équilibre est une technique qui consiste à équilibrer, avant leur refroidissement, les ovocytes ou embryons en présence de cryoprotecteurs perméables (glycérol, éthylène glycol, DMSO, 1-2 propanediol) à la concentration de l'ordre de 1,5 M, qui peuvent être associés avec un cryoprotecteur non perméable (saccharose 0,1-0,3 M). La solution de cryoprotecteurs étant hyperosmotique, l'exposition des cellules à cette solution induit une phase de déshydratation qui implique une diminution du volume cytoplasmique jusqu'à obtention de l'équilibre osmotique. Il s'ensuit un retour au volume initial en plus ou moins 15 minutes. Ce retour au volume initial est lié à l'entrée du cryoprotecteur perméable, accompagné d'eau extracellulaire, rétablissant ainsi l'équilibre des concentrations. Au cours de cette expo-

sition aux cryoprotecteurs, le matériel biologique est conditionné dans des paillettes (paillette CBS haute sécurité, 0,3 mL), qui sont ensuite refroidies suivant un protocole déterminé, dans un appareil de congélation programmable pour assurer les différents paliers et étapes de refroidissement.

La température est abaissée à la vitesse de 2° C/min. jusqu'à -6° à -7° C. En présence de cryoprotecteurs et de sels, cette température correspond à la température de changement d'état (T_m , m pour « melting ») (fig. 1b) du compartiment extracellulaire. À cette température, la cristallisation est induite artificiellement (« seeding ») dans le compartiment extracellulaire afin d'éviter une cristallisation spontanée à une température bien plus basse qui entraînerait une hausse brutale de la température (pic de surfusion) avec libéralisation de la chaleur latente de surfusion dans la paillette. En pratique, un refroidissement instantané de la paillette est effectué à l'aide d'un dispositif (pince, coton-tige) pré-refroidi dans l'azote liquide, de part et d'autre de la goutte contenant les ovocytes ou embryons et à une distance respectable afin de ne pas induire un refroidissement brutal du matériel biologique.

Après s'être assuré que le front de cristallisation a progressé tout au long de la paillette, l'embryon est refroidi jusqu'à une température de -30 à -40° C à raison de 0,3 à 0,5° C/min afin de profiter pleinement de l'effet de solution. Au cours de cette descente en température, la cristallisation d'eau pure dans le compartiment extracellulaire induit une augmentation de la concentration en cryoprotecteur et en solutés, ce qui induit la création d'un gradient osmotique. Le résultat est que ce gradient provoque la sortie d'une partie de l'eau présente dans la cellule, entraînant l'augmentation intracellulaire des concentrations en solutés et cryoprotecteur au cours de la réduction du volume cellulaire. À la fin du refroidissement lent, la survie cellulaire est devenue possible lors de l'immersion dans l'azote liquide, si les conditions autorisant la vitrification sont réunies.

La décongélation est obtenue par un réchauffement de la paille dans un bain-marie à 37° C. Ce réchauffement doit être rapide afin d'éviter les phénomènes de recristallisation (réorganisation en gros cristaux) entraînant des lésions cellulaires.

Vitrification

La vitrification ou passage d'une solution à l'état de glace amorphe a déjà fait l'objet de quelques études plus théoriques que pratiques il y a plus de quarante ans. Mais ce n'est qu'au début des années 1980 que des cryobiologistes y ont vu une nouvelle possibilité de préservation des embryons (4). De nombreuses publications relatives à la compréhension et au développement de la vitrification

d'embryons murins et bovins ont vu le jour et ont démontré l'avantage de cette technique au cours de la dizaine d'années qui a suivi.

Ce n'est que vers le milieu des années 1990 que la vitrification a suscité de l'intérêt dans le cadre de l'AMP (5, 6). Mais à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, elle génère toujours une certaine réticence dans certains pays et centres d'AMP.

Définition

La vitrification est définie comme étant la solidification d'une solution (eau libre et solutés dissous) sans réorganisation cristalline. L'état vitrifié résulte d'une augmentation extrême de la viscosité au cours du refroidissement. Ceci induit un ralentissement des mouvements internes des molécules (réduction de l'énergie interne et par conséquent de l'enthalpie) lié au refroidissement, mais sans permettre un arrangement moléculaire ordonné comme observé lors de la formation d'un cristal de glace, générateur de lésions aux membranes et aux structures cellulaires.

Obtention de l'état amorphe

Le passage de la solution à l'état amorphe vitreux a lieu lorsque la solution est amenée à une température inférieure à la température de transition vitreuse (T_g , g pour « glass ») (fig. 1a).

Avant d'atteindre cette température de vitrification de la solution en surfusion, dépendante de la concentration en soluté, la solution, contenant le matériel biologique, doit traverser une phase où la probabilité de formation de foyers de nucléation et de cristaux de glace est élevée. Cette zone est appelée la « zone métastable ».

Lors du refroidissement, la formation d'un état amorphe est compatible avec la formation de petits foyers de nucléation. Cependant lors du réchauffement, ces foyers de nucléation, précurseurs à la formation des cristaux, vont induire la cristallisation brutale de la solution, ce qui est incompatible avec la survie cellulaire. Il est donc indispensable d'empêcher leur apparition dès la phase de refroidissement.

En raison d'une barrière thermodynamique et cinétique, la formation d'un noyau de cristal requiert un certain temps. La probabilité de formation de cristaux sera par conséquent annulée si pour une viscosité définie, le refroidissement de la solution est suffisamment rapide.

Théoriquement, deux approches peuvent amener à l'état vitreux : la vitrification non équilibrée (fig. 1c) ou la vitrification à l'équilibre (fig. 1d). La dernière est indépendante de la vitesse de refroidissement-réchauffement, mais nécessite des concentrations en cryoprotecteurs incompatibles avec la survie cellulaire. En conséquence, seule la vitrification non équilibrée est utilisable pour le stockage des cellules et embryons.

Dès lors, pour accéder à l'état vitreux, des vitesses de refroidissement très rapides sont préconisées en association avec des concentrations élevées de cryoprotecteurs dans le compartiment extracellulaire. Ceci afin de réduire voire d'empêcher l'apparition des cristaux et de leurs précurseurs. Ce type d'approche où la probabilité de conserver un état vitrifiant est dépendante des vitesses de refroidissement et réchauffement est appelé la vitrification « non équilibrée ». C'est cette stratégie qui est actuellement appliquée pour la cryopréservation des ovocytes et embryons (fig. 1c).

À l'inverse, si on emploie des concentrations très élevées en cryoprotecteurs, cette zone critique sera évitée. L'état vitrifiant sera obtenu indépendamment de la vitesse de refroidissement-réchauffement. Cette vitrification à l'équilibre n'est pas directement compatible avec nos applications dans le domaine de l'AMP. Cependant, on peut considérer qu'elle est obtenue à la fin du processus de congélation lente, lorsque les conditions de concentration intracellulaire en cryoprotecteurs ont atteint un niveau suffisant pour permettre la solidification sans cristallisation.

Comment vitrifier ?

Indépendamment des méthodes de vitrification utilisées, les ovocytes ou embryons sont exposés à des concentrations élevées en cryoprotecteurs perméables (adaptés aux divers stades embryonnaires en fonction de leur perméabilité membranaire) et non perméables, de manière à augmenter la viscosité intracellulaire au-delà d'un seuil nécessaire pour induire et maintenir un état vitreux, lors des étapes ultérieures de refroidissement, et réchauffement. Les durées d'expositions aux solutions de cryoprotecteurs sont fonction du type de système de contention utilisé, qui sont « ouverts » (grille de cuivre, la paillette extrafine étirée, la Cryoloop™, l'hémi-straw, le Cryoleaf™, le Cryotop™) ou « fermés » (CryoTip®, OPS straw in straw, Vitrification Haute Sécurité, Vitrisafe). Une revue détaillée des systèmes de contentions est présentée par Vajta et Nagy (7).

En pratique, un état vitrifiant intracellulaire est créé avant le refroidissement dans l'azote liquide en exposant le matériel biologique successivement à des solutions non vitrifiantes et vitrifiantes de mélanges de cryoprotecteurs pénétrants (éthylène glycol, DMSO, 1-2 propanediol, glycérol, érythritol) et non pénétrants (saccharose, tréhalose, Ficoll).

Dans une première étape, les embryons sont exposés à une solution non vitrifiante composée uniquement de cryoprotecteurs pénétrants. Ils subissent une déshydratation extrêmement rapide (< 30 secondes) pour atteindre l'équilibre osmotique, qui se traduit par une forte réduction du volume. Il s'ensuit un équilibre des concentrations par entrée des cryoprotecteurs accompagnés d'eau ;

ce qui correspond au retour vers le volume initial. La vitesse et le degré d'expansion des cellules seront fonction de la durée d'exposition, du type de cryoprotecteurs (*i.e.* leur perméabilité membranaire) et de la concentration de ceux-ci. La durée d'exposition quant à elle sera fonction du type de cellules à vitrifier et du type de système de contention.

Dans une deuxième étape, les embryons sont immergés dans la solution « vitrifiante » de cryoprotecteurs perméables et non perméables pendant une courte période de 30 à 45 secondes, avant d'être déposés sur le support *ad hoc* et plongés dans l'azote liquide. Cette solution maintient l'état de vitrification pendant le refroidissement tout comme au réchauffement. Au cours de cette étape, se produit instantanément une seconde déshydratation. Les conditions d'un état vitrifiant intracellulaire sont ainsi obtenues par concentration des protéines et sels intracellulaires, aidée par les cryoprotecteurs ayant pénétrés durant la première étape. L'état vitrifié extracellulaire est obtenu par l'enrobage des ovocytes ou des embryons dans la seconde solution qui est vitrifiante.

Dès lors que des vitesses de refroidissements élevées sont appliquées, un réchauffement ultrarapide sera nécessaire pour éviter une éventuelle recristallisation (dévitrification) surtout si peu de cryoprotecteurs sont présents.

Évolution des techniques de vitrification

Vitrification « ultrarapide » et système de contention « ouvert »

Les premiers succès en vitrification embryonnaire ont été obtenus, il y a près de 25 ans en utilisant la mini-paillette (250 µL) comme méthode de stockage des embryons murins (4, 8) bovins (9) et humains (5). Lane (10) a montré que les faibles taux de survie initialement obtenus s'expliquaient par l'importance du volume à refroidir associé à la formation d'un isolant thermique autour de la paillette lors de son immersion dans l'azote liquide. Ces faibles vitesses de refroidissement-réchauffement, associées aux protocoles d'exposition aux cryoprotecteurs employés à l'époque, favorisaient la formation de foyers de nucléation.

Pour atteindre des vitesses de refroidissement ultrarapides (20 000° C/min) nécessaires pour éviter l'apparition de foyers de nucléation, l'inertie thermique doit être réduite par la conception de supports qui favorisent le contact direct de la microgoutte de solution cryoprotectrice contenant les embryons avec l'azote liquide.

En vertu du principe selon lequel la probabilité d'obtenir et de maintenir un état vitrifiant est directement proportionnelle aux vitesses de refroidissement – réchauffement et à la viscosité intracellulaire – il ressort qu'un des avantages des techniques de vitrification « ultrarapides » est de

permettre d'induire un état amorphe, pour des temps d'exposition aux cryoprotecteurs assez courts, ce qui réduit également l'effet toxique. Ce qui revient à dire que la concentration intracellulaire en cryoprotecteurs suffisante pour protéger la cellule est largement inférieure à celle présente dans le compartiment extérieur. Nous avons montré que le volume du zygote de souris ne revient qu'au tiers de son niveau d'origine après exposition à une solution de 10 % DMSO-10 % EG pour 3 minutes. Ce qui correspond à une concentration intracellulaire en cryoprotecteurs similaire voire inférieure à celle obtenue en fin de déshydratation (-30° C - 40° C) lors de la congélation lente.

La vitrification ultrarapide est actuellement considérée comme la méthode de choix pour la conservation d'ovocytes et des embryons à différents stades de leur développement en utilisant des microsupports de contention « ouvert » tels qu'une grille de cuivre, la paillette extrafine étirée ou *open pulled straw* (OPS), la Cryoloop™, l'hémi-straw, le Cryoleaf™, le Cryotop™.

Vitrification aseptique et système de contention « fermé »

À l'heure de la rédaction de ce manuscrit, les protocoles de vitrification « ultra-rapides », c'est-à-dire permettant le contact avec l'azote liquide, restent les standards utilisés pour vitrifier les ovocytes et embryons. Il n'en demeure pas moins qu'un des désavantages de cette approche est de mettre l'échantillon directement en contact avec l'azote liquide, ce qui peut être source de contaminations, aussi bien lors du refroidissement que durant le stockage, du fait de transmissions croisées avec des échantillons non convenablement protégés, mais aussi éventuellement d'un contact direct avec de l'azote liquide non stérile et chimiquement impur (11).

Une directive émise en 2004 par le Parlement européen (directive 2004/23/EC) concernant les tissus et les cellules organiques, et actualisée en 2006 (directive de la COMMISSION n° 2006/86/EC), stipule qu'il est impératif que la cryopréservation et le stockage de matériel biologique puissent être effectués de manière à garantir leur aseptie.

Système de contention « fermé » et barrière thermo-isolante

Des conteneurs hermétiquement clos avaient déjà été conçus en vue de vitrifier des ovocytes et des embryons de souris (12) et humains (13, 14). Cependant leur utilisation est restée sporadique. Kuwayama (13) a mis au point le système fermé « CryoTip® ». Il reconnaît malgré tout la supériorité du dispositif ouvert « Cryotop™ » qui reste son système de référence pour effectuer la vitrification notamment des ovocytes.

La vitrification en système « fermé » a comme premier effet d'isoler l'échantillon de l'azote liquide. Mais d'autre part il crée également une barrière

thermo-isolante. Il s’ensuit une augmentation de l’inertie thermique, impliquant une réduction importante de la vitesse de refroidissement de 20 000° C/min à moins de 2 000° C/min (15). L’effet négatif d’une réduction de la vitesse de refroidissement sur la survie post-réchauffement a été rapporté après vitrification d’embryons de souris (16) et humains (15) (tableau I) exposés pour de courtes périodes aux cryoprotecteurs.

La mise au point d’un système de contention hermétiquement clos nous a amené à modifier la manière de préparer des embryons avant l’étape de refroidissement. Pour Yavin (17), la probabilité d’obtenir et de maintenir un état vitrifié est directement corrélée aux vitesses de refroidissement et de réchauffement ainsi qu’à la viscosité intracellulaire. Il devenait donc évident que la diminution de la vitesse de refroidissement devait être compensée par une augmentation de la concentration intracellulaire en cryoprotecteurs afin d’éviter un phénomène de nucléation, tout en restant en dessous du seuil de toxicité.

Développement d’un support de contention « fermé » et d’un protocole de vitrification en condition de refroidissement réduit

Cette mise au point s’est déroulée en deux phases : 1) mettre au point un système de contention « fermé » autorisant le refroidissement et la

préservation ultérieure sans aucun contact avec l’azote liquide ; 2) préciser quel serait le protocole optimal d’exposition d’embryons aux cryoprotecteurs avant refroidissement en système « fermé ».

Développement d’un support de contention « fermé »

L’hémi-straw a été l’un des premiers supports permettant la vitrification en système ouvert (Vitri-Plug®, Astro-Med Austria) (18). Ce dispositif a une extrémité en forme de gouttière, dans laquelle on dépose une faible quantité de cryoprotecteurs (< 1 µL) contenant le matériel biologique (fig. 2a). L’hémi-straw est directement plongée dans l’azote liquide avant d’être sertie dans une paillette de 0,3 mL (Cryo Bio System, France) (fig. 2b).

Basés sur le système de l’hémi-straw, nous avons conçu deux systèmes « fermés » de vitrification permettant de garantir une asepsie maximale : le système Vitrification Haute Sécurité « VHS » (Cryo Bio System, France) et « Vitrisafe » (VitriMed Austria) (fig. 3).

Une microgoutte de cryoprotecteur contenant les ovocytes ou les embryons est préalablement déposée à l’extrémité de la gouttière avant d’insérer celle-ci dans une paillette de protection de 0,3 mL (Cryo Bio System, France). Cette dernière est ensuite complètement scellée par soudure thermique avant d’être plongée dans l’azote liquide. Les vitesses de refroidissement

Tableau I – Effet de la vitesse de refroidissement : développement « in vitro » de blastocystes humains exposés pour des courtes périodes aux cryoprotecteurs avant un refroidissement ultrarapide (> 20 000° C/min) ou plus lent (< 2 000° C/min).

	Nbre blastocystes	Temps d'exposition dans les solutions de DMSO/EG		Survie	
		10 %10 %	20 %/20 %	T = 0 h	T = 24 h
Vitesse de refroidissement					
> 20 000° C/min	21	3'-4'	45"	16 (76 %) a	15 (71 %) a
< 2 000° C/min	20	3'-4'	45"	8 (40 %) b	7 (35 %) b

X2 a – b
p < 0,02

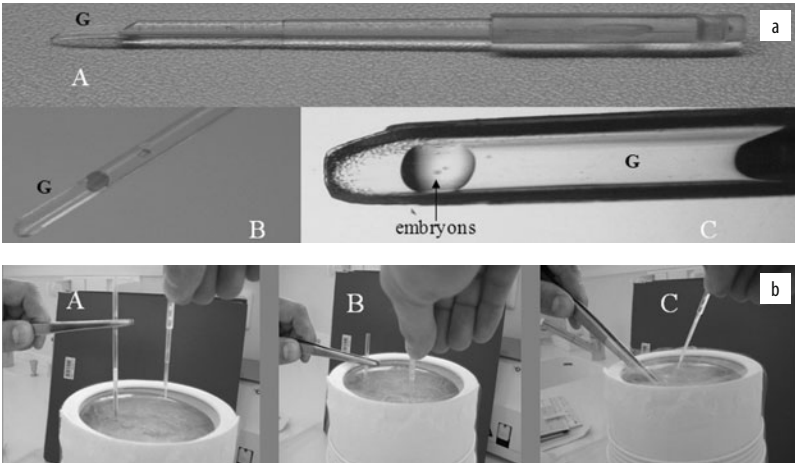


Fig. 2 – a : Support « ouvert » de contention : Vitriplug®-hémi-straw (HS). A : Vitriplug®-HS (Astro-Med Austria). B : Extrémité du Vitriplug®-HS avec la gouttière (G). C : Goutte de cryoprotecteur avec deux embryons. b : Processus de vitrification « ultra-rapide ». A : Vitriplug®-HS et la paillette CBS (Cryo Bio System, France) de protection. B : Vitriplug®-HS et la paillette CBS plongées dans l’azote liquide (vitesse de refroidissement > 20 000°C/min). C : Introduction du Vitriplug®-HS dans la paillette CBS sous le niveau de l’azote liquide.

dissement ainsi obtenues sont bien inférieures aux 20 000°C/min atteints avec l'hémi-straw. Elles sont respectivement de 1 700°C/min et de 1 300°C/min avec les supports VHS et Vitrisafe (tableau II).

Quel que soit le support utilisé (systèmes ouvert hémi-straw ou fermés VHS ou Vitrisafe), la procédure de réchauffement est toujours ultrarapide (> 20 000°C/min).

Quel que soit le support utilisé, la procédure de réchauffement est ultrarapide. Le support est extrait de la paillette de protection en évitant le contact avec l'azote liquide, et son extrémité qui porte la goutte de cryoprotecteur et les embryons est directement plongée dans une solution de saccharose. La solution de dilution des cryoprotecteurs sert donc également de liquide de réchauffement permet-

tant de maintenir des vitesses de réchauffement de plus de 20 000°C/min malgré l'utilisation d'un système fermé.

Développement d'une méthode de vitrification « aseptique » en condition de refroidissement réduit : méthodologie d'exposition prolongées aux cryoprotecteurs

Les cultures embryonnaires jusqu'au cinquième jour constituant la majorité de nos cas, il s'avérait logique que la mise au point d'un protocole dans les conditions de vitesses suboptimales de refroidissement soit appliquée en priorité aux blastocystes.

La manière la plus simple et logique d'atteindre un seuil de concentration en soluté, suffisant pour maintenir un état vitrifiant dans des conditions de refroidissements réduits, consiste à exposer direc-

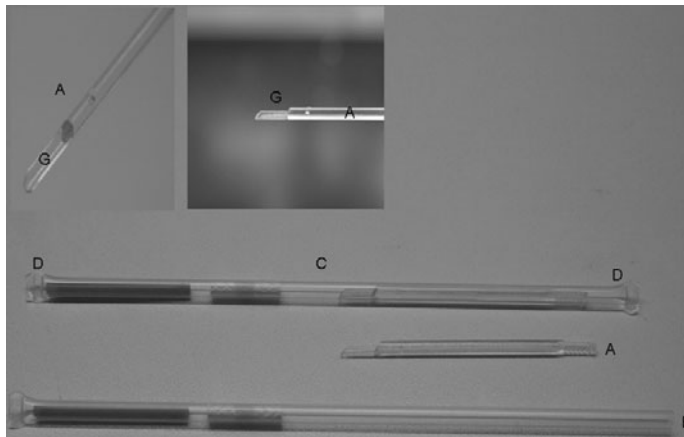


Fig. 3 – Vitrification en système « fermé » : Vitrisafe. A : Vitrisafe plug. B : Paillette haute sécurité de 0,5 mL. G : Gouttière contenant la goutte de cryoprotecteurs. C : Vitrisafe inséré dans la paillette haute sécurité. D : Fermeture par soudure thermique de l'extrémité de la paillette.

Tableau II – Différences entre système de contention « ouvert-hémi-Straw » et « fermé-Vitrisafe ».

Système de contention	Vitrification en hémi-straw - ouvert	Vitrisafe - fermé
Aseptie	Non	Oui
Effet thermo-isolant	Non	Oui
Vitesse de refroidissement	Ultrarapide > 20 000° C/min	<2 000° C/min
Vitesse de réchauffement	> 20 000° C/min	>20 000° C/min < 2 000° C/min
Concentration intracellulaire en cryoprotecteurs minimale pour favoriser l'état vitrifiant	Ordre de 1 000 mOsm	Ordre de 2 000 mosm
Addition des cryoprotecteurs	2 étapes	3 étapes
Durées d'expositions aux cryoprotecteurs	2-5 min	5 min

Tableau III – Effet de la durée d'exposition aux cryoprotecteurs : développement « in vitro » de blastocystes humains exposés directement à la solution 10 %/10 % pour différentes périodes.

	Nbre blastocystes	Temps d'exposition dans les solutions de DMSO/EG		Survie	
				T = 0 h	T = 24 h
		10 %/10 %	20 %/20 %		
Vitesse de refroidissement					
< 2 000° C/min	10	2'-4'	45"	4 (40 %)	2 (20 %)
	31	7'-8'	45"	22 (71 %)	17 (55 %)

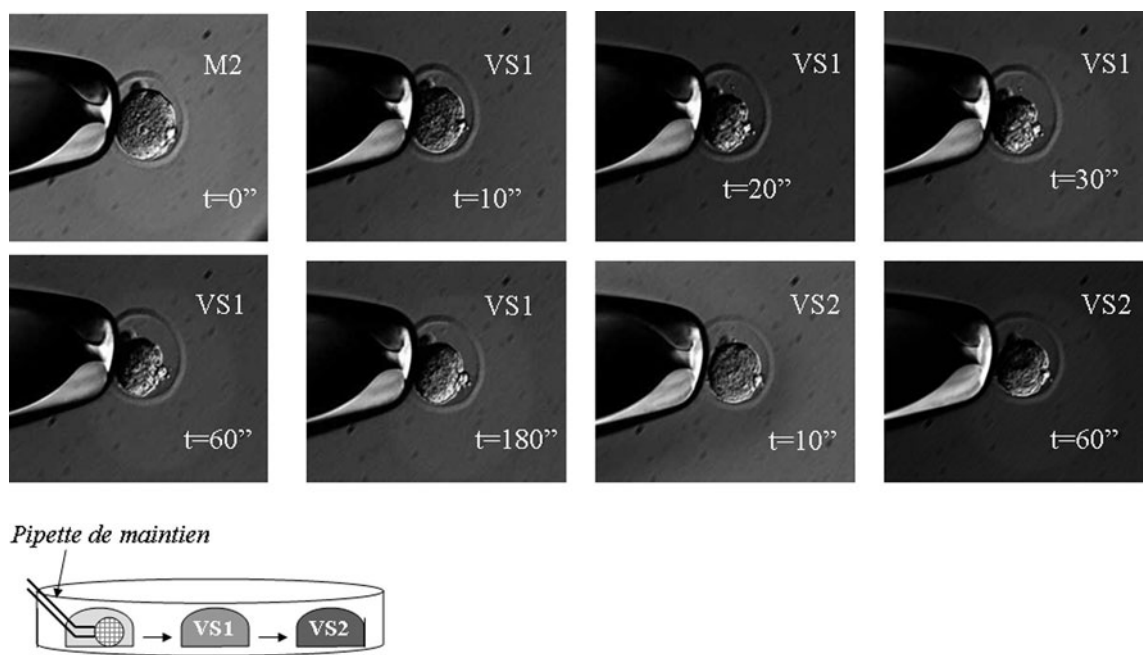


Fig. 4 – Analyse cinématographique : étude de la variation du volume de zygotes de souris exposés à différentes concentrations de solutions de cryoprotecteurs. M2 : milieu de culture. VS1 : DMSO/EG : 10 %/10 %. VS2 : DMSO/EG : 20 %/20 %.

tement, et pour de plus longues périodes, les blastocystes aux solutions de cryoprotecteurs. Toutefois, l’addition des cryoprotecteurs en une seule étape provoque une réaction osmotique instantanée qui se traduit par un phénomène de déshydratation brutal impliquant une augmentation de la concentration intracellulaire en solutés. Il est probable que ce choc osmotique, qui induit une réduction de plus de 50 % du volume initial de l’embryon, puisse devenir critique et toxique en cas d’exposition prolongée. Ceci pourrait expliquer une reprise embryonnaire réduite après 24 heures de culture malgré une apparence normale immédiatement après le réchauffement (tableau III). Une réponse à ces interrogations a été apportée par des études cinématographiques. Le but de ce travail consiste à analyser les variations de volume des cellules soumises à différentes conditions de concentrations et types de cryoprotecteurs (fig. 4). Une de nos études nous a permis de montrer que les zygotes de souris mis en présence de concen-

trations élevées (20 %) en cryoprotecteurs perdent plus de 50 % du volume initial en 20 à 30 secondes (fig. 5). Dès que l’équilibre osmotique est atteint, les cryoprotecteurs perméables entrent dans l’embryon pour équilibrer leurs concentrations de part et d’autre de la membrane. Ils sont accompagnés d’eau, ce qui fait que l’embryon tend à retourner vers son volume initial en quelques minutes. La vitesse d’entrée des cryoprotecteurs et de l’eau sera directement liée avec le degré de déshydratation. La sortie d’eau est parfois tellement brutale qu’elle induit des lésions membranaires (*blebs*) (fig. 6). De telles lésions ne sont pas encore visibles si un programme ultrarapide est appliqué car les temps d’exposition aux cryoprotecteurs sont trop courts et peu de pression est exercée sur les membranes. En revanche, si on prolonge les temps d’exposition, ces lésions sont visibles sous la forme d’excroissances de la membrane et elles peuvent affecter le développement ultérieur (fig. 5).

Tableau IV – Développement « in vitro » de blastocystes humains exposés successivement à des concentrations croissantes en cryoprotecteurs.

Nbre blastocystes	Temps d’exposition et concentration de DMSO/EG				Survie	
	2,5 %/2,5 %	5 %/5 %	10 %/10 %	20 %/20 %	T 0 h	T 24 h
31		5’	3’-4’	40’’-60’’	94 % (29)	83 % (26)
12		7,5’	3’-4’	40’’-60’’	92 % (11)	75 % (9)
23		10’	3’-4’	40’’-60’’	96 % (22)	87 % (20)
21	5’	10’	3’-4’	40’’-60’’	95 % (20)	95 % (20)

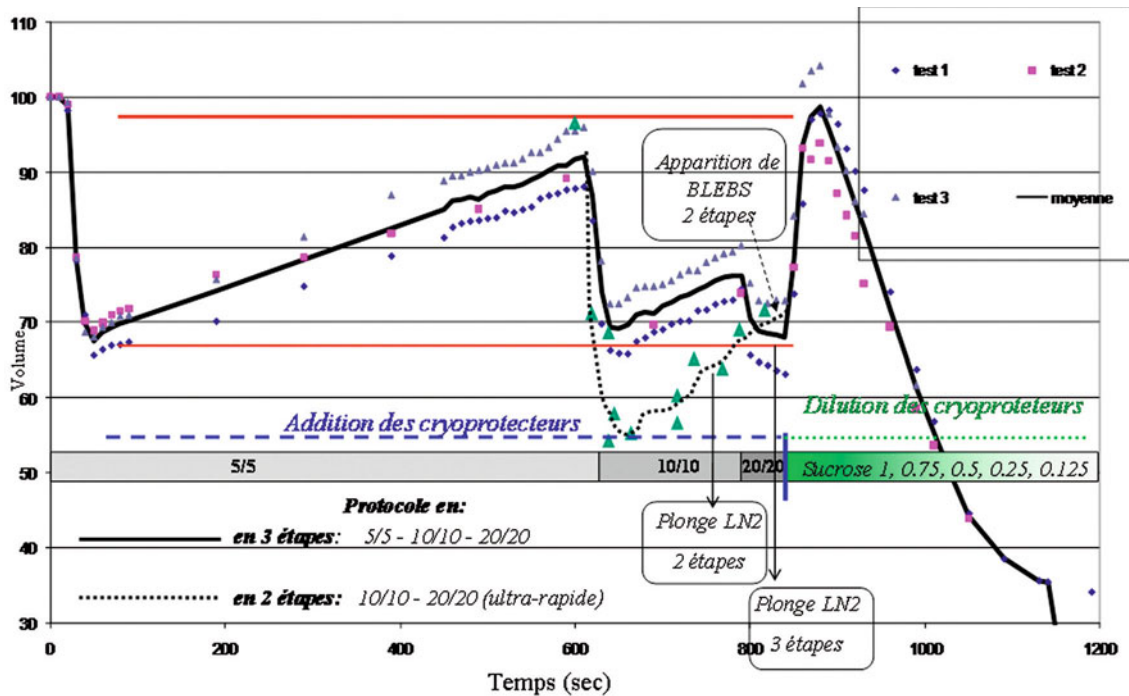


Fig. 5 – Variation du volume de zygotes de souris en fonction du nombre d'étapes d'addition des cryoprotecteurs. Une réduction de maximum 30 % du volume initiale du zygote est observée lorsque celui-ci est exposé à trois différentes solutions de CP (ligne noire). En revanche, lorsque le zygote est directement placé dans la solution 10/10 (ligne pointillée), un stress osmotique induit une réduction de volume de près de 50 %. Lors de l'exposition en une étape dans le 10/10, on observe l'apparition d'extrusion membranaire (blebs) lorsque les temps d'expositions sont prolongés au-delà de 3 minutes. Une exposition graduelle en trois étapes réduit ce stress membranaire. Les triangles et carrés représentent les analyses morphométriques.

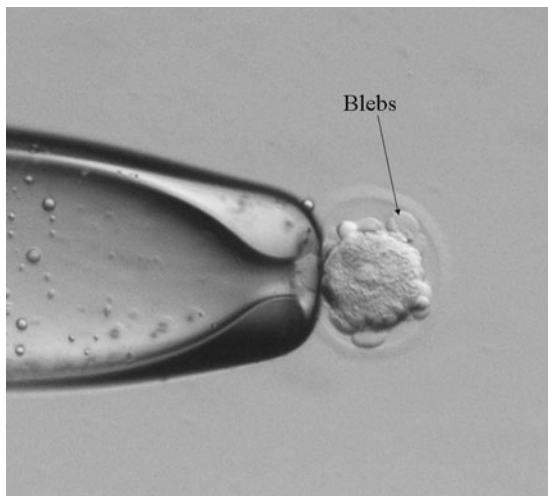


Fig. 6 – Apparition d'extrusion cytoplasmique (blebs) après exposition directe d'un zygote de souris à une solution de 10 % DMSO-10 % EG au-delà de 5 minutes.

Pour éviter des variations volumiques trop brutales, les blastocystes ont été exposés à plusieurs solutions de concentrations progressives en cryoprotecteurs. Ceci a pour effet de réduire les variations volumiques liées à des déshydratations excessives (fig. 5). Nous basant sur les

effets de diverses combinaisons de cryoprotecteurs appliqués à des zygotes de souris et ensuite à des blastocystes non éligibles pour un transfert embryonnaire, nous avons pu fixer un protocole intégrable dans notre programme de traitement clinique. Cette méthode qui consiste essentiellement en une application successive de concentrations croissantes en cryoprotecteurs nous a permis d'obtenir des taux de récupération de plus de 80 % (tableau IV).

Y a-t-il une similitude entre la congélation lente et la vitrification ? (tableau V)

Une condition *sine qua non* pour réduire la lyse cellulaire est l'obtention d'un état vitrifiant intracellulaire. Comme décrit plus haut, avant de plonger la paillette dans l'azote liquide, la congélation lente peut être subdivisée en trois étapes : l'équilibration des ovocytes ou embryons avec le cryoprotecteur perméable, l'amorce de la cristallisation extracellulaire et finalement le refroidissement lent à l'équilibre qui a pour objectif de déshydrater l'embryon concentrant les sels, protéines et les cryoprotecteurs afin de constituer les conditions d'un état vitrifié intracellulaire avant d'être plongé dans l'azote liquide.

Tableau V – Différence physicochimique entre la vitrification et la congélation lente.

	Vitrification	Congélation lente
Vitrification intracellulaire (i)	OUI [sel]i élevé	OUI [sel]i très élevé ↑↑ [PROH]i
Vitrification extracellulaire	OUI	NON (après : oui)
Concentration intracellulaire en CP	Moyenne ~2 M	> Élevée 2 M
Exposition aux CPs	Exposition - Courte ~2 – 10 min (T° ambiante)	Équilibration - Longue 15 min T° ambiante 90 min T° 0,3° C/min → -35° C
Vitesse refroidissement	Très élevée : 1 500–20 000° C/min de 20° C → -196° C	Faible : 0,3° C/min → -35° C Élevée : -35° → -196° C
Chocs osmotique	Exposition + Réchauffement	décongélation

Il apparaît donc que, même au cours d'une congélation lente, la survie cellulaire n'est possible que si les conditions physiques des phases liquides intracellulaire et extracellulaire autorisent la vitrification.

En d'autres termes, et indépendamment de la qualité ovocytaire ou embryonnaire, les facteurs qui permettent la survie des cellules sont ceux qui favorisent l'obtention de telles conditions : une déshydratation optimale durant le refroidissement lent et surtout la température à laquelle le matériel biologique est plongé dans l'azote

liquide, température qui déterminera le degré de déshydratation.

La congélation lente (ou congélation à l'équilibre) implique que la cellule suive à tout moment la courbe Tm du compartiment extracellulaire (fig. 1b). Il faut savoir que la concentration en protéines et en sels est toujours plus élevée dans la cellule qu'à l'extérieur. Cette différence de concentrations entre les deux côtés de la membrane à un effet radical sur les conditions de la cristallisation. En effet, les diagrammes de phase des compartiments intra- et extracellulaires ne sont pas les

Tableau VI – Protocoles de congélation lente des stades ovocytes / zygotes-embryons / blastocystes.

Congélation lente		
ovocytes	Zygotes – 8 cell	Blastocystes
Exposition aux CPs <i>PROH 1,5M 10 min.</i> <i>PROH 1,5M – Suc 0,2M ou Suc 0,3M 5 min.</i>	Exposition aux CPs <i>PROH 1,5M 10-15 min.</i> <i>PROH 1,5M – Suc 0,2M 5 min</i>	Exposition aux CPs <i>Glycerol 5% 10min.</i> <i>Glycerol 10% - Suc 0,2M 10 min</i>
Congélation programmée <i>2° C/min de 20° C à -7° C</i> <i>Seeding -6° C -7° C</i> <i>0,3° C/min jusque -30° C/min</i> <i>-50° C/min jusque -150° C</i> <i>Plonge les paillettes dans LN2</i>	Congélation programmée <i>2° C/min de 20° C à -6° C -7° C</i> <i>Seeding -6° C -7° C</i> <i>0,3° C/min de -6° C -7° C à -35° C/min</i> <i>-50° C/min jusque -150° C</i> <i>Plonge les paillettes dans LN2</i>	Congélation programmée <i>2° C/min de 20° C à -6° C</i> <i>Seeding -6° C</i> <i>0,3° C/min de -6° C à -39° C/min</i> <i>-50° C/min jusque -150° C</i> <i>Plonge les paillettes dans LN2</i>
Décongélation et dilution des CPs <i>Retire la paillette du canister et la tenir pendant 20 sec. A T° ambiante</i> <i>Plonger la paillette dans un bain d'eau à 37° C pendant 20 sec.</i> <i>Vider la paillette et diluer les CPs</i> <i>PROH 1,0M – Suc 0,2M 5min</i> <i>PROH 0,5 – Suc 0,2M 5min</i> <i>Suc 0,2M 5min</i>	Décongélation et dilution des CPs <i>Retire la paillette du canister et la tenir pendant 20 sec. A T° ambiante</i> <i>Plonger la paillette dans un bain d'eau à 37° C pendant 20 sec.</i> <i>Vider la paillette et diluer les CPs</i> <i>PROH 1,0M – Suc 0,2M 5min</i> <i>PROH 0,5 – Suc 0,2M 5min</i> <i>Suc 0,2M 5min</i>	Décongélation et dilution des CPs <i>Retire la paillette du canister et la tenir pendant 20 sec. A T° ambiante</i> <i>Plonger la paillette dans un bain d'eau à 37° C pendant 20 sec.</i> <i>Vider la paillette et diluer les CPs</i> <i>Suc 0,5M 10 min</i> <i>Suc 0,2M 10 min</i>

Tableau VII – Protocoles de vitrification ultrarapide en système « ouvert » du stade zygote au blastocyste.

	T° et temps d'exposition avant refroidissement éthylène glycol-DMSO				Réchauffement-dilution Saccharose		
	10 %-10 %	T°	20 %-20 %	T°	1M	0,5M	0,25M
Zygotes	6'-8'	TL	45"	RT	2'-3'	3'-4'	3'-4'
6 à 8 blastomères	3'	TL	45"	RT		2'-3'	3'-4'
Morulae	2'	TL	45"	RT		2'-3'	3'-4'
Jeune blastocyste	2'	TL	45"	RT		2'-3'	3'-4'
Blastocyste	3'	37° C	45"	37° C		2'-3'	3'-4'
Blastocyste expansé + AS	2'-3'	37° C	45"	37° C		2'-3'	3'-4'
Blastocyste expansé Intact	7'-10'	TL	45"	RT	2'-3'	3'-4'	3'-4'

AS : *artificial shrinkage* (dégonflement du blastocèle) avant vitrification.

TL : T° du labo ~ 25°C.

Système de contention : hémi-straw.

Tableau VIII – Protocoles de vitrification en système « fermé-aseptique » du stade zygote au blastocyste.

	Temps d'exposition avant refroidissement éthylène glycol-DMSO			Réchauffement-dilution Saccharose				
	5 %-5 %	10 %-10 %	20 %-20 %	1 M	0,75 M	0,5 M	0,25 M	0,125 M
Zygotes	5'-10'	4'-5'	40"-60"	1'	1'	1'	2'-4"	3'
Autres stades	5'-10'	4'	40"-60"	1'- 1'30"	1'- 1'30"	2'	2'-4"	3'

Toutes les manipulations à la T° du laboratoire.

Système de contention : « Vitrisafe » ou « VHS ».

mêmes : la température de solidification, et donc la courbe T_m, est légèrement plus élevée dans le compartiment extracellulaire (fig. 1b). Ce qui revient à dire qu'à tout instant du refroidissement, chaque point de la courbe T_m extracellulaire, correspond, dans le compartiment intracellulaire, à un point situé quelques degrés au-dessus de la courbe T_m intracellulaire. Ce qui explique que si les cristaux de glace sont présents et croissent au fur et à mesure du refroidissement dans le compartiment extracellulaire, l'augmentation de l'osmolarité qu'ils induisent dans les deux compartiments y interdit l'apparition des cristaux intracellulaires. À la fin du refroidissement lent, les concentrations en cryoprotecteurs et solutés, atteintes entre les cristaux dans le compartiment extracellulaire et dans la cellule, sont telles que la poursuite de la cristallisation n'est plus possible. Ce liquide se solidifie alors par vitrification.

En résumé, indépendamment du type de stratégie de cryopréservation, l'état vitrifié intracellulaire est obtenu au cours du refroidissement (congélation lente) ou avant le refroidissement (vitrification).

Cryoconservation - Application clinique

Les protocoles généraux concernant la congélation lente et la vitrification sont décrits dans les tableaux VI, VII et VIII.

Ovocyte

Problème lié à la cryopréservation des ovocytes en métaphase II (MII)

La cryopréservation de l'ovocyte humain en métaphase de la deuxième division méiotique pose toujours problème, plus de 20 ans après l'obtention de la première naissance (3). Cette technique se révèle être une des plus difficiles à maîtriser en médecine reproductive. En effet, pour pouvoir cryopréserver les ovocytes, nous devons faire face à plusieurs difficultés. De toutes les cellules de mammifères, l'ovocyte est parmi les plus grandes. Si la quantité d'eau intracellulaire y est très importante, sa surface membranaire est limitée par rapport à son volume. De plus, les échanges sont réduits au stade ovocytaire étant donné la faible perméabilité de la membrane. Tout ceci fait que la maîtrise des flux transmembranaires de l'eau et l'entrée des cryoprotecteurs sont des étapes capitales de la cryopréservation de l'ovocyte.

Mais d'autres raisons majeures compliquent encore la situation. Les processus de congélation-décongélation et l'addition et dilution des cryoprotecteurs peuvent endommager différentes structures cellulaires telles que le noyau métaphasique, le cytosquelette, la zone pellucide et les granules corticaux. Le fuseau méiotique est thermosensible et formé de microtubules qui se dépolymérisent et repolymérisent lors de l'exposition à des tem-

pératures non physiologiques. Même si certaines études ont montré que l'intégrité du fuseau des ovocytes humains était préservée au cours du refroidissement/réchauffement, il n'en demeure pas moins que des problèmes de « chilling » et de chocs osmotiques peuvent malgré tout induire (a) des aneuploidies, (b) la déstabilisation de la structure fibrillaire du cytosquelette composée d'actine, (c) des lésions de la zone pellucide entraînant un phénomène de durcissement de celle-ci, et finalement (d) des activations parthénogénétiques. Il a donc été envisagé de cryopréserver les ovocytes au stade immature de vésicule germinative ou prophase I. Malheureusement, on observe encore plus d'anomalies du fuseau après l'étape de maturation *in vitro* et des taux de survies nettement inférieurs par rapport au stade MII.

Congélation lente des ovocytes

La grande majorité des publications relatent des naissances obtenues à partir d'ovocytes vitrifiés au stade MII. Les premiers protocoles étaient similaires à ceux utilisés pour la congélation lente des embryons en utilisant dans un premier temps le DMSO et ensuite le 1-2 propanediol comme cryoprotecteurs.

Si quelques naissances sporadiques sont rapportées, à la suite de la première naissance, ce n'est que 10 ans plus tard que la congélation des ovocytes a pris son plein essor suite au travail considérable en Italie de l'équipe du Dr Porcu (19). L'introduction de l'ICSI a outrepassé les problèmes liés au durcissement de la ZP et a permis d'obtenir les taux de fécondation identiques à ceux obtenus avec des ovocytes non congelés. En vue d'augmenter le degré de déshydratation en tenant compte du faible rapport surface/volume et réduire la probabilité de formation de cristaux intracellulaire, la durée d'exposition au cryoprotecteur a été prolongée à plus de 10 minutes et la concentration en saccharose associée au PROH 1,5M a été portée de 0,1 M à 0,3 M. Néanmoins, à la lecture de différentes publications, une grande hétérogénéité dans les taux de survie de 20 à 80 % est observée et pourrait être en relation avec des anomalies de la plaque métaphasique et de la configuration chromosomique (20). Une analyse de Oktay (21), portant sur une période de près de 8 ans, rapporte des taux de naissance par transfert de 22 % (période 1996-2004) à 32 % entre 2002 et 2004. Un taux de fausses couches globales de 20 % similaire aux fausses couches spontanées est aussi rapporté.

En vue de réduire l'effet de solution causé par une concentration du NaCl qui a pour effet de déstabiliser la membrane plasmique, Stachecki *et al.* (22) ont préconisé de substituer le sodium par la choline. Une telle approche a permis d'obtenir des naissances.

Dans le but d'assurer une meilleure protection au cours de la congélation, l'injection dans le cytoplasme de tréhalose ou l'emploi de stabilisateurs du cytosquelette, tel le Taxol®, a fait l'objet d'études. Malgré tout, l'effet toxique du Taxol® n'a pu être évalué, empêchant toute application clinique.

Vitrification « ultrarapide » des ovocytes

Au cours de ces dernières années, le nombre de publications portant sur la vitrification des ovocytes est en hausse constante, justifiant un regain d'intérêt pour cette technique (23, 24). Les taux de survie des ovocytes cryopréservés par vitrification ultrarapide sont de l'ordre de 80 à 95 % et les taux de grossesse de 40 à 50 % (24).

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, peu d'études comparant la « congélation lente » à la « vitrification » d'ovocytes ont pu être répertoriées. Une étude randomisée de Cao (25), comparant la vitrification ultrarapide (Vit) à la congélation lente (CL), montre des différences significatives en faveur de la vitrification. En ce qui concerne les taux de survie (61 % CL vs 92 % Vit), de développement embryonnaire précoce (54 % CL vs 78 % Vit) et formation de blastocystes (12 % CL vs 33 % Vit). Cette équipe observe également un taux d'anomalies du fuseau métaphasique et de l'alignement des chromosomes plus élevé après congélation lente (39 %) qu'après vitrification (17 %). Cobo (26) et Rienzi (27) ne rapportent aucune différence en termes de développement après vitrification avec le système « ouvert-Cryotop™ » par rapport aux ovocytes non vitrifiés.

Vitrification d'ovocytes : refroidissement en supports de contention « ouvert » ou « fermé »

La technique de Kuwayama (28) consiste à exposer les ovocytes à un mélange de DMSO-EG et utilisant le système « ouvert » (« Cryotop™ ») comme support. Malgré le contact des ovocytes avec l'azote liquide, cette technique peut être considérée comme la technique de référence pour vitrifier les ovocytes matures (24).

Dans le futur, en vue de créer des banques d'ovocytes, il sera indispensable de refroidir et stocker les ovocytes dans des conditions d'isolement complet en vue de garantir la sécurité sanitaire. Considérant que l'efficacité de la vitrification est proportionnelle à la concentration des cryoprotecteurs et aux vitesses de refroidissement-réchauffement, il est impératif, si on veut améliorer la cryoprotection sans augmenter les concentrations en cryoprotecteurs, de trouver des artifices nous permettant de refroidir très rapidement sans affecter l'aspect sanitaire du processus.

Dans cette optique, plusieurs approches ont déjà été proposées.

Lorsque l'échantillon est immergé dans l'azote liquide, une ébullition a lieu, résultant dans la formation de bulles gazeuses qui génère une gaine thermo-isolante (effet Leidenforst) avec pour effet de réduire les transferts de chaleur. L'application d'une pression négative en effectuant le vide va réduire la température de l'azote liquide à -210°C et permettre un refroidissement instantané de plus de $100\,000^{\circ}\text{C/min}$. De telles vitesses annulent les problèmes de « chilling » et la formation de foyers de nucléation.

Une autre approche consiste à réduire l'inertie thermique en utilisant des capillaires moins isolants que le plastique. L'emploi de paillettes en quartz permettait, à volume égal, d'atteindre des vitesses de refroidissement-réchauffement bien plus élevées qu'avec des paillettes classiques (French mini straw) même préalablement étirées (open pulled straw).

S'il s'avère que des vitesses de refroidissement $> 20\,000^{\circ}\text{C/min}$ sont indispensables pour l'ovocyte, la mise sur le marché de systèmes permettant de stériliser l'azote liquide immédiatement avant son emploi semble être la solution la mieux adaptée.

Dans le but d'établir une banque d'ovocyte, la vitrification d'ovocytes en système de contention « fermé » ou « ouvert » fait l'objet d'une étude dans le centre « Iakentro » du Dr Prapas. À l'heure de la rédaction de ce manuscrit, 32 cycles de vitrification d'ovocytes ont été effectués, 17 cycles en utilisant « l'hémi-straw » et 15 en déposant les ovocytes sur le « Vitrisafe ». Sur un total de 127 ovocytes vitrifiés en conditions non aseptiques, 94 % ont été injectés (ICSI) dont 73 ont été fécondés. En condition d'asepsie, 96 ovocytes ont été vitrifiés et 89 (93 %) sont intacts. Après ICSI, un taux de zygotes de 87 % a été obtenu.

Les taux de grossesses débutantes et évolutives sont respectivement de 41 % et 18 % en système « ouvert » et de 47 % et 27 % en système fermé. Ces résultats, même si préliminaires, révèlent la faisabilité de la vitrification en système de contention « fermé ».

Quand effectuer la cryopréservation d'ovocytes et l'ICSI ?

Les moments les plus propices pour congeler et pour effectuer l'ICSI ont fait l'objet d'investigations. Une étude rétrospective de Parmegiani (29) portant sur 510 cycles montre une amélioration de la qualité embryonnaire, des taux de grossesse et d'implantation si la congélation lente était effectuée dans les 2 heures après la ponction ovocytaire. Rienzi (30) recommande que l'ICSI soit effectuée approximativement 3 heures après le réchauffement pour permettre une restauration des fonctions cellulaires, la réorganisation du cytosquelette et, plus particulièrement, du fuseau méiotique.

Enfants nés après cryopréservation d'ovocytes

La santé des enfants nés après congélation ou vitrification d'ovocytes suscite des craintes justifiées par le manque d'informations rapportées.

Les conclusions de trois études sont encourageantes. Elles ne révèlent aucun risque accru, ni pendant la grossesse, ni après la naissance. Une analyse récente de Noyes (23) sur une série de plus de 936 bébés nés après congélation lente ou vitrification ne montre aucune différence en termes de malformation (1,3 %) comparativement aux enfants conçus spontanément ou après FIV. Ces données confirment l'étude de Chian (31) analysant l'évolution de 200 enfants nés après vitrification.

Embryons

Congélation lente

Chaque cryoprotecteur a son propre coefficient de perméabilité membranaire. Il a été établi que pour chaque stade du développement embryonnaire un cryoprotecteur bien spécifique soit attribué. C'est ainsi que le 1-2 PROH était utilisé pour la cryopréservation des zygotes, le DMSO pour les stades de 2 à 8 cellules et le glycérol pour le blastocyste. Finalement, le DMSO a été remplacé par le 1,2 PROH pour les stades en divisions précoces avec une efficacité comparable.

Depuis la première naissance annoncée par Zeilmaier en 1984 (2), la congélation lente des embryons est devenue une pratique courante des activités du laboratoire d'AMP. La cryopréservation a été appliquée principalement pour les stades zygotes et les stades en division du deuxième et troisième jour de culture. Le protocole de base pour ces stades est celui développé par Lassalle (32).

L'application clinique de la congélation lente a fait l'objet d'une synthèse détaillée par Griveau (33).

La congélation des embryons au stade morulae a fait l'objet de peu de publications. Tao (34) rapporte malgré tout la faisabilité de la congélation lente de morulae en présence de 1-2 PROH et 0,1 M de saccharose. Après congélation de 444 morulae, 89 % sont sélectionnés pour un transfert embryonnaire. Après 137 transferts de 2,5 morulae en moyenne, des taux de grossesses et d'implantation de respectivement 58 % et 37 % sont rapportés. Selon cette équipe, le jugement de l'aspect de la compaction de l'embryon constitue une étape délicate (34). Le taux d'implantation peut varier de 9 à 45 % si on est en présence au quatrième jour d'embryons peu compactés ou totalement compactés. Le stade morulae n'est pas à négliger, tout comme le blastocyste, ce stade permet une sélection plus argumentée, surtout lorsque le transfert d'un seul embryon est à envisager.

La première naissance après congélation de blastocystes a été obtenue en 1985 par Cohen (35). Après l'obtention de cette naissance, il a fallu attendre près d'une dizaine d'année pour observer un intérêt croissant pour la culture et la cryopréservation du blastocyste. Malgré tout, la cryopréservation du blastocyste a pris son plein essor lors de l'utilisation des cocultures et surtout la commercialisation des milieux de culture séquentiels. Le transfert des embryons au stade blastocyste s'accompagne d'une augmentation des taux d'implantation liés à une meilleure sélection des embryons à potentiel évolutif (36), et probablement à une meilleure synchronisation avec la fenêtre d'implantation de l'endomètre. Le transfert de blastocystes a été proposé en cas d'échec répétés d'implantation après transfert au 2^e ou 3^e jour et aussi pour réduire au maximum le risque de grossesses multiples en ne transférant qu'un nombre restreint de blastocystes sélectionnés.

La technique initiale proposée par Cohen (35) consistait en une série croissante de dix bains de glycérol. Elle a été ensuite simplifiée. De dix étapes, le nombre d'étapes a été réduit à deux respectivement avant congélation et lors de la dilution des cryoprotecteurs après réchauffement.

Youssry (37) rapporte les résultats en termes de survie, grossesses et implantation de blastocystes congelés. Ils obtiennent des taux de survie de 30 % à plus de 80 %. Ils expliquent une telle amélioration par des progrès techniques et surtout par la production de blastocystes dans des conditions de culture plus optimales.

Malgré tout pour une majorité d'équipes, l'enthousiasme du départ pour congeler les blastocystes s'est rapidement tempéré en raison de résultats décevants dus à des échecs de culture trop fréquents, à une mauvaise qualité des blastocystes et surtout à un taux de survie extrêmement faible après réchauffement. Ce faible taux de survie pourrait s'expliquer par la structure complexe des blastocystes.

Vitrification des embryons

C'est en 1985, que la revue *Nature* rapporte les premiers développements « in vitro » d'embryons de souris vitrifiés en présence d'un mélange complexe de cryoprotecteurs : DMSO-acétamide-propanediol et polyéthylène glycol (4). Les premières naissances de souriceaux et de veaux ont été rapportées par Scheffen (8) et Massip (9) après vitrification de morulas et de blastocystes en présence d'un mélange de glycerol et de 1-2 propanediol conditionné en paillette fermée de 0,25 mL.

Un intérêt grandissant pour cette technique dans le domaine de l'AMP est à noter au vu des nombreux articles publiés ces dernières années. Des

revues détaillées concernant la vitrification des embryons font l'objet d'une multitude de publications (7, 37-39).

Des études prospectives randomisées comparant la congélation lente à la vitrification ont conclu à la supériorité de la technique de vitrification en termes de survie embryonnaire et de grossesses chez la souris (40), ainsi que dans l'espèce humaine (41-43).

Vitrification de zygotes

Système de contention « ouvert »

Des taux élevés de survie (81-100 %), de développement jusqu'au stade blastocyste et de grossesse ont été rapportés en exposant les zygotes aux solutions de cryoprotecteurs pour de courtes durées et en utilisant des systèmes de supports non hermétiques tels que la flexi-pipette, la grille de cuivre, l'OPS et le CryotopTM (44).

Système de contention « fermé »

Un total de 86 cycles de vitrification-réchauffement en « vitrisafe » a été effectué chez des patientes montrant des signes d'hyperstimulation. Après réchauffement, 95 % de zygotes apparaissaient intacts. Dans un premier groupe de 42 patientes, 60 réchauffements-transferts ont été effectués aux jours 2 ou 3. Douze grossesses évolutives ont été observées (28 % par patientes et 20 % par transfert). Dans un deuxième groupe de 26 patientes, tous les zygotes sont réchauffés et mis en culture jusqu'au stade de blastocystes. Un total de 25 patientes a bénéficié d'un transfert d'au moins un blastocyste. Neuf grossesses évolutives sont en cours (36 % par patientes) et pour huit patientes, un total de 19 blastocystes a pu être revitrifié (communication personnelle).

En insérant une paillette étirée dans une paille de 250 µL, Isachenko (45) observe un taux de survie des zygotes de 75 %, et 25 % de ceux-ci atteignent le stade de blastocyste.

Vitrification des embryons au 3^e jour

Dans une étude récente de Balaban (46), il apparaît que la vitrification d'embryons au jour 3 est moins traumatisante pour les cellules que la congélation lente classique et est, dès lors, associée à de meilleures caractéristiques métaboliques et de formation de blastocystes ainsi que de survie.

Système de contention « ouvert »

El Danasouri et Selman (47) ont vitrifié 215 embryons avec l'OPS au troisième jour de culture. Un taux de survie de 79 % et 40 % était observé après vitrification des embryons stades 8 blastomères et 6 à 7 blastomères respectivement. Après transferts, des taux de grossesses de 30 % et d'implantation de 10 % étaient observés. Rama Raju et

al. (43) ont cryopréservé les embryons du troisième jour soit par congélation lente, soit par vitrification en utilisant la « Cryoloop™ » comme support. L'étude randomisée a montré une supériorité significative en termes de survie (95 vs 60 %) de grossesses (35 vs 17 %) et d'implantation (15 vs 4 %) après vitrification comparé à la congélation lente. Kuwayama (13) rapporte après vitrification de plus de 890 embryons à 4 blastomères au jour 2 avec le « Cryotop™ » des taux de survie significativement supérieurs par comparaison avec la cryopréservation lente (98 vs 91 %).

Système de contention « fermé »

La première grossesse après vitrification d'embryons au stade 8 cellules a été rapportée en 1998 par Mukaida en utilisant un mélange d'éthylène glycol-Ficoll et saccharose et la mini-paillette de 250 µL comme support (6).

Vitrification de morulae

Système de contention « ouvert »

En utilisant un mélange de 15 % DMSO-15 % EG, Cremades (48) a obtenu un taux de survie de 73 % après réchauffement et toutes les morulae ont évolué jusqu'au stade blastocyste.

La vitrification de morulae est effectuée dans notre centre et, avec l'évolution de la technique, différents supports sont utilisés. Comme système « ouvert », l'hémi-straw était employé et a permis d'obtenir des taux de naissances et d'implantation respectivement de 27 et 20 % (tableau IX).

Système de contention « fermé »

La vitrification de morulae en paillette de 0,25 mL et plus récemment avec le « Vitrisafe » permet d'obtenir des taux de naissances et grossesses respectivement de 23 et 33 %. Le protocole appliqué

Tableau IX – Vitrification de morulae avec différents systèmes de contention : « ouvert » et « fermé ».

	Système « ouvert » Hémi-Straw (VitriPlug®)	Système « fermé » Paillette 0,25 mL	Vitrisafe
Cycle de vitrification	59	22	21
Morulae	140	55	46
Formation de blastocystes après 24 h	71 %	55 %	74 %
Grossesses	19	7	9
Fausses couches	16 %	25 %	22 %
Grossesses évolutives			33 % (7)
Naissances	27 % (16)	23 % (5)	
Implantation	20 %	20 %	26 %

Protocoles pour les différents systèmes :

Paillettes 0,25 mL : EG 20 % (3-4 min) + EG 40 % - Ficoll 18 % - Saccharose 0,3 M (30 s)

Hémi-straw : DMSO 10 % - EG 10 % (2-4 min) + DMSO 20 % - EG 20 % Ficoll 18 % - Saccharose 0,75 M (45 s)

Vitrisafe : DMSO 5 % - EG 5 % (5 min) + DMSO 10 % - EG 10 % (4 min) + DMSO 20 % - EG 20 % Ficoll 18 % - Saccharose 0,75 M (45 s)

Tableau X – Application de la vitrification de blastocystes en condition totalement aseptique (Vitrisafe) dans un programme d'assistance médicale à la procréation.

Origine des blastocystes	Infertilité masculine et féminine	Don d'ovocytes	Maturation <i>in vitro</i>	Total
Nbre patients	103	91	22	216
Âge patientes : moyenne ± DS	34,5 ± 3,7	28,8 ± 3,1	32,3 ± 4,9	
Nbre cycles vitrification - réchauffement	120	91	22	233
Nbre blastocystes vitrifiés	348	427	64	839
Nbre blastocystes réchauffés	348	218	64	630
Survie après réchauffement	285 (82 %)	203 (93 %)	53 (83 %)	541 (86 %)
Survie avant transfert	254 (73 %)	191 (88 %)	44 (69 %)	489 (78 %)
Nbre transferts embryons	111	91	21	223
Nbre blastocystes transférés (moyenne)	231 (2,1)	186 (2,0)	39 (1,9)	456 (2,0)
Gr/cycle vitrification-réchauffement	66 (55 %)	54 (59 %)	15 (68 %)	135 (58 %)
Fausses couches	15 (23 %)	7 (13,0 %)	4 (27 %)	26 (19 %)
Gr évolutives/cycle vitrification-réchauffement	51 (43 %)	48 (53 %)	11 (50 %)	110 (47 %)
Nbre activité cardiaque	60	64	15	139
Taux d'implantation	26 %	34 %	38 %	30 %

pour les morulae est similaire à celui utilisé pour les blastocystes, à savoir une addition progressive des cryoprotecteurs (tableau IX).

Vitrification des blastocystes

Système de contention « ouvert »

La vitrification des blastocystes a fait l'objet d'une multitude d'articles (16, 37, 38, 49).

L'impact de la vitrification des blastocystes sur le devenir des bébés a fait l'objet d'une large étude par Mukaida (50). Les données ont été récemment réactualisées sur une série considérable de 2 599 cycles de vitrification ultrarapide de blastocystes exposés pour une période de maximum 2'30" dans un mélange de DMSO-EG et vitrifiés avec la « Cryo-loop™ » comme support. Après réchauffement de 5 412 blastocystes, 92,1 % survivent à la procédure de vitrification. Un taux de 36,3 % de grossesses évolutives est obtenu. Sur un total de 560 naissances, 691 bébés (341 garçons-350 filles) en bonne santé ont été observés. Un total de 17 anomalies congénitales et complications néonatales a été noté (3 %), similaire au taux d'anomalie obtenu après transferts de blastocystes non vitrifiés (2,3 %). De plus, le taux de jumeaux monozygotes (3,3 %) est comparable au groupe de blastocystes transférés dans un cycle frais (3,2 %).

Kuwayama (13) a obtenu des taux de grossesses de 59 et 51 % en utilisant comme support le « Cryo-top™ » (condition non aseptique : système ouvert) et le « CryoTip® » (condition aseptique : système fermé). Dans son protocole, les blastocystes ne sont plus « exposés » aux cryoprotecteurs mais équilibrés pour de plus longues périodes (5 à 15 min) avec la solution de DMSO-EG. Les blastocystes sont en contact avec le mélange de cryoprotecteurs jusqu'au moment où ils reviennent à leur volume initial.

Système de contention « fermé »

L'association d'une exposition graduelle aux cryoprotecteurs, préalable au refroidissement en condition d'asepsie totale, permet de vitrifier avec succès des blastocystes de différentes origines : dérivés de patients atteints d'une infertilité féminine et/ou masculine, de dons d'ovocytes et après maturations *in vitro* d'ovocytes (tableau X).

Il tombe sous le sens que la qualité des blastocystes est un facteur important dans l'issue d'un traitement d'AMP, ceci en termes de taux de survie embryonnaire et de grossesses. C'est pourquoi l'application de la vitrification aseptique à des blastocystes provenant d'un programme de don d'ovocytes peut être prise comme standard de référence pour évaluer l'efficacité de cette méthode. Une proportion plus élevée d'ovocytes sains est prélevée chez des femmes jeunes, et seuls des blastocystes de bonne qualité seront sélectionnés pour être vitrifiés.

La maturation *in vitro* d'ovocytes (MIV) peut être réservée pour des patientes difficiles à stimuler et présentant le syndrome des ovaires polykystiques ou pour des patientes avec une historique d'hypersimulation sévère lors d'un précédent cycle de FIV. La ponction ovocytaire d'ovocytes immatures, la maturation de ceux-ci et l'obtention d'embryons de bonne qualité après ICSI semblent plus ou moins résolues. Néanmoins, l'impossibilité actuelle d'obtenir des taux d'implantation satisfaisants par le transfert frais d'embryons développés après MIV constitue une importante limitation technique. Nos résultats semblent indiquer une amélioration du rendement lorsque des embryons post-MIV ont été vitrifiés et replacés au cours de cycles supplémentés par une combinaison d'œstradiol et de progestérone. Ceci ne fait qu'illustrer indirectement la notion selon laquelle une déficience dans la qualité de l'endomètre et du climat hormonal chez ces patientes atteintes de syndrome d'ovaires polykystiques influence négativement l'implantation (51). Étant donné l'efficacité de la méthode de vitrification aseptique appliquée à des blastocystes de bonne qualité, il conviendrait sans doute de revoir la politique de sélection des embryons à transférer à l'état frais. La réceptivité de l'endomètre dans les cycles stimulés est essentielle pour le succès des procédures cliniques de FIV/ICSI. Le taux d'implantation élevé observé dans un programme de don d'ovocytes est évidemment lié aux potentialités élevées de survie post-vitrification des blastocystes transférés, mais dépend tout autant de la qualité endométriale au cours des cycles de transfert supplémentés hormonalement. En se souvenant que la réceptivité utérine peut ne pas toujours être idéale, surtout si les patientes ont déjà présenté plusieurs échecs d'implantation, il pourrait s'avérer judicieux de vitrifier d'emblée les blastocystes de bonne qualité et de ne transférer à l'état frais que ceux de moindre qualité. Cette approche a déjà été suggérée par Testard il y a près de 25 ans. En effet, avec la réduction du nombre d'embryons à transférer, on ne doit plus considérer le pourcentage de grossesse par transfert mais bien par tentative. Une tentative cumulera à un transfert à frais et à plusieurs transferts d'embryons cryopréservés. En conséquence, le taux cumulé de grossesses sera dès lors à envisager et la politique de choix des embryons à transférer à reconsidérer.

De plus, étant donné la tendance actuelle de ne transférer qu'un seul embryon à la fois (36), il devient plus logique de présenter les résultats en termes de taux cumulé de grossesses par prélèvement d'ovocytes. Dès lors, une technique de cryopréservation efficace est indispensable.

La cryopréservation des blastocystes a, pendant longtemps, posé des problèmes et a été une des rai-

sons pour laquelle la vitrification a été introduite. Malheureusement, si les premiers résultats chez le modèle murin se sont avérés optimistes pour les morulae et les jeunes blastocystes, il n'en a pas été de même lorsque la cavité était expansée (52). Un autre avantage non négligeable de notre protocole de vitrification aseptique est qu'il ne nécessite pas de collapser artificiellement la cavité blastocœli-que. Confirmés par d'autres équipes d'AMP, nous avons montré l'effet bénéfique d'une réduction volumétrique du blastocœle, préalable à une vitri-fication ultrarapide (53). En effet, les temps d'ex-position aux cryoprotecteurs étant assez courts, la cavité blastocœli-que n'est pas suffisamment pro-tégée contre l'apparition de foyers de nucléation. En revanche, l'approche consistant en une expo-sition initiale des embryons pendant 5-10 min, dans une solution moins concentrée en cryoprotecteur, permet de laisser entrer suffisamment de cryopro-TECTEURS dans la cavité pour empêcher la formation de cristaux de glace, tout en restant en dessous du seuil de toxicité.

Il y a plus de vingt ans, nous avons rapporté des taux de survie acceptables de blastocystes murins et bovins, vitrifiés dans une mini-paillette de 0,25 mL et ayant donné lieu à la naissance de sou-riciaux et de veaux (8, 9) après leur transfert chez des receveuses. Plus récemment, Stachecki (54) rapporte d'excellents résultats par la vitrification de blastocystes humains chargés dans des mini-paillettes de 0,25 mL, en garantissant également la sécurité de la technique de vitrification utilisée. La modalité ultra-rapide de vitrification de blastocys-tes devrait être révisée, étant donné que le refroi-dissement peut s'effectuer à une vitesse moins rapide moyennant une préparation adéquate des embryons.

Malgré des vitesses réduites de refroidissement en raison des nécessités d'asepsie, des résultats acceptables peuvent être obtenus si les concen-trations intracellulaires de cryoprotecteurs sont bien adaptées aux besoins des cellules. Si des résultats de ce type pouvaient s'obtenir à grande échelle, la vitrification aseptique serait suscep-tible de devenir une méthode de routine avan-tageuse pour la conservation, non seulement de blastocystes humains, mais aussi d'autres stades embryonnaires, voir de cellules issues du bouton embryonnaire.

D'autres facteurs, tels que l'ouverture de la zone pellucide avant (55) ou après (18) la vitrification, ne sont pas à sous estimer, malgré la publication de résultats contradictoires.

L'observation de la morphologie des ovocytes et embryons avant et après décongélation (56) est une étape importante qui influencera en premier lieu le taux de survie, la reprise des divisions en culture et le taux d'implantation.

Conclusions et perspectives

Peut-on envisager la vitrification comme une alter-native à la congélation lente ? Il est possible que dans le futur la vitrification s'impose comme étant la technique la plus favorable pour la cryoconserva-tion des embryons. Toutefois, malgré les résultats prometteurs obtenus à ce jour, la méthodologie devra peut être adaptée en fonction des différents stades de développement embryonnaire et des systèmes de contentions. En effet, il est indispen-sable pour chaque stade, caractérisé en outre par un rapport surface-volume et par une perméabi-lité membranaire spécifique, de trouver la balance entre la pénétration minimale de cryoprotecteurs dans la cellule et la vitesse de refroidissement et de réchauffement qui permet d'obtenir des taux de survie maximal sans induire un effet toxique.

Compte tenu des risques de contamination tou-jours possibles, des alternatives aux systèmes de supports permettant le contact avec l'azote liquide, ont récemment été développées. Notre technique « vitrification haute sécurité » consiste à refroidir les embryons dans des paillettes scellées et donc étan-ches. Nos premiers résultats obtenus avec le « VHS » et le « vitrisafe » ne semblent en tout cas pas souffrir de cette adaptation sécuritaire de la méthode.

Après les premiers succès de la vitrification en sys-tème « fermé » (paillette de 0,25 mL), les supports « ouverts » sont devenus la référence surtout pour la vitrification des ovocytes. L'emploi de vitesses ultra-rapides va de paire avec une courte expo-sition aux cryoprotecteurs, minimisant les effets toxiques. L'analyse du comportement des ovocytes ou embryons en présence de différentes concentra-tions de mélanges de cryoprotecteurs va permet-tre de définir les meilleures combinaisons afin de pouvoir protéger le matériel biologique dans des conditions réduites de stress cellulaire et de toxi-cité chimique. Au vu des résultats prometteurs pré-sentés par Stachecki (54), le retour à la vitrification en paillette semble imminent.

De plus, il ne fait aucun doute qu'un mélange de cryoprotecteurs à base de glycérol semble être tout particulièrement approprié à la vitrification des stades de développement embryonnaire tardif tels que les morulae et les blastocystes.

La vitrification et l'utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs : ceci justifie-t-il la pré-férence pour la congélation lente ?

La congélation lente est utilisée depuis plus de 30 ans sans véritable prise de conscience que la survie cellulaire est la conséquence de la présence d'un état vitrifiant intracellulaire.

Certains cryobiologistes craignent d'exposer les ovocytes et/ou embryons à des concentrations éle-vées en CPs, qu'ils les cryopréservent dès lors par le biais de la vitrification ? (56)

Références

- Whittingham D, Leibo S, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269° C. *Science* 178: 411-4
- Zeilmaker G, Alberda A, van Gent I *et al.* (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 42: 293-6
- Chen C (1986) Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 19: 884-86
- Rall W, Fahy G (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573
- Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A *et al.* (1997) Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod* 12 (Suppl): 98
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K *et al.* (1998) Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 13: 2874-9
- Vajta G, Nagy Z (2006) Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 7: 623-33
- Scheffen B, Vanderzwalmen P, Massip A *et al.* (1986) A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-letters* 7: 260-9
- Massip A, Vanderzwalmen P, Scheffen B *et al.* (1986) Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* 7: 270-3
- Lane M, Schoolcraft W, Gardner K (1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel Cryoloop™ container-less technique. *Fertil Steril* 72:1073-78
- Bielanski A, Vajta G (2009) Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 24: 2457-67
- Larman M, Sheehan C, Gardner D (2006) Vitrification of mouse pronuclear oocytes with no direct liquid nitrogen contact. *Reprod Biomed Online* 12: 66-9
- Kuwayama M, Vajta G, Leda S *et al.* (2005) Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 11: 608-14
- Isachenko V, Katkov I, Yakovenko S *et al.* (2007) Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): Novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology* 54: 305-9
- Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L *et al.* (2009) Development of an aseptic vitrification technique: application to blastocysts originating from infertile patients, egg donors and after in vitro maturation. *Reprod Biomed Online* 19: 700-7
- Vanderzwalmen P, Ebner T, Zech N (2007) One decade of experience with vitrification of human embryos in straws, hemi-straws and high security vitrification straws. In: *Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble-shooting guide*, Edited by Tucker and Liebermann, Informa healthcare: 195-17
- Yavin S, Arav A (2007) Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67: 81-9
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche *et al.* (2003) Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 18: 1504-11
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R *et al.* (1997) Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 68: 724-6
- Coticchio G, De Santis L, Rossi G *et al.* (2006) Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2: 1771-6
- Oktay K, Pelin A, Bang H (2006) Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 86: 70-80
- Stachecki J, Cohen J, Willadsen S (1998) Cryopreservation of unfertilized oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 37: 346-55
- Noyes N, Porcu E, Borini A (2009) Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 18: 769-76
- Cobo A, Vajta G, Remohi J (2009) Vitrification of human mature oocytes in clinical practice. *Reprod Biomed Online* 19 (Suppl 4): 1-19
- Cao Y, Xing Q, Li L *et al.* (2009) Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 92: 1306-11
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S *et al.* (2008) Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop™ method. *Fertil Steril* 89: 1657-64
- Rienzi L, Romano S, Albricci L *et al.* (2010) Embryo development of fresh versus vitrified metaphase II oocytes after ICI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 25: 66-73
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O *et al.* (2005) Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11: 300-8
- Parmigiani L, Cognigni G, Bernardi S *et al.* (2008) Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. *Hum Reprod* 23: 1771-7
- Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F *et al.* (2004) Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 19: 655-9
- Chian R, Huang J, Tan S *et al.* (2008) Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 16: 608-10
- Lassalle B, Testard J, Renard JP (1985) Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril* 44: 645-51
- Griveau JF, Le Lannou D, Mirallie S, *et al.* (2005) L'assistance médicale à la procréation en pratique : Place de la congélation en AMP. Ed Masson 162-90
- Tao J, Craig R, Johnson M *et al.* (2004) Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertil Steril* 82: 108-18
- Cohen J, Simons R, Fehilly C *et al.* (1985) Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage. *Lancet* 1: 647
- Zech N, Lejeune B, Puissant F *et al.* (2007) Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertil Steril* 88: 244-6
- Youssry M, Ozmen B, Zohni K *et al.* (2007) Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 16: 311-20
- Liebermann J (2009) Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 19 (Suppl.4): 1-10
- Varghese A, Nagy P, Agarwal A (2009) Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 19: 126-40
- Walker D (2004) Vitrification versus programmable rate freezing of late stage murine embryos: a randomized comparison prior to application in clinical IVF. *Reprod Biomed Online* 8: 558-68
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama K *et al.* (2005) Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 11: 53-7
- Loutradi E, Kolibianakis E, Venetis C (2008) Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 90: 186-93
- Rama Raju G, Haranath G, Krishna K *et al.* (2005) Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online* 11: 434-7

44. Al Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N *et al.* (2007) Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online* 14: 288-93
45. Isachenko V, Katkov I, Yakovenko S *et al.* (2007) Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): Novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology* 54: 305-9
46. Balaban B, Urman B, Ata B *et al.* (2008) A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 23: 1976-82
47. El-Danasouri I, Selman HA. (2001) Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 76: 400-2
48. Cremades N, Sousa M, Silva J *et al.* (2004) Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod* 19: 300-5
49. Vanderzwalmen P, Zech N, Greindl JF *et al.* (2006) Cryo-préservation des embryons humains par vitrification. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 760-9
50. Mukaida T, Takahashi T, Goto T *et al.* (2009) Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 9 year experience (3601 attempted cycles) including the incidence rate of monozygotic twinning. *Hum Reprod* 24 (Suppl 1): i28
51. Son WY, Yoon SH, Park SJ *et al.* (2002) Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: case report. *Hum Reprod* 17: 2963-6
52. Vanderzwalmen P, Gaurois B, Ectors F *et al.* (1988) Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 30: 1177-83
53. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C *et al.* (2002) Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 17: 744-51
54. Stachecki J, Garrisi J, Sabino S *et al.* (2008) A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 17: 360-7
55. Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O *et al.* (2009) Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth. *Reprod Biomed Online* 19: 72-8
56. Vanderzwalmen P, Zech N, Lejeune B *et al.* (2010) La vitrification et l'utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs : ceci justifie-t-il la préférence pour la congélation lente ? *Gynecol Obstet & Fertil* (sous presse)

J.-M. Kunstmann
et D. Le Lannou

Procréation par don de gamètes et accueil d'embryon

Introduction

L'assistance médicale à la procréation (AMP) s'est considérablement développée pour venir en aide aux couples confrontés à l'impossibilité de concevoir naturellement avec leurs propres gamètes. Le développement successif de l'insémination artificielle et de la fécondation *in vitro* (FIV) a aussi permis dans le même temps de faire émerger différentes possibilités de fonder une famille en s'affranchissant du repère de la filiation biologique. Un couple infertile peut aujourd'hui concevoir un enfant avec un autre gamète que le sien et même envisager l'accueil d'un embryon conçu par un autre couple. Ces techniques ont bousculé le concept de filiation traditionnelle, ses bases juridiques, socio-culturelles et posent notamment la question de l'information des enfants et, pour ces derniers, celle de l'interprétation des origines.

En France, ces nouveaux modes de procréation ont été reconnus par les lois de bioéthique dès 1994, puis confirmés en 2004 et ces actes sont inscrits dans le cadre de l'AMP. Selon la loi, ils ne s'adressent qu'à des couples composés d'un homme et d'une femme, en âge de procréer et ne peuvent répondre qu'à des indications médicales.

Don de gamètes

Il peut être mis en œuvre (article L2141-8, loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique) « lorsqu'il existe un risque de transmission d'une maladie d'une particulière gravité à l'enfant ou à un membre du couple, lorsque les techniques au sein du couple ne peuvent aboutir ou lorsque le couple dûment informé... y renonce ».

Don de spermatozoïdes

La première insémination artificielle avec sperme de donneur (IAD) daterait du XIX^e siècle. Longtemps condamnée par la société, voire assimilée à un adultère, jusque dans les années 1960 elle n'a

été pratiquée que par quelques gynécologues privés, dans la plus totale discrétion, non officialisée et vécue de façon culpabilisante par les couples. De fait, il apparaissait alors impossible d'en informer l'enfant : secret du mode de conception et anonymat étaient alors la règle.

C'est ce qui incita G. David, en 1973, à tenter de l'officialiser en essayant d'en réhabiliter tous les acteurs : couple demandeur, donneur, enfant, médecin. Il proposa des principes éthiques forts afin d'offrir à la société une vision moins péjorative de cette pratique et tenter de la faire admettre comme une véritable alternative à l'impossibilité de concevoir naturellement. La création du premier centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme (CECOS) en 1973, dont la pratique fut rapidement validée, amena rapidement à la création de nouveaux centres.

La procréation par don de spermatozoïdes en France connaît aujourd'hui une situation particulière :

- au plan éthique : avec des principes mis en place par G. David en 1973 dans les CECOS (1, 2), et repris par les lois de bioéthique dès 1994 : le principe d'un don bénévole, anonyme, l'expérience de la parenté pour les donneurs et le consentement de leur compagne ;
- au plan organisationnel : par des structures à but non lucratif constituées par le réseau de la Fédération nationale des CECOS avec 24 centres répartis sur l'ensemble du territoire. Ils fonctionnent avec des règles communes, mais sont autonomes, notamment en matière de recrutement des donneurs et de la gestion des demandes. Enfin, la Sécurité sociale assure pour ce type de procréation une prise en charge à 100 % comme pour toute AMP intraconjugale.

Dans la plupart des autres pays, ces activités se sont au contraire souvent développées au sein de structures privées ou indépendantes, avec des pratiques très différentes et notamment la possibilité de donneurs célibataires et rémunérés. Quant au principe de l'anonymat, s'il est longtemps resté commun à la pratique internationale, plusieurs pays ont aujourd'hui rendu possible sa levée et la question fait maintenant débat en France.

Depuis la création du premier CECOS en France, les demandes ont rapidement progressé pour dépasser les 3 000 demandes/an jusqu'en 1995, date de la mise en œuvre de la FIV avec micro-manipulation (*intra-cytoplasmic sperm injection* ou ICSI) en France (fig. 1). Cette dernière a transformé le pronostic de l'infertilité masculine, entraînant une rapide diminution du recours à l'IAD. La demande s'est ensuite stabilisée et correspond en 2006 à 1 640 demandes pour un premier enfant, tandis que près de 500 couples formulent chaque année une nouvelle demande pour un deuxième enfant ou plus, témoignant en cela de la possibilité de concevoir une famille avec plusieurs enfants.

Indications du don de spermatozoïdes

Selon la législation, seules les indications médicales sont recevables (fig. 2).

Indications masculines

Elles sont les plus fréquentes. La stérilité masculine représente plus de 90 % de l'ensemble des indications. Il s'agit bien d'un traitement palliatif dont les indications ont évolué en fonction de notre capacité à traiter l'infertilité masculine. Ainsi, l'arrivée de l'ICSI en a notablement fait chuter la demande. Ces indications ne sont pas toujours évidentes, supposent un diagnostic précis et donc une exploration complète du statut masculin.

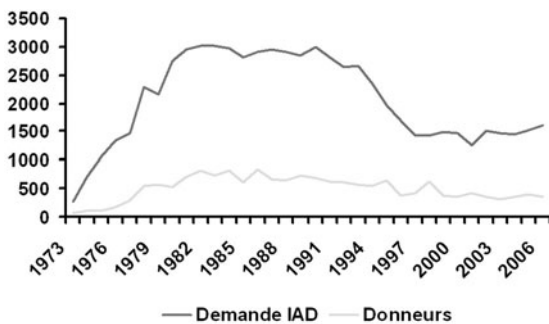


Fig. 1 – Évolution des demandes d'IAD et du recrutement des donneurs depuis la création des CECOS.

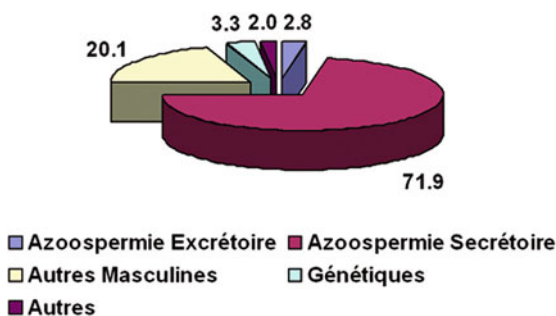


Fig. 2 – Indications du don de spermatozoïdes.

Azoospermie

Si elle a longtemps constitué l'indication la plus évidente au don de spermatozoïdes, il n'en est plus de même aujourd'hui. Elle peut être :

- soit excrétoire : en général, après échec de tentatives de reperméabilisation ou surtout de tentative de FIV-ICSI avec spermatozoïdes prélevés chirurgicalement ;
- soit sécrétoire : après refus d'exploration chirurgicale ou après échec de l'exploration, voire après échec de plusieurs tentatives de FIV-ICSI avec spermatozoïdes d'origine testiculaire. Ce pourra être le cas d'un syndrome de Klinefelter révélé par le caryotype et ce d'autant plus qu'il est en mosaïque.

Malgré la lourdeur de ces tentatives en intraconjugal et leur caractère douloureux en cas d'échecs répétés, cette étape est souvent considérée comme indispensable avant d'envisager le recours au don. Certains couples y renoncent cependant et selon la loi aucune obligation ne peut leur être faite de s'y soumettre préalablement.

Oligoasthénotératospermie (OAT)

C'est toujours une indication délicate à poser, le plus souvent après un parcours long et douloureux de plusieurs tentatives d'insémination intra-utérine (IIU), de FIV et surtout d'ICSI avec de nombreux transferts infructueux d'embryons à l'état frais et congelés. Après analyse minutieuse des pourcentages de fécondation, de la qualité embryonnaire, de la maturité ovocytaire dans la possible explication de ces échecs, la responsabilité spermatique dans la non évolutivité embryonnaire sera alors évoquée avant d'envisager le don de spermatozoïdes. La situation est particulièrement difficile lorsqu'on se retrouve confronté à une OAT extrême alors que la compagne à 38-39 ans : comment évaluer les chances d'obtenir une grossesse en ICSI en intraconjugal au risque de devoir recourir finalement au don de spermatozoïdes après plusieurs tentatives d'ICSI mais au terme de 2 à 3 années et ce au détriment parfois de la fertilité féminine. La question mérite d'être abordée et posée avec les couples car ils pourraient décider de renoncer à des tentatives en intraconjugal pour privilégier les chances en don.

Le risque de transmettre une maladie d'une particulière gravité : génétique ou infectieuse

Indications génétiques

Il s'agit ici de concevoir avec un autre génome que le sien considéré comme trop à risque en raison d'antécédents familiaux ou parce qu'un ou plusieurs enfants sont déjà atteints. L'acceptation de la demande est conditionnée par la gravité de la maladie qui doit être étayée : maladie génétique engageant le pronostic vital ou entraînant un han-

dicap sévère, au risque élevé (notamment au $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$) et sous condition de l'impossibilité d'une thérapie post-natale, ni d'un diagnostic préimplantatoire ou anténatal de l'affection. Mais ce peut être aussi certaines anomalies chromosomiques lorsque le diagnostic prénatal cytogénétique n'est plus acceptable : il s'agit souvent alors de couples traumatisés par la répétition de fausses couches spontanées, d'interruptions médicales de grossesse après diagnostic anténatal ou de plusieurs échecs de FIV avec diagnostic préimplantatoire : maladie dominante : polykystose rénale, polykystose colique familiale, polykystose autosomique récessive, maladies à hérédité multifactorielle (certaines surdités, etc.). Concernant le risque génétique, les couples recourant à un don de spermatozoïdes doivent être informés que les donneurs ne sont pas systématiquement testés pour des pathologies autosomiques récessives et que le risque n'est pas nul en cas d'hétérozygotie inconnue de la receveuse. En cas de décision difficile à prendre, le dossier est soumis à la Commission de Génétique des CECOS.

Risque de transmission d'une maladie infectieuse à l'enfant ou à la partenaire

Dès la fin des années 1980 jusqu'en 2000, les CECOS ont été sollicités par des couples dont l'homme était contaminé par le VIH et qui préféraient concevoir une famille par don de spermatozoïdes plutôt que de prendre le risque de contaminer à la fois la mère et l'enfant.

Cette indication est aujourd'hui très rare du fait des possibilités de prise en charge en intraconjugal et de l'efficacité des traitements antirétroviraux (3).

Couples demandeurs

Selon la loi, ils doivent être mariés ou avoir au moins 2 ans de vie commune. Indépendamment de la validation de l'indication médicale au don de spermatozoïdes, l'équipe médicale, qui associe un médecin et un psychologue, doit s'assurer que les deux membres du couple ont bien anticipé les enjeux d'une procréation par don. Notamment que l'homme ait bien fait le deuil d'une paternité biologique pour concevoir la possibilité réelle de fonder une famille sous l'angle d'une seule paternité affective et sociale : considérer que la contribution génétique à la conception d'un embryon est totalement aléatoire, incontrôlable et donc non programmable, que ce soit avec ses propres gamètes ou ceux d'un autre. Concevoir dès lors la notion de transmission au-delà de la participation biologique à travers des valeurs, des repères et une relation humaine. En cas d'échec d'une AMP intraconjugale, un certain délai est souvent nécessaire avant de pouvoir envisager un tel projet. Enfin, il faut s'assurer que la compagne, souvent séduite à l'idée du vécu de la grossesse dans cette solution, ait pu

laisser une certaine autonomie à son compagnon pour se projeter dans cette perspective.

Sera enfin abordée la question de l'information ou non de l'enfant : les parents se posent souvent la question de l'intérêt ou non d'informer l'enfant des modalités de sa conception, mais ils n'anticipent pas forcément ce qui devra être assumé dans chacun des choix et toutes les conséquences pour l'enfant. Il appartient au CECOS de leur en faire prendre conscience en tenant aussi compte de l'environnement socioculturel propre à chaque couple. Le débat actuel sur la question de l'anonymat initié par quelques enfants témoigne de l'importance de ces questions, et notamment de celle de l'interprétation des origines. Surtout, proposition sera faite au couple de les revoir au-delà de la naissance de l'enfant, en fonction des problématiques rencontrées.

La demande de don ayant été validée, le couple devra alors consentir à une AMP avec tiers donneur devant un juge aux affaires familiales dans un tribunal de grande instance (TGI) ou devant notaire, dans les conditions garantissant le secret. Dès lors, la paternité de cet homme ne pourra en aucun cas être remise en cause, y compris par lui-même.

Donneurs

Critères requis pour le don

Ils sont les mêmes que ceux qui avaient été mis en place lors de la création des CECOS et ils ont été repris par les lois de bioéthique : les donneurs doivent avoir l'expérience de la parentalité, être déjà pères, avoir moins de 45 ans, donner bénévolement et anonymement, enfin avoir l'accord de leur compagne.

Population des donneurs

Ce sont souvent des hommes déjà donneurs de sang ou de moelle, voire porteurs d'une carte de donneur d'organe. La gratuité suppose de la part du donneur potentiel une sensibilisation à la question de la stérilité et une réflexion lui ayant permis de relativiser la dimension biologique de la paternité. Ils sont donc en phase avec le projet des couples demandeurs : l'idée d'un don de cellules, simple support biologique indispensable à la fécondation qu'ils donnent à d'autres hommes pour leur permettre de devenir pères à leur tour. Déjà pères, ils n'ont eux-mêmes aucun projet d'enfant, lequel projet ne pourra être concrétisé que par le désir d'autres hommes, d'autres couples. L'anonymat leur paraît en cela important pour dépersonnaliser leur don, et permettre à chacun, donneur, receveur, de rester autonome au-delà du don.

Leur recrutement (fig. 3)

En pratique, depuis le début de l'activité des CECOS, la très grande majorité d'entre eux (70 %) sont en

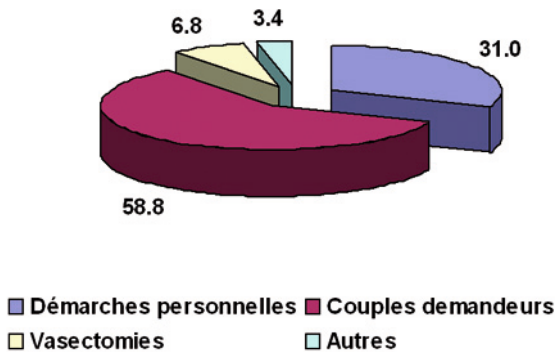


Fig. 3 – Mode de recrutement des donneurs de spermatozoïdes.

fait sensibilisés par des couples concernés par une stérilité masculine et donc demandeurs d'IAD. Ces derniers conscients du manque de donneurs, par insuffisance d'information, vont eux-mêmes s'investir et accepter d'en parler avec des proches, familiaux ou amis, en sachant qu'en aucun cas le donneur recruté ne pourra être utilisé pour eux. Les démarches qualifiées de spontanées ont toujours été très inférieures aux précédentes, excepté en 1998 et 2008 où d'exceptionnelles actions de communication ont permis de doubler le recrutement annuel. Ceci témoigne d'une capacité mobilisatrice de la société sous réserve qu'elle soit sensibilisée à cette question. Le recrutement qui fonctionne sur le principe de la solidarité explique que de nombreux donneurs soient déjà donneurs d'un autre produit biologique (sang, moelle, plaquettes, etc.). Enfin, quelques hommes demandeurs de vasectomie et pratiquant une autoconservation de sperme préalable acceptent à cette occasion de procéder à quelques recueils supplémentaires au titre de don.

Évolution du recrutement

Depuis 1973, l'évolution du recrutement (fig. 1) témoigne qu'elle est en fait corrélée à la courbe de l'évolution des demandes de don, puisque près de 70 % des donneurs sont sensibilisés par des couples demandeurs. La chute des demandes en 1996-1997, liée à l'apparition de l'ICSI à la même époque, explique la diminution des donneurs.

Parcours du don

Il consiste en quatre à cinq recueils de sperme au total, lesquels sont analysés et testés après décongélation. En début des dons, un bilan est réalisé comprenant une enquête génétique avec prise en compte des antécédents familiaux et un caryotype du donneur, un bilan infectieux au niveau spermatique et un bilan sérologique pour écarter tout risque viral pour le VIH1 et 2, le VHB, le VHC, le CMV ainsi que tout risque de syphilis, ce au cours des dons et 6 mois après le dernier don.

Seuls seront retenus pour le don les spermatozoïdes normaux, témoignant d'une bonne congélation, qui ne font courir aucun risque infectieux ou génétique grave et direct révélé par l'enquête familiale. Seront ainsi récusés les donneurs présentant une pathologie grave à transmission dominante (ici à pénétrance réduite et/ou expressivité variable) et ceux présentant une anomalie chromosomique. En pratique, la majorité des pathologies rencontrées étant d'origine multifactorielle, dans un tel contexte le donneur est attribué à une receveuse qui ne présente pas le même facteur de risque dans sa famille, de façon à ne pas cumuler des facteurs de risque relatif identiques. À noter que, comme en reproduction naturelle, les pathologies génétiques à transmission autosomique récessive ne sont pas recherchées systématiquement par des tests génétiques sauf en cas de signe d'appel dans la famille du donneur (ex. : mutations du gène *CFTR*) ou lorsque le donneur est originaire d'une région à forte prévalence pour certaines mutations (ex. : hémoglobinopathies). Dans ce cas, le dépistage de la mutation chez le donneur amène à son exclusion du don. Au terme de la sélection, en tenant compte des donneurs qui ne vont pas jusqu'au terme de la démarche et notamment de la nécessité d'effectuer un contrôle des sérologies 6 mois après le dernier don, seuls 60 % des donneurs sont validés pour le don (4).

Prise en charge des couples demandeurs

Appariement couple receveur-donneur

L'attribution des dons pour chaque couple demandeur est réalisée par l'équipe médicale, avec pour principe de respecter l'ethnie d'origine, les principales caractéristiques morphologiques du couple demandeur (couleur de peau, taille, poids, couleur des yeux, cheveux) et les groupes sanguins. Cet appariement, autrefois important dans la mesure où la très grande majorité des couples ne pensaient pas informer leurs enfants, devient aujourd'hui beaucoup plus relatif pour ceux plus nombreux qui ont informé leur entourage et qui pensent informer leur enfant des modalités de sa conception. La délivrance des paillettes pour chacun des couples peut varier d'un cycle sur l'autre et elle cesse pour un donneur donné dès lors que dix grossesses évolutives ont été obtenues. Ce chiffre inscrit dans la législation vise à ne pas augmenter le risque de consanguinité.

Délai de prise en charge

Au terme d'un délai d'attente variable selon les CECOS (6 à 18 mois en moyenne), le couple pourra disposer des paillettes de sperme, lesquelles pourront être utilisées soit dans un centre d'AMP contigu au CECOS, soit dans tout autre centre,

voire au cabinet d'un gynécologue sous réserve d'une expérience dans ce type de prise en charge.

Bilan gynécologique

Un bilan gynécologique préalable est indispensable, comme pour tout couple consultant pour infertilité, même si la cause de l'infertilité paraît ici évidente. On insistera sur l'importance de l'hystérosalpingographie et, en cas de doute, sur la coelioscopie qui pourrait faire poser l'indication de FIV donneur (D) d'emblée en identifiant des altérations tubaires, une endométriose, mais aussi sur le bilan hormonal et le compte des follicules antraux qui pourraient faire suspecter une insuffisance ovarienne débutante, d'autant plus fréquente que le projet de conception aura été formulé tardivement à l'approche de la quarantaine.

Quelle technique d'AMP envisager ?

Pour les inséminations, deux types sont possibles.

IAD intracervicale (IIC)

Historiquement la première technique utilisée, sa pratique tend progressivement à être abandonnée. Elle consiste simplement à déposer le contenu de la paillette décongelée (quelques minutes à température ambiante), à l'aide d'un dispositif dans la glaire endocervicale, en période préovulatoire repérée préalablement sur trois courbes thermiques. Il s'agit d'une technique très simple, évitant le monitoring de l'ovulation et le traitement de sperme préalable, donc réalisable en dehors de tout centre d'AMP.

IAD intra-utérine (IIU)

C'est aujourd'hui la technique la plus largement utilisée. Elle est associée à un monitoring de l'ovulation, pratiquée après déclenchement de l'ovulation par HCG et nécessite une préparation spermatique de type lavage ou sélection sur gradient, laquelle doit ici être adaptée au faible volume de la paillette (technique dite du mini-gradient avec deux mini-phases à 45 % et 90 % de 0,5 mL cha-

cune) et sous-entend donc un laboratoire agréé pour cette pratique.

FIV D ou ICSI D

La FIV D ne paraît licite en première intention qu'en cas de trompes altérées. Elle ne présente aucune particularité si ce n'est la préparation spermatique adaptée de la paillette comme pour l'IIU. L'ICSI D est parfois envisagée lorsque la paillette de sperme témoigne de valeurs spermatiques particulièrement basses ou après échec de fécondation en FIV D, mais il faut faire la part des problèmes liés à une mauvaise qualité ovocytaire.

Résultats de l'AMP (tableau I)

Depuis 1973, près de 50 000 enfants sont nés en France avec l'aide du CECOS.

Sur les 1 600 nouvelles demandes annuelles, toutes ne donnent pas suite à une prise en charge réelle. Au CECOS de Cochin, c'est le cas pour environ 30 % d'entre elles. Ceci témoigne qu'un certain nombre de couples abandonne, que d'autres se tournent vers l'adoption, que d'autres enfin ont réussi à concevoir en intraconjugal alors qu'ils avaient enregistré une demande d'IAD de précaution en cas d'échec d'ICSI avec leurs propres spermatozoïdes.

Inséminations

Concernant la méthode d'AMP employée, sur le bilan de la Fédération française des CECOS en 2006, nous constatons que c'est l'insémination qui a été largement privilégiée avec 5 846 cycles réalisés dont 1 246 en IIC et 4 600 en IIU. Cette dernière est aujourd'hui la plus utilisée car la plus efficace avec un taux moyen de succès par cycle (TMSC) de 18,71 % contre 13,34 % pour l'IIC. À noter que, quelle que soit la méthode utilisée, le TMSC est supérieur pour des tentatives portant sur les deuxièmes grossesses et plus, témoignant en cela de patientes ayant déjà fait preuve de fertilité (5).

Tableau I – Résultats nationaux. Don de spermatozoïdes selon la technique d'AMP (Bilan 2006, Fédération française des CECOS).

	IIC	IIU	FIV		ICSI	
			Emb. frais	Emb. décong.	Emb. frais	Emb. décong.
Nbre cycles	1246	4600	528	130	463	109
Grossesses	178	855	160	29	124	18
TMSC*	13,3 %	18,7 %	30,3 %	22,3 %	26,8 %	16,5 %
FCS	21,9 %	15,1 %	24,3 %		17,6 %	
Accouchements	140	698	126		96	
Acc. simples	131 (93,5 %)	605 (86,6 %)	101 (80,1 %)		76 (79,1 %)	
Gémellaires	9 (6,5 %)	89 (12,7 %)	25 (19,8 %)		20 (20,8 %)	
Triples	0	4 (0,5 %)	0		0	
Malformations	1 (0,7 %)	12 (1,5 %)	1 (0,7 %)		3 (2,6 %)	

*TMSC : Taux moyen de succès par cycle.

L'IIC, si elle est simple et peu coûteuse, est logiquement de moins en moins pratiquée en raison d'une efficacité moindre globalement. Mais certains cliniciens la réservent judicieusement à des patientes sélectionnées *a priori* comme très fertiles (femmes jeunes, bilan parfait, homme azoosperme) où elle permet d'obtenir des grossesses avec une moindre médicalisation (peu ou pas stimulées) et un très faible risque de grossesse multiple. L'IIU est certes plus efficace mais plus lourde et avec un risque de grossesse multiple non négligeable (12,7 %) qui incite à ne pas stimuler au-delà de 2 ou 3 follicules matures au maximum.

Au-delà du TMS, il faut considérer le taux moyen de succès cumulé sur « n » cycles successifs, qui montre que ce taux croît jusqu'à 6 cycles en IIU. Au-delà, en cas d'échecs, il vaut mieux envisager de recourir à la FIV D.

FIV D et ICSI

La FIV D est encore plus efficace avec un TMS/transfert frais de 30,3 % et un TMS global/tentative (transferts embryons frais + congelés) de 35,8 % ; mais au prix d'une prise en charge encore plus lourde et un risque de grossesse multiple encore supérieur (19,2 % de grossesses gémellaires) ; sans compter quelques probables grossesses triples réduites et le fait de ne pouvoir répéter les tentatives successivement.

Concernant l'ICSI, si elle a un temps été réservée aux échecs de FIV D, elle est aujourd'hui pratiquée autant utilisée que la FIV D avec 463 tentatives contre 528 FIV D. Certaines équipes, en effet, en cas de passage à la FIV après échec d'IIU pratiquent désormais uniquement des ICSI D. Ceci permet notamment d'assurer un taux de fécondation correct lorsque la qualité de la paillette est moindre. Le TMS global/tentative (embryons frais + congelés) ici de 30,6 %, inférieur à celui obtenu en FIV D témoigne cependant que pour un certain nombre d'équipes, le recours à l'ICSI D intervient plutôt après un échec de FIV D, ce qui intègre des situations probablement de moindre qualité oocytaire.

Rôle des valeurs spermatiques des paillettes de sperme congelé et de la stérilité féminine dans l'obtention des résultats

Les résultats sont évidemment influencés par la qualité des paillettes attribuées aux couples (6). Normalement, seuls les éjaculats des donneurs permettant d'obtenir des paillettes contenant plus de 2×10^6 spermatozoïdes mobiles sont retenus pour le don.

La fertilité féminine, notamment l'âge, influence aussi directement les résultats. En atteste déjà la constatation faite précédemment de l'obtention de taux de grossesses supérieur chez des femmes ayant déjà fait preuve de fertilité pour une première gros-

sesse et qui sont traitées pour une demande ultérieure, et ce quelle que soit la technique utilisée.

De même, l'âge des patients apparaît comme un facteur qui abaisse considérablement les chances de succès et ce là aussi, quelles que soient les techniques utilisées. Schwarz et Mayaux (7) avaient déjà signalé en 1982 un taux de succès cumulé décroissant en fonction des différentes classes d'âge (< 30 ans, 31 à 35 ans, ≥ 36 ans). Par ailleurs, nous avons pu vérifier à Cochin que pour des femmes débutant un traitement après 40 ans, le taux d'accouchement global n'a été que de 1,3 % toutes techniques confondues. De façon plus détaillée, ce même taux d'accouchement est apparu de 4,3 % (93 cycles) à 40 ans, de 1,3 % (149 cycles) à 41 ans, de 1,6 % (123 cycles) à 42 ans et de 0 % (75 cycles) à partir de 43 ans.

Or, le risque d'envisager le recours à l'IAD trop tardivement et sans succès est d'autant plus important que les couples veulent au préalable tout tenter pour concevoir en intraconjugal, c'est donc au médecin d'y penser et d'en informer les couples.

Suivi de la qualité des grossesses résultant de la pratique du don de spermatozoïdes

Les CECOS analysent chaque année le devenir des grossesses obtenues par don de sperme. Le pourcentage de FCS n'est pas supérieur à celui constaté en AMP intraconjugale variant de 15,1 % en IIU à 24,3 % en FIV D. Le sex-ratio est maintenu.

Le risque malformatif (mineur et majeur) global sur l'ensemble des grossesses obtenues reste faible à 1,22 % en 2006.

Devenir des familles conçues par don de spermatozoïdes

Jusqu'alors, les CECOS n'ont pas réussi à réaliser un suivi systématique des couples après la naissance des enfants. Ils avaient en effet constaté que les couples, sortis de leur douloureuse histoire de stérilité, souhaitaient avant tout se fondre dans la population générale, comme pour tenter d'oublier la spécificité de leur famille. En pratique, nous revoyons surtout ceux qui souhaitent agrandir leur famille avec un nouvel enfant. Parfois, nous sommes aussi sollicités par des couples souhaitant se rassurer sur les antécédents génétiques du donneur, informations que nous pouvons donner puisque non identifiantes.

Concernant plus spécifiquement les enfants, nous ne disposons que de l'étude de Clément (8), psychologue d'un CECOS qui a réussi à interroger 21 enfants majeurs se sachant conçus par don de spermatozoïdes. À travers leur histoire qui était aussi celle du début des CECOS, ils témoignaient tous du contexte souvent difficile de la révélation de leur mode de conception, considéré comme trop tardif. Néanmoins, tous sauf deux (lesquels avaient été informés des modalités de leur conception après le décès de leur père) validaient le principe de l'anonymat et ne souhaitaient aucune rencontre avec le donneur.

Aujourd'hui, quelques enfants se sont récemment médiatisés pour dire qu'ils souhaitent obtenir des informations sur le donneur, voire son identité dans l'éventualité d'une possible rencontre, mettant donc en cause le principe de l'anonymat. Ainsi, la question du lien biologique pourtant bien relativisée par les donneurs et les couples demandeurs est aujourd'hui remise en question par quelques enfants issus de ces dons (9, 10). À l'évidence, certains couples, notamment certains pères, n'ont pas réussi à faire valider par leur enfant un autre concept des origines, non fondé sur le biologique mais sur la notion d'une transmission à travers une aventure humaine qui débute par le désir d'un homme et d'une femme, confrontés à l'impossibilité de concevoir naturellement, et qui s'appuie sur l'exercice d'une parentalité au quotidien pour aider un enfant à s'épanouir. Au total, une histoire qui évacue toute référence à celle du donneur, lequel souhaite que l'anonymat marque et garantisse la limite de son geste et ce tout en traduisant la dépersonnalisation du produit biologique qu'il donne.

La meilleure garantie pour que ces enfants puissent s'épanouir en intégrant bien la singularité de leur histoire est qu'ils puissent valider une interprétation des origines non fondée sur la représentation du donneur, et surtout que leur père soit véritablement acteur de cette paternité au quotidien et qu'il réussisse à témoigner du sens dans lequel donneurs et couples demandeurs se sont engagés.

La question de l'information est donc essentielle. Si des couples veulent encore s'engager dans un tel projet en gardant le secret sur le mode de conception, encore faut-il qu'ils puissent le vivre aussi naturellement que possible et minimiser ainsi la possibilité d'une révélation tardive et intempestive, laquelle augmenterait considérablement le risque de déstabilisation de cet enfant et le fait qu'il ne puisse valider une interprétation de sa conception non fondée sur la référence biologique.

Face à ce risque, de plus en plus de couples décident aujourd'hui d'informer leurs enfants très tôt de leur conception pour qu'ils se construisent en en connaissant la particularité. Cette ouverture est confortée par les CECOS qui leur proposent de les accompagner dans ce projet.

Jusqu'alors, les quelques enfants qui invoquent une levée de l'anonymat constituent plutôt une exception dans l'expérience des CECOS car la majorité des enfants informés et leurs familles valident le principe de l'anonymat.

La question se pose donc de savoir si la prochaine révision des lois de bioéthique en France ira dans le sens du maintien ou non d'une possible levée de l'anonymat. Néanmoins, cette possible remise en cause du principe de l'anonymat inquiète aujourd'hui aussi bien les donneurs que les couples demandeurs (11). Comme en témoigne une

enquête réalisée dans l'ensemble des CECOS courant 2006, dans l'hypothèse d'une levée de l'anonymat, près des deux tiers des donneurs renonceraient à leur geste dans cette hypothèse. Quant aux couples demandeurs, si un quart d'entre eux renonceraient alors à leur projet d'enfant, le risque est grand que ceux qui poursuivraient ce projet de famille adoptent désormais une attitude différente vis-à-vis de l'enfant : ne plus l'informer à nouveau, comme c'était le plus souvent le cas au début de la pratique des CECOS, par crainte d'une fragilisation de la position paternelle à travers la possibilité d'une demande de rencontre avec le donneur. C'est ce que semble confirmer l'expérience vécue dans un certain nombre de pays européens, le plus ancien étant la Suède (12), ou concomitamment à une raréfaction des donneurs, la pratique du don de spermatozoïdes devient de plus en plus opaque.

Conclusion

Confrontés à l'impossibilité de concevoir avec ses propres spermatozoïdes, un homme et sa compagne peuvent néanmoins envisager de concevoir une famille par don de spermatozoïdes, sous réserve que les enjeux d'une telle procréation aient bien été anticipés par les deux membres du couple, notamment la question de l'information ou non de l'enfant, et enfin qu'il y ait consensus sur l'interprétation des origines de la part des différents acteurs, y compris de la société elle-même.

Mais encore faut-il que les couples n'envisagent pas trop tardivement un tel projet, notamment sur le plan féminin à l'approche de la quarantaine, pour avoir des chances réelles de le concrétiser.

Don d'ovocytes

Le don d'ovocytes est en théorie le symétrique du don de sperme, s'appuyant sur les mêmes grands principes que sont la gratuité, l'anonymat, le don d'un couple ayant déjà eu au moins un enfant. La pratique du don d'ovocytes présente cependant de grandes différences par rapport au don de sperme, les techniques médicales mises en jeu pour sa réalisation et en particulier le prélèvement d'ovocytes et la fécondation *in vitro* étant beaucoup plus complexes.

Le don d'ovocytes est réalisé en France depuis la fin des années 1980. Initialement proposé chez les patientes en insuffisance ovarienne totale et définitive (ménopause précoce, dysgénésie gonadique-syndrome de Turner), il a vu ses indications s'élargir avec les insuffisances ovariennes débutantes et les échecs de FIV chez les « mauvaises répondeuses ». Cette situation a entraîné une augmentation importante des demandes de dons d'ovocytes, et la difficulté pour recruter les donneuses d'ovocytes

est devenue un problème crucial dans tous les centres d'AMP.

Indications du don d'ovocytes

Le don d'ovocytes doit répondre à certaines indications médicales bien définies.

Indications indiscutables

Ce sont les insuffisances ovariennes totales. Elles sont primaires ou secondaires et présentent toujours des signes cliniques évocateurs avec l'aménorrhée, les bouffées de chaleur, une biologie perturbée, avec une élévation de la FSH et une hormone anti-müllérienne (AMH) effondrée.

- Les dysgénésies gonadiques avec impubérisme, aménorrhée primaire, ont été les premières indications du don d'ovocytes : le caryotype peut mettre en évidence une anomalie, la plus fréquente étant la formule 45X0, ou syndrome de Turner. Dans ce syndrome, de nombreuses anomalies en particulier cardiaques, rénales, endocriniennes, nécessitent un bilan préconceptionnel rigoureux pour évaluer le risque lié à la grossesse.
- Les insuffisances ovariennes prématurées ou ménopause précoce : ces patientes sont réglées à la puberté mais assez rapidement s'installent les signes de l'insuffisance ovarienne. La prise de contraception œstroprogestative peut masquer l'apparition de ces symptômes et retarder le diagnostic. Elles sont souvent dites idiopathiques. Mais certaines anomalies génétiques peuvent être recherchées : le gène *FMR1*, en cas de mutation complète est responsable du syndrome de l'X fragile, caractérisé en particulier par un retard mental important ; les prémutations du gène *FMR1* peuvent quant à elles s'accompagner d'insuffisance ovarienne prématurée.

Enfin, les traitements radio- ou chimiothérapiques ainsi que la chirurgie de l'ovaire peuvent entraîner des insuffisances ovariennes.

Indications génétiques

Lorsque qu'une patiente présente un risque de transmission à l'enfant d'une maladie génétique d'une particulière gravité, le don d'ovocytes peut être proposé pour éviter ce risque de transmission. Ceci représente une faible proportion des demandes.

Insuffisances ovariennes débutantes

Les insuffisances ovariennes totales ont longtemps représenté la majorité des demandes de dons d'ovocytes ; mais les avancées dans l'évaluation de la réserve ovarienne, avec le dosage de la FSH et surtout de l'AMH, associée au compte folliculaire échographique, permettent aujourd'hui de porter le diagnostic d'insuffisance ovarienne débutante ou occulte, chez des patientes ayant encore des

cycles normaux, réguliers ou irréguliers avec une tendance au raccourcissement de la durée des cycles. Ces patientes ont apparemment une ovulation, mais de mauvaise qualité, entraînant une diminution importante de leur fertilité, et pour lesquelles il est évident que toute stimulation de l'ovulation est inutile : elles n'ont donc aucune possibilité d'accès aux techniques habituelles d'AMP, telles que l'IIU ou la FIV, car les résultats sont très mauvais ; elles sont donc aujourd'hui candidates au don d'ovocytes.

Situations plus discutables

Et enfin, nous sommes aujourd'hui de plus en plus souvent confrontés à des situations plus discutables. Ce sont les échecs de FIV en particulier chez les patientes ayant des réponses ovariennes moyennes ou faibles, et chez qui l'on recueille peu d'ovocytes. Ces « mauvaises répondeuses » sont des candidates potentielles au don d'ovocytes. Cependant, toute la difficulté réside dans la définition de ces « mauvaises répondeuses » : Peut-on retenir un seuil en termes de nombre d'ovocytes et lequel : 2 ou 4 ? Et que dire de la qualité embryonnaire ? Il y a là une réelle difficulté pour tenter de définir les limites « acceptables » pour envisager un don d'ovocytes, et il faudra trouver un compromis entre une limite haute qui permettrait à tous les échecs de FIV qui le souhaiteraient de recourir au don d'ovocytes, mais avec pour conséquences une évidente surcharge des centres pratiquant les dons, et un système qui ne pourra pas fonctionner, et une limite trop basse qui exclurait la très grande majorité des patientes, y compris celles pour laquelle le don d'ovocytes aurait été la seule chance d'avoir un enfant.

On peut prédire que ces demandes augmenteront de manière importante dans les années à venir. L'augmentation de l'âge de la femme pour avoir un premier enfant aggrave encore cette situation. Ce sont tous les centres d'AMP qui sont concernés par ce problème, et qui devront ensemble fixer les limites d'accès au don d'ovocytes, pour permettre une réelle prise en charge des couples infertiles sans tomber dans l'acharnement thérapeutique.

Donneuses

Le don d'ovocytes est soumis en France à une réglementation stricte, régie par les lois de bioéthique : les donneuses d'ovocytes sont des mères de famille, âgées de moins de 37 ans, le dont est gratuit et anonyme. De plus, la première loi de 1994 avait imposé une quarantaine de 6 mois entre le don et le transfert d'embryons, entraînant une congélation systématique des embryons. Ce système, plus strict que celui de nos voisins européens, a sûrement été un frein au développement de cette activité.

En France, tous les médias se font l'écho de la pénurie de donneuses, laquelle entraîne des délais d'at-

tente pour les couples infertiles, de 1 an à 5 ans. Ce constat incite de très nombreux couples à se tourner vers l'étranger, aidés en cela par une grande partie du corps médical, qui n'ayant pas pu créer une organisation efficiente dans notre pays, les accompagne dans ce tourisme procréatif, d'autant que le système d'Assurance maladie autorise une prise en charge d'une partie des frais occasionnés par un don à l'étranger.

Depuis août 2004, les nouvelles lois de bioéthique ont assoupli la réglementation avec en particulier la suppression de la quarantaine et donc la possibilité de réaliser des transferts d'embryons frais synchrones. Une amélioration a été constatée mais encore très insuffisante. Le manque de structures organisées, et de personnel dédié à ces activités, est en grande partie responsable de cette situation. La gratuité est un des principes essentiels en matière de dons, mais ce principe n'interdit pas une indemnisation des frais occasionnés par le don. Un décret récent du 24 février 2009 fixe clairement les conditions prises en charge de ces remboursements, qui sont réalisés ou par l'Assurance maladie, ou par l'établissement public en charge de ces dons. Il ne s'agit pas d'une indemnité forfaitaire, comme on peut le voir dans certains pays, mais d'une prise en charge de tous les frais réels engagés par la donneuse (les médicaments, les examens médicaux, les frais de déplacement ou d'hébergement, etc.) et en aucun cas la donneuse ne pourra tirer un bénéfice financier de son don. Malheureusement, ce décret reste encore très inégalement appliqué sur le territoire. Et pourtant, l'expérience de certains centres français montre qu'il est possible de faire marcher le système de don d'ovocytes en appliquant les lois actuelles (13).

Leur recrutement

En pratique, aujourd'hui plusieurs modes de recrutement sont possibles pour motiver les donneuses d'ovocytes qui, par altruisme et solidarité, souhaitent aider les couples infertiles.

Ce peut être des donneuses spontanées, qui ont reçu une information par les différents médias : ces patientes ont la chance d'avoir des enfants, et souhaitent, par solidarité, faire partager ce bonheur à celles qui en sont privées. Ce sont souvent déjà des donneuses de sang, de moelle. Mais ce souhait de donner ses ovocytes fait aussi souvent écho à une difficulté personnelle qu'elles ont vécue : ayant eu à un moment donné un doute sur leur propre possibilité d'avoir des enfants, elles ont été sensibilisées à la détresse des couples infertiles. L'Agence de biomédecine a lancé, en 2008, une grande campagne d'information sur le don d'ovocytes, relayée par les médias, et même si les retombées en termes de donneuses ne sont pas immédiates, ces campagnes d'informations sont très utiles car elles sensibilisent l'opinion publique à ce problème.

Certaines donneuses sont dites relationnelles : elles ont été sensibilisées au don d'ovocytes par leur entourage, une sœur, une amie, confrontées à l'infertilité et en attente de dons d'ovocytes : les donneuses amenées par les receveuses dans le programme sont interverties et leur ovocytes sont dirigés anonymement vers d'autres receveuses. Ce système est efficace mais n'est pas suffisant, en effet, tous les couples receveurs ne peuvent pas motiver une donneuse (dans notre expérience, c'est moins de 50 % des couples en demandes de don qui nous adressent une donneuse) et ainsi seraient exclus du système. De plus, ce système peut être à l'origine de pressions psychologiques trop importantes de la part des couples demandeurs vis-à-vis de leur entourage proche, (la petite sœur ou l'amie intime), entravant la liberté individuelle dans la décision du don et créant une obligation morale contre nature. En France, ce mode de recrutement a représenté pendant longtemps le mode principal de recrutement de donneuses (plus de 80 % des donneuses en 2002).

Enfin, certaines donneuses font un don par réciprocité. Ce sont des couples, qui, ayant bénéficié d'un don de sperme pour une infertilité masculine, et après la naissance de leur(s) enfant(s), souhaitent en retour aider d'autres couples à avoir un enfant en donnant leurs ovocytes. L'adhésion des couples à ce système de réciprocité est en général excellente puisque ce sont des couples qui ont déjà acceptés psychologiquement la notion de don de gamètes pour eux-mêmes, la démarche inverse de donner devient alors assez naturelle.

Pratique du don pour la donneuse d'ovocytes

La démarche de la donneuse d'ovocytes est contraignante et nécessite une grande disponibilité. L'équipe médicale qui prend en charge ces donneuses doit en avoir conscience et tout faire pour simplifier leur parcours et minimiser les contraintes liées au traitement : c'est l'équipe médicale qui est à la disposition de la donneuse et non l'inverse.

Le bilan préalable est une étape importante dans la gestion du don d'ovocyte : il a pour but de sélectionner les donneuses, en répondant à deux exigences, d'une part préserver les intérêts de la donneuse, d'autre part prendre en compte les intérêts du couple receveur et au-delà ceux de l'enfant à venir.

Préserver l'intérêt de la donneuse

Donner ses ovocytes en passant par une stimulation de l'ovulation et une ponction ovarienne est nécessairement une démarche intrusive tant médicalement que psychologiquement. Tout doit être mis en œuvre pour s'assurer que la candidate donneuse, qui fait preuve de beaucoup de générosité et de courage, puisse assumer ce don en toute sécurité.

L'entretien avec une psychologue permet de mieux préciser les motivations réelles de la donneuse et de dépister les éventuelles pressions extérieures qui feraient que le don n'ait pas été librement consenti. Sélectionner des donneuses mères de familles vivant en couple et dans le respect de l'anonymat permet de diminuer ces risques ; cependant, il faut rester particulièrement vigilant au vécu de ces patientes et savoir récuser une donneuse, sans la culpabiliser, si on la perçoit réticente et fragile. La pénurie de donneuses ne justifie pas d'ignorer cet aspect et l'entretien psychologique, mais aussi l'avis de toute l'équipe médicale, sont donc d'une grande importance pour la réussite de ce don.

Il serait éthiquement inacceptable de faire courir un risque médical chez une donneuse, surtout si celui-ci est prévisible. Or, on sait aujourd'hui identifier certaines situations à risque : c'est le cas de la dystrophie ovarienne qui présente un risque augmenté d'hyperstimulation, de la présence de foyers infectieux (hydrosalpinx ou collections liquidienues) qui peuvent être réveillés par la ponction ovarienne, de troubles de la coagulation qui augmentent le risque hémorragique.

La consultation préalable avec le gynécologue doit permettre de dépister ces risques qui deviennent alors des contre-indications au don.

Préserver l'intérêt des receveuses

La prévention du risque de transmission de maladies graves de la donneuse à la receveuse ou à l'enfant est une évidence dans le don d'ovocyte, comme pour tous les dons. Un bilan sérologique est réalisé systématiquement au moment du don d'ovocytes, et est identique à celui du don de sperme. Il concerne la syphilis, les hépatites C et B, le VIH, le cytomégalo-virus : et un appariement sera réalisé entre donneuse et receveuses en fonction du CMV. Le bilan génétique, avec caryotype et entretien avec un généticien, doit être réalisé systématiquement et permet de dépister des donneuses à risque pour l'enfant.

Être efficace

Le but du don d'ovocytes étant l'obtention d'une grossesse, il est logique de chercher à sélectionner les « bonnes donneuses » offrant un maximum de chances de succès.

L'âge de la donneuse est un critère très important puisqu'il est démontré qu'il influence directement les résultats d'une FIV. Après 38 ans, le nombre et la qualité des ovocytes recueillis diminuent, entraînant une chute des taux de succès et une augmentation du risque d'avortements spontanés et d'anomalies fœtales : 37 ans paraît donc un âge limite pour l'inclusion d'une patiente dans un programme de dons d'ovocytes.

Le bilan hormonal avec dosage de FSH et de l'AMH à j3 est un bon reflet de la réserve ovarienne et per-

met de dépister les « mauvaises répondeuses ». Un taux de FSH élevé (à définir en fonction des normes du laboratoire) ou un taux d'AMH effondré (inférieur à 1ng/ml) est donc a priori une contre-indication au don d'ovocytes.

La sélection d'une donneuse est une étape essentielle dans la gestion du don d'ovocyte, elle nécessite la participation d'une équipe multidisciplinaire avec gynécologue, psychologue, généticien, biologiste et anesthésiste, permettant ainsi de préserver l'intérêt des différents participants : la donneuse, la receveuse et l'enfant à venir.

Au terme de ces examens le don d'ovocytes pourra avoir lieu : il s'agira d'un protocole classique de FIV, avec stimulation de l'ovulation et surveillance échographique et hormonale, suivi d'un prélèvement d'ovocytes par ponction ovarienne sous anesthésie : en moyenne, une ponction d'ovocytes permet de recueillir huit à dix ovocytes qui pourront être attribués à deux ou trois receveuses.

Prise en charge des couples receveurs

Les couples en attente de dons sont habituellement adressés par leur gynécologue qui a déjà réalisé tout le bilan féminin. Les consultations médicales préalables au don permettent d'authentifier l'indication, d'expliquer la méthode et les modalités pratiques, de faire le bilan médico-psychologique du couple.

Sont ainsi réalisés entretiens psychologiques, examens cliniques avec relevé des caractères physiques et de groupes sanguins, ainsi que les sérologies du couple. Pour la patiente, une appréciation de la cavité utérine et de la qualité endométriale avec ou sans traitement œstrogénique de substitution, et pour le conjoint un bilan spermatique qui orientera le choix de la technique à utiliser FIV ou ICSI.

Le couple doit aussi se soumettre aux obligations législatives à savoir, avoir plus de 2 ans de vie commune ou être marié, et avoir consenti au don devant un juge (Président du tribunal de Grande Instance) ou devant le notaire.

Il y a toujours un délai d'attente qui peut varier en France de 1 à 4 ans en fonction des centres, et habituellement les couples qui ont pu aider au recrutement d'une donneuse verront leur délai d'attente raccourci de quelques mois. (Si tous les couples adressaient une donneuse, il n'y aurait plus de délai d'attente...)

Au moment du don, il est réalisé un appariement de la donneuse au couple receveur, qui portera sur les caractéristiques ethniques puis morphologiques puis les groupes sanguins. Cet appariement est souvent difficile en matière de dons d'ovocytes, et les couples sont informés et interrogés sur leur souhait. La majorité d'entre eux ayant décidé de

révéler à l'enfant son mode de conception n'exigent pas d'appariement strict.

Lorsqu'une donneuse est attribuée à un couple, dès le début de la stimulation, la receveuse reçoit un traitement œstroprogestatif pour synchroniser son cycle par rapport à celui de la donneuse. Cette synchronisation permet le transfert d'embryons frais, autorisée depuis 2004, du fait de la suppression de la quarantaine. La préparation de l'endomètre au transfert nécessite 10 à 15 jours de traitement par l'œstradiol dosé à 4 à 6 mg, suivi d'une association œstradiol 6 mg-progestérone 600 mg, et le transfert est réalisé 2 ou 3 jours plus tard. En cas de grossesse, le traitement est poursuivi 2 à 3 mois.

Le jour du don, la ponction d'ovaire permet le recueil de plusieurs ovocytes qui seront immédiatement mis en FIV avec les spermatozoïdes du conjoint de la receveuse. Deux ou trois jours plus tard, les embryons obtenus pourront être transférés dans l'utérus de la receveuse. La plupart des centres proposeront un minimum de quatre à six ovocytes pour les receveuses provenant d'une ou de deux donneuses. Les transferts embryonnaires seront limités à un ou deux embryons maximum, en fonction de la stratégie des centres mais aussi de la situation particulière des receveuses : ainsi, il est admis aujourd'hui que le transfert monoembryonnaire doit être la règle chez les patientes turnériennes. La congélation embryonnaire peut donc aussi être proposée si plusieurs embryons sont obtenus et transférés ultérieurement en cas d'échec.

Résultats (tableau II)

Le nombre exact de demandes de don d'ovocytes est inconnu en France, les patientes adressées dans les centres agréés (600 à 700 par an) ne représentant qu'une partie des demandes puisque l'on sait que de nombreuses patientes partent à l'étranger. En revanche, il est évident que le nombre de demandes augmente de manière importante, et celle-ci est essentiellement due à l'augmentation des demandes pour insuffisance ovarienne débutante ou échecs de FIV, ces deux derniers groupes représentaient moins de 20 % des demandes en 2004 et ont atteint 60 % en 2008 (14).

Le nombre de femmes qui font une démarche en vue d'un don d'ovocytes est de l'ordre de 500 mais toutes les candidates donneuses n'iront pas

jusqu'au bout de leur démarche. Un certain nombre d'entre elles vont abandonner, en général du fait d'un manque de motivation. D'autres vont être refusées, après les examens complémentaires, pour cause génétique ou pour insuffisance de leur réserve ovarienne. Au total, 50 à 60 % des candidates pourront réaliser un don.

Le nombre de prélèvements d'ovocytes en France est donc faible et confirme le manque de donneuses. En 2004, on comptait 150 donneuses dans les centres français, alors qu'il y en avait plus de 1 000 en Grande-Bretagne et plus de 8 000 en Espagne. Les chiffres récents montrent une amélioration, avec 168 ponctions en 2005, 228 en 2006, et 247 en 2007, mais bien loin de la demande : on estime entre 1 000 et 2 000 le nombre de donneuses nécessaires pour satisfaire la demande.

Les résultats en termes de grossesse par transfert, d'accouchement par grossesse, sont équivalents à ceux obtenus en AMP intraconjugale. On peut cependant remarquer que les receveuses ne reçoivent qu'un nombre limité d'ovocytes, de l'ordre de 4 à 5, ce qui à l'évidence ne peut que limiter leurs chances de grossesses : en 2007, moins de 30 % des couples demandeurs de dons d'ovocytes ont obtenu un enfant. Il faudrait pouvoir doubler ou tripler le nombre d'ovocytes pour arriver à un résultat satisfaisant.

Enfin, on peut aussi observer qu'un don d'ovocyte permet en moyenne la naissance de 0,5 enfant et que la plupart des donneuses ne font qu'une seule ponction. Le « rendement » du don d'ovocytes est donc beaucoup plus faible que celui du don de sperme : un donneur de sperme est à l'origine en moyenne de quatre à cinq enfants (mais il s'agit de millions de spermatozoïdes, *versus* une dizaine d'ovocytes !). Pour un même nombre de demandes, il faudrait dix fois plus de donneuses d'ovocytes que de donneurs de sperme.

Vécu psychologique

Le don d'ovocytes, qui est en théorie la symétrique du don de sperme, présente à l'évidence des différences fondamentales tant dans sa mise en œuvre que dans son vécu.

C'est surtout le vécu de ce don d'ovocyte qui montre de grandes différences avec le don de sperme. Car, dans la situation d'infertilité d'origine féminine, s'il est vrai que les femmes infertiles peuvent ressentir la même souffrance, la même frustration que les hommes dans leur difficulté à concevoir, elles éprouvent beaucoup moins ce sentiment de dévalorisation, car chez la femme la dissociation entre stérilité et sexualité est un concept acquis dans nos sociétés : la contraception crée déjà une telle dissociation. De plus, le recours à un don d'ovocyte qui permet à la femme d'avoir un enfant lui permet aussi et surtout de passer du statut de

Tableau II – Résultats nationaux. Don d'ovocytes (bilan 2007, Agence de la biomédecine).

Nombre de donneuses ponctionnées	247
Nombre de receveuses ayant bénéficié d'un don	453
Nombre de transferts frais	424
Nombre de transferts congelés	208
Total accouchements	123

femme à celui de mère qui aura porté son enfant pendant 9 mois. Et la grossesse et l'accouchement sont de nature à faciliter l'accès à une parentalité pleinement acceptée.

Contrairement à l'infertilité masculine, l'infertilité féminine n'est le plus souvent pas cachée, et dès lors on n'observe pas la même lourdeur du secret. Les couples infertiles parlent assez librement de leur problème d'infertilité auprès de leur entourage. Et à la question « Informerez-vous votre enfant sur son mode de conception », la réponse est positive à plus de 90 %. En revanche, le maintien de l'anonymat du don d'ovocytes est souhaité majoritairement tant par les couples receveurs que par les couples donneurs, et ce sentiment est sans doute un des rares points de rencontre entre le don de sperme et le don d'ovocytes.

Accueil d'embryon

Mis en place assez récemment, c'est aussi en termes d'indication la dernière possibilité de pouvoir fonder une famille alternative par don en France.

Le législateur, sensibilisé par l'accumulation des embryons conservés dans les centres de FIV avait pourtant évoqué cette possibilité dès la première législation de 1994, mais le retard de la sortie du décret d'application en 1999 atteste des difficultés rencontrées pour concevoir son organisation. La loi précise une mise en œuvre à titre exceptionnel, témoignant qu'elle ne peut être proposée qu'en dernier recours, après échec de l'AMP intraconjugale, puis de l'AMP avec don de gamètes. Rappelons qu'il est interdit en France de concevoir en FIV des embryons dont l'un au moins des deux gamètes n'appartient pas au couple.

Au final, les dispositions prévues par la loi, notamment la nécessité d'une décision judiciaire rapprochent plus l'accueil d'embryons de l'adoption que du don de gamètes (15). Cette technique, relatée la première fois par Trounson en 1983, est la conséquence directe de la pratique de la FIV qui amène à concevoir des embryons dits « surnuméraires » congelés pour qui se pose la question de leur devenir. Lors des relances annuelles pratiquées par les centres d'AMP, la majorité des couples qui n'ont plus de projet parental se prononcent pour leur destruction et seulement un faible nombre ($\approx 15\%$) souhaitent les donner en vue d'accueil par un autre couple. D'autres, enfin, ne répondent même plus aux courriers, probablement dans l'incapacité de se prononcer sur leur devenir. Leur décision ou indécision est en fait fonction de la représentation qu'ils se font de cet embryon : pour certains, simple produit biologique, constitué de quelques cellules qui ne peut prendre dimension humaine sans la volonté du couple d'origine de vouloir concrétiser un projet d'enfant, pour d'autres au contraire

déjà un être humain en devenir dont la destruction pose problème.

En pratique, comme dans le don de gamètes, seuls des établissements publics ou privés à but non lucratif autorisés à cet effet peuvent conserver les embryons destinés à être recueillis et mettre en œuvre la procédure d'accueil. L'accueil d'embryon n'est ainsi rendu possible en France que depuis novembre 2001, date de la parution des premiers centres agréés, au nombre de 20 actuellement. Les centres d'AMP non agréés doivent remettre les embryons cédés en vue d'accueil à un centre agréé.

Indications

D'après la loi : « à titre exceptionnel, un couple pour lequel une AMP sans recours à un tiers donneur ne peut aboutir peut accueillir un embryon ». Sur cette interprétation, et en tenant aussi compte du très faible nombre d'embryons cédés en vue d'accueil, l'accueil d'embryons semble devoir être proposé.

- En cas d'impossibilité de procréer au sein du couple :
 - surtout face à une double stérilité masculine et féminine : azoospermie et insuffisance ovarienne ;
 - de façon plus relative face à une infertilité inexplicable sans argument objectif en faveur d'une cause masculine ou féminine en général après échecs multiples, notamment en FIV-ICSI, avec une fécondance perturbée, des échecs d'implantation répétés sans qu'un facteur utérin puisse être invoqué, parfois avec constatation d'une mauvaise qualité embryonnaire répétée à plusieurs tentatives.
- En raison d'un risque génétique particulier :
 - soit parce qu'il est impliqué chez les deux partenaires, soit en raison d'une incertitude sur le mode de transmission de la pathologie, ailleurs par l'association d'une stérilité chez l'un et d'un risque génétique chez l'autre.

Couples donneurs

En fonction d'une certaine représentation de l'embryon déjà évoquée, ils ne peuvent envisager simplement sa destruction, car ne souhaitent pas interrompre la dynamique de vie qui les avait fait concevoir. Conscients par ailleurs de leur chance d'avoir pu concrétiser leur projet parental, ils souhaitent leur offrir une chance de vie à travers d'autres couples. Cette décision suppose l'accord des deux membres du couple, notamment en cas de séparation et de divorce, sauf en cas de décès de l'un des deux membres du couple.

Les conditions qui régissent l'accueil d'embryons, sont identiques à celles du don de gamètes : il s'agit d'un acte gratuit, bénévole et anonyme. Mais

contrairement au don de gamètes, il n'est pas exigé du couple donneur qu'il ait déjà un enfant. Le couple ayant consenti à l'accueil de ses embryons ne pourra connaître leur devenir, notamment le fait qu'il y ait eu ou non grossesse suivie d'une naissance.

Parcours du don

Il intègre un entretien avec l'équipe clinicobiologique pour information des modalités de l'accueil et de ces implications et prévoit un entretien psychologique.

Seront pris en compte : la situation d'infertilité à l'origine de la conception des embryons, les antécédents médico-chirurgicaux du couple et de leurs familles afin de considérer un éventuel facteur de risque au plan génétique. Mais vouloir écarter un facteur de risque génétique dans le cadre de l'accueil d'embryon s'avère un objectif beaucoup plus complexe que dans le don de gamètes. En effet, les donneurs de gamètes retenus sont de principe en bonne santé et surtout ont conçu naturellement alors que les embryons proviennent d'une population subnormale sur le plan de la fertilité et sont donc susceptibles de porter une pathologie génétique spécifique. En pratique, concernant le risque génétique, les CECOS ont donc formulé un certain nombre de recommandations (16) :

- informer systématiquement les couples candidats à l'accueil d'embryon d'un risque potentiel lié non seulement à l'infertilité du couple donneur mais aussi à l'AMP ;
- obtenir l'indication de la FIV initiale dont on sait que certaines ont un contexte génétique (infertilité masculine notamment) et vérifier que les examens génétiques en rapport ont été réalisés ;
- exclure les embryons dont le risque génétique identifié est élevé (anomalie de structure équilibrée, faible degré de mosaïsme autosomique, microdélétion de l'Y, en cas de recommandation d'un diagnostic prénatal ou préimplantatoire, en cas de connaissance d'une mutation du gène *CFTR*) ;
- faire si possible un appariement couple donneur receveur selon l'âge, sinon informer le médecin chargé du suivi de la grossesse de l'âge de la donneuse.

Les résultats du bilan infectieux qui a précédé la tentative d'AMP, pour le VIH, VHB, VHC, et la tréponématose des deux membres du couple peuvent être vérifiés *a posteriori* :

- l'entretien psychologique s'assure des motivations des deux membres du couples, notamment qu'ils sont bien en phase sur la représentation des embryons et des enfants qui pourraient en être issus, aborde leur vécu du principe de l'anonymat et s'ils ont prévu ou non d'informer leurs propres enfants de ce don ;
- les caractéristiques morphologiques, l'ethnie d'origine et les groupes sanguins des deux mem-

bres du couple afin de permettre un appariement avec des couples receveurs, sera de fait beaucoup plus relatif que pour le don de gamètes.

Au terme de cette enquête initiale, les embryons seront validés ou non pour l'accueil. L'enquête génétique représente un point sensible de la décision puisque susceptible d'exclure du don des embryons bien qu'ils aient été initialement validés chez les couples qui sont à leur origine. Dans ce cas, restera à expliquer au couple le principe selon lequel il paraît difficile d'attribuer à un couple des embryons tout en évoquant un éventuel facteur de risque, bien que celui-ci ait été pris par le couple donneur. Ce point, d'ordre éthique, pourrait d'ailleurs être discuté.

En cas de validation des embryons pour le don, un formulaire de consentement, en triple exemplaire, est alors remis au couple, lequel devra le remettre à l'équipe après un délai de réflexion de 3 mois. Il pourra alors être adressé au TGI dont dépend le centre d'AMP, TGI dont le président a, pour donner son accord, la possibilité éventuelle de convoquer le couple. Le renvoi de deux exemplaires du consentement au centre d'AMP validera les embryons pour l'accueil. Le centre procèdera alors à l'anonymisation des paillettes.

Prise en charge des couples receveurs

Après s'être assuré de la pertinence de l'indication au plan médical, il reste à s'assurer que le couple a bien anticipé toutes les questions relatives à un tel projet à l'occasion d'un ou plusieurs entretiens psychologiques. Seront notamment abordés le fait de vouloir ou non informer l'enfant des modalités de sa conception ainsi que la question et les conséquences possibles de chacune de ces stratégies. Proposition leur sera faite d'un suivi au-delà de la naissance pour réaborder cette question.

L'acceptation du couple à cette indication par l'équipe médicale leur permettra d'obtenir le consentement du Président du TGI, dont dépend le couple, « qui fait procéder à toutes investigations permettant d'apprécier les conditions d'accueil que ce couple est susceptible d'offrir à l'enfant à naître sur les plans familial, éducatif, et psychologique ». La filiation de cet enfant est alors comparable à celle établie en AMP avec don de gamètes, comme si le couple avait procréé naturellement.

Mise en œuvre d'une tentative de transfert

Tout à fait comparable à celle utilisée habituellement pour les transferts d'embryons congelés, elle suppose de s'assurer au préalable de la muqueuse la plus adéquate, optimisée le plus souvent, soit par œstrogènes, soit par stimulation douce par gonadotrophines avec contrôle hormonal et échographique. Dans la mesure où seuls les embryons provenant d'un même couple peuvent être trans-

férés sur une tentative, si un appariement ne permet de disposer que d'un ou deux embryons, il importe de prévoir un deuxième appariement au cas où aucun embryon du premier ne résisterait à la décongélation.

Résultats

Les chances de succès paraissent comparables, voire un peu supérieures, aux taux de grossesses obtenues après transfert d'embryons congelé en AMP traditionnelle puisque les embryons transférés proviennent dans la majorité des cas de couples ayant obtenu au moins une grossesse avec des embryons de la même tentative (17). Mais il sera intéressant d'en analyser les résultats en fonction des indications sur des séries plus importantes.

Devenir de ces familles

Faute de recul suffisant, nous ne pouvons pas préjuger du devenir des familles et des enfants ainsi conçus. L'expérience du don de gamètes n'est pas transposable car l'accueil d'embryon ne lui est absolument pas comparable. Ce dernier part d'un projet parental avec des embryons conçus et investis comme des enfants potentiels et ce n'est que secondairement qu'ils sont désinvestis de ce sens. Ils n'ont donc pas été conçus dans un geste altruiste initial. Enfin, la rupture de la filiation a lieu ici non pas avant la fécondation comme dans le don de gamètes mais après celle-ci.

Les conséquences de ce don paraissent donc nettement plus complexes que celles envisagées dans le don de gamètes et ne nous paraissent pas toujours anticipées tant par les couples donneurs que receveurs.

- Ceux qui donnent informeront-ils leurs propres enfants et, si oui, trouveront-ils les mots nécessaires pour leur permettre de relativiser l'existence de frères et sœurs biologiques ?
- De même, ceux qui accueillent informeront-ils leurs enfants et comment alors raconter une histoire aussi complexe et faire en sorte qu'elle ne soit pas perçue comme un abandon. La règle de l'anonymat, ici aussi prévue par la loi, pourra-t-elle être comprise et surtout admise par les enfants. La question des origines se pose ici avec une particulière acuité. Ces enfants ne seront-ils pas tentés, beaucoup plus souvent que dans le don de gamètes, d'essayer d'obtenir des informations sur les géniteurs mais aussi sur leurs enfants, frères et sœur biologiques ?

Pour les centres autorisés à cette activité, serait-il judicieux qu'ils gardent des informations sur les couples donneurs et si oui quelles informations ?

Conclusion

L'accueil d'embryon tel qu'il a été conçu au plan légal offre une possibilité aux couples qui ne peuvent se

résoudre à la destruction de leurs embryons et ce peut être une opportunité de fonder une famille pour des couples en échec de toutes les autres techniques d'AMP. Mais à quel prix, vu la complexité des questions posées à l'ensemble des acteurs et notamment aux enfants pour qui la question des origines devrait être d'interprétation encore plus délicate que pour ceux conçus par don de gamètes. En pratique, le nombre très faible de couples qui font le choix de donner limite considérablement cette dernière possibilité de fonder une famille alternative.

Conclusion générale

Confrontés à l'impossibilité de concevoir avec leurs propres gamètes, les couples peuvent désormais envisager de fonder une famille par don de gamètes ou don d'embryons.

Le don de spermatozoïdes et le don d'ovocytes sont régis par les mêmes principes, mais le don d'ovocytes en diffère beaucoup par sa pratique avec une technicité beaucoup plus lourde, intrusive, et non sans risque pour les donneuses, ce qui explique un recrutement beaucoup plus difficile et actuellement insuffisant pour satisfaire la demande en France. L'accueil d'embryon nous semble poser des questions encore plus complexes, notamment sur la sélection des embryons susceptibles d'être accueillis.

Toutes ces techniques qui supposent, tant pour les couples donneurs que les receveurs, de pouvoir relativiser la participation biologique à la conception d'un enfant, posent néanmoins la question du devenir de ces familles. Les enfants notamment pourront-ils tous valider un concept des origines non fondé sur le biologique et reposant sur le principe de l'anonymat ? Ces interrogations ne se posent-elles pas avec une particulière acuité pour ceux conçus par accueil d'embryons ?

Il nous paraît aujourd'hui important d'inciter ces couples à accepter un suivi au-delà de la naissance afin de les aider au mieux à gérer des situations qui pourraient être difficiles.

Références

1. David G (1985) Don et utilisation du sperme. In : Actes du colloque Génétique. Procréation et Droit. Paris, Actes Sud, Hubert Nyssen : 203-24
2. David G (1991) L'insémination artificielle et le système CECOS : In l'insémination artificielle. CECOS. Paris, Masson : 1-20
3. Guibert J, Leruez-Ville M, Dulioust E *et al.* (2008) Aide médicale à la procréation chez les personnes infectées par le VIH. *Presse Med* 37: 998-1006
4. Le Lannou D, Thepot F, Jouannet P (1998) Multicentre approaches to donor insemination in the French CECOS Federation: nationwide evaluation, donor matching, screening for genetic diseases and consanguinity. *Hum Reprod* 13: 35-49

5. Le Lannou D, Gestard E, Guivarch A *et al.* (1995) Strategies in frozen donor procreation. *Hum Reprod* 10: 1765-74
6. David G, Czyglik F, Mayaux MJ *et al.* (1980) The success of AID and semen characteristics: Study on 1489 cycles and 192 ejaculates. *Int J Androl* 37: 613-19
7. Schwartz D, Mayaux MJ (1982) Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *N Engl J Med* 306 : 404-5
8. Clement JL (2006) Mon père, c'est mon père. L'histoire singulière des enfants conçus par insémination artificielle avec donneur. Paris, L'Harmattan
9. Mehl D (2008) Enfants du don. Paris, Robert Laffont, Collection Le Monde comme il va
10. Delaisi De Parseval G, Verdier P (1994) Enfant de personne. Paris, Odile Jacob
11. Kunstmann JM (2008) L'Assistance Médicale à la Procréation avec tiers donneur: remise en cause de l'anonymat ? In : Procréation médicalement assistée et anonymat. Panorama international. Paris, Bruylant. Collection Droit, Bioéthique et Société: 1-37
12. Burrell R (2005) Assisted reproduction in the Nordic Countries. A comparative study of policies and regulation. Nordic Committee on Bioethics. <http://www.norden.org>
13. Le Lannou D (2010) Pour un don d'ovocytes à la française ? *Gynecol Obstet Fertil* 38: 23-9
14. Letur-Kornirsch H (2004) Don d'ovocyte en France et bilan national (GEDO); Dispositions différentielles européennes. *Gynecol Obstet Fertil* 32: 108-15
15. Jouannet P, Chalas C, Fauque P *et al.* (2006) Don de gamètes et accueil d'embryons. *Rev Prat* 56: 520-6
16. Siffroi JP et Commission génétique Française des CECOS (2005) Indications et contre-indications génétiques à l'accueil d'embryon. *Gynecol Obst Fertil* 33: 698-702
17. Bettahar-Lebugle K, Wittember C, Firtion C *et al.* (2007) L'accueil d'embryon en France : pratiques et difficultés. L'expérience de Strasbourg. *Gynecol Obstet Fertil* 35: 114-20

VI Autour de la fertilité, de l'infertilité et de l'AMP

C. Uzan, S. Gouy,
C. Lhommé, P. Pautier,
P. Duvillard, C. Haie-Meder
et P. Morice

Procréation médicalement assistée après cancer gynécologique

Introduction

La prise en charge d'une infertilité après cancer est souvent délicate. Le désir de grossesse traduit souvent une volonté de retrouver « une vie normale », et devoir en repasser par le milieu médical est mal vécu par les patientes. Concernant les tumeurs pelviennes, la question doit se poser en amont, dès la prise en charge initiale pour savoir quelles sont les possibilités de préservation de la fertilité. L'âge moyen lors de la première grossesse est en France de 29 ans et les grossesses tardives sont de plus en plus fréquentes, aussi la question d'une préservation de la fertilité se pose de plus en plus souvent chez les patientes atteintes d'un cancer gynécologique. Passé le choc de l'annonce du cancer, le clinicien doit savoir identifier les cas où un traitement conservateur est envisageable et évoquer les différentes alternatives avec le couple, même si, trop préoccupée par le diagnostic vital, la patiente n'envisage pas ce problème. Il faut pouvoir exposer les risques de récurrence en cas de traitement conservateur et l'impact d'éventuelles récurrences sur la survie. Par ailleurs, il faut loyalement informer sur les résultats en termes de taux de grossesse et d'enfant vivant, ainsi que sur les possibilités et les limites de la procréation médicalement assistée (AMP) dans ce contexte particulier. Nous évoquerons successivement les différents cancers gynécologiques où un traitement chirurgical conservateur est envisageable et quelles en sont les chances de succès en terme de conception. Pour les tumeurs hormono-dépendantes (sein, ovaire, endomètre), l'usage de stimulation ovarienne demeure discuté et le couple doit être informé de potentiels risques de récurrence lié à l'utilisation de ces traitements. Seront décrits successivement les possibilités de traitement conservateur et d'AMP dans les différents cancers gynécologiques.

Tumeur *borderline* de l'ovaire

Les tumeurs *borderline* (ou tumeur ovarienne frontière) représentent 10 à 20 % de l'ensemble des

tumeurs malignes de l'ovaire. Le pic d'incidence est de 40 ans, se pose donc la problématique du traitement conservateur. Le pronostic de ces lésions est excellent : elles sont souvent diagnostiquées au stade I (80 %), le risque de récurrence est relativement faible et accessible à une chirurgie de rattrapage alors que l'évolution sous une forme invasive reste rare. Le diagnostic histologique en extemporané n'est pas toujours facile, ce qui expose les patientes au risque d'une deuxième intervention.

Le traitement non conservateur d'une tumeur *borderline* consiste chez une femme non désireuse de grossesse en une cytologie péritonéale, une hystérectomie avec annexectomie bilatérale, une omentectomie infra-colique et des biopsies péritonéales. Le risque de récurrence est alors d'environ 5 %. Pour les tumeurs mucineuses, une appendicectomie est également recommandée. Le traitement conservateur repose sur la conservation de l'utérus et d'au moins une fraction d'un ovaire mais impose l'ensemble des autres gestes nécessaires à la stadification. Selon les auteurs, le taux de traitement conservateur varie de 12 % à 56 % (1). Pour les patientes présentant une tumeur *borderline* ovarienne unilatérale, le traitement consiste le plus souvent en une annexectomie. En cas de traitement conservateur avec annexectomie, le risque de récurrence est d'environ 15 %, par contre en cas de kystectomie, il s'élève aux alentours de 30 % (1). En cas de tumeur *borderline* bilatérale, une annexectomie du côté de la lésion la plus volumineuse et une kystectomie du côté opposé sont proposés. Palomba *et al.* (2), dans ces cas de tumeurs bilatérales, ont comparé la kystectomie bilatérale à l'annexectomie unilatérale associée à la kystectomie contralatérale et retrouvaient un délai de récurrence et un taux de récurrence plus élevé pour le groupe kystectomie bilatérale mais un délai d'obtention de grossesse plus court. Les données concernant l'usage de l'AMP sont encore insuffisantes. Dans certains cas, les lésions occupent la plus large partie des deux ovaires et une annexectomie bilatérale peut s'avérer nécessaire. La patiente doit être préve-

nue de ce risque et une éventuelle cryopréservation ovarienne peut être proposée. Sur le tissu ovarien retiré, si est identifiée une zone de tissu sain, elle peut être cryopréservée. Le nombre de cas publiés de grossesse est encore très limité et, à ce jour, aucune de ces grossesses post-cryopréservation n'était après tumeur *borderline*. Pour l'instant, des patientes atteintes de tumeur *borderline* ont été cryopréservées mais nous n'avons pas encore de cas de grossesse après réimplantation (3). Toutefois, dans les cas de patientes jeunes, aucune possibilité de développement futur des techniques ne doit être négligée et une consultation spécialisée avant chirurgie doit être organisée pour expliquer les possibilités mêmes limitées de préservation de la fertilité. Encore une fois, peu d'études sont disponibles pour apprécier l'effet d'une AMP après traitement conservateur d'une tumeur *borderline* mais les études *in vitro* sont plutôt encourageantes (4). En cas d'implants péritonéaux (stade III), le traitement conservateur est possible mais le risque de récurrence est plus élevé : dans une série réalisée sur les cas traités à l'institut Gustave-Roussy, sur 41 patientes, 22 ont récidivé. La stimulation est encore plus discutable, notamment s'il s'agit d'implants invasifs, un cas de progression tumorale rapide sur un mode invasif a été décrit (5) et sur huit patientes stimulées avec stade avancé à l'IGR, cinq ont récidivé après stimulation. Ces cas doivent être discutés au cas par cas, en réunion multidisciplinaire, le nombre de cycle doit être limité et un second *look* peut se discuter avant d'entamer une stimulation.

Tumeurs malignes de l'ovaire

Le pic d'incidence des formes épithéliales, qui sont les plus fréquentes, est de 60 ans. La problématique du traitement conservateur se pose donc plus rarement. Ces tumeurs sont souvent diagnostiquées à un stade avancé avec un pronostic réservé. Le traitement chirurgical, sauf forme très limitée de grade 1, doit être complété par une chimiothérapie. Le traitement classique du cancer de l'ovaire comporte, outre les gestes cités pour une tumeur *borderline*, une omentectomie infra-gastrique et une lymphadénectomie pelvienne et lombo-aortique. Les études française, américaine et italienne s'accordaient à juger qu'un traitement conservateur peut être proposé dans les stades IA grade 1 (tumeur limitée à un ovaire) (6). La lymphadénectomie est nécessaire pour certifier le stade précoce. Pour les grades 2 et 3, les conclusions divergent. Dans la plus large série (62 patientes) parue récemment (7), les auteurs proposaient un traitement conservateur pour les stades IA à C, grades 1 et 2. Toutes les patientes ayant eu un traitement conservateur au-delà du stade IC

ou grade 3 avaient une moins bonne survie. Les données de l'AMP chez des patientes ayant eu un traitement conservateur pour cancer de l'ovaire sont trop parcellaires pour permettre de conclure.

Pour les tumeurs non épithéliales malignes de l'ovaire (tératomes immatures, tumeurs des cordons sexuels), un traitement conservateur est réalisable et de bon pronostic pour les tumeurs de stades I et II. Les chimiothérapies utilisées pour ce type de tumeurs (à base de bléomycine, d'étoposide et de sel de platine) permettent de préserver la fonction ovarienne. Cependant, nous ne disposons pas de données suffisantes pour apprécier la fertilité après traitement conservateur.

Hyperplasie atypique de l'endomètre et cancer de l'endomètre

La classification des hyperplasies de l'endomètre demeure débattue, rendant difficile la comparaison entre les différentes séries de la littérature. Le risque d'évolution spontanée vers un carcinome varie en fonction du type d'hyperplasie et selon les auteurs (près de 40 % pour les hyperplasies complexes avec atypies). De plus, se pose le problème du risque de méconnaissance d'un carcinome lors du diagnostic d'une hyperplasie atypique de l'endomètre (17 à 52 % selon les auteurs) (8). Ces risques étant exposés à la patiente, la majorité des hyperplasies atypiques régressent sous traitement progestatif, avec cependant un risque d'évolution à cinq ans en carcinome dans 5 % des cas.

L'hyperplasie peut être diagnostiquée sur biopsie d'endomètre chez une patiente consultant pour infertilité, les données sur l'AMP dans cette situation demeurent peu nombreuses. Un suivi régulier est de toute façon nécessaire, notamment par hystéroscopie pour ne pas manquer l'évolution vers un carcinome. Le cancer de l'endomètre survient le plus souvent chez des femmes ménopausées, cependant 20 % de ces lésions sont diagnostiquées chez des patientes de moins de 40 ans. Le traitement conservateur des adénocarcinomes de l'endomètre peut être envisagé pour des tumeurs de stade IA et de grade 1 et 2 (tumeur intramuqueuse, sans invasion myométriale). Toutefois, l'évaluation du stade, en l'absence d'hystérectomie, est basée sur l'IRM (invasion myométriale) et la biopsie d'endomètre (grade) et tous deux peuvent sous-évaluer la lésion. Les progestatifs et les analogues de la GnRH ont été proposés dans le traitement conservateur des cancers de l'endomètre. Le traitement repose sur l'utilisation de l'acétate de médroxyprogestérone (500 mg/j) ou l'acétate de mégestrol (80 à 160 mg/j). Le délai moyen de réponse varie selon les séries de quatre à huit mois, ce qui impose une surveillance rigoureuse par hystéroscopie et biopsie. Il n'existe pas de critère permettant de défi-

nir la durée optimale du traitement. Sur une revue de la littérature comportant 133 cas, 76 % des patientes ont eu une réponse complète parmi lesquelles 34 % ont récidivé (9). Le taux de grossesse est de 32 %. Quatre décès ont été rapportés dans les cas de traitement conservateurs pour cancer de l'endomètre, avec notamment métastases ovariennes et carcinose péritonéale, justifiant pour certains auteurs l'évaluation préalable par coelioscopie. Pour permettre d'informer au mieux les patientes, ces cas doivent être colligés par des centres spécialisés traitant de front la pathologie tumorale et la prise en charge en AMP.

Dysplasies du col de haut grade

Les dysplasies de haut grade concernent souvent des patientes jeunes. La conisation permet un traitement efficace pour éviter l'évolution vers un cancer du col. Les patientes doivent être prévenues que la conisation est associée à des risques obstétricaux. En effet, après conisation à l'anse diathermique, Samson *et al.* rapportent un risque relatif (RR) de rupture prématuré des membranes avec accouchement prématuré de 4,4 (IC 1,48–14,09), le RR d'hypotrophie est de 3 (IC 1,52–6,46) et le RR d'accouchement prématuré avant 37 semaines d'aménorrhée est de 3,5 (IC 1,9–6,95) (10). Ces risques ont été confirmés par une méta-analyse parue en 2006 (11), ils sont corrélés à une hauteur de la conisation supérieure à 10 mm.

Mise à part des difficultés de cathétérisation du col après certaines conisations, l'AMP, si elle est nécessaire, ne présente pas de particularité. Une colposcopie doit être réalisée avant pour éliminer une récurrence débutante.

Cancer du col à un stade précoce

28 % de ces cancers surviennent chez des femmes de moins de 40 ans. De plus, 76 % des cancers détectés chez des femmes de moins de 40 ans surviennent chez des nullipares au stade I soulignant le problème de la préservation de la fertilité.

Les critères pour juger si un traitement conservateur est envisageable dépendent de l'examen clinique (stade FIGO), de l'IRM (taille de la lésion, hauteur dans le canal cervical, distance entre le pôle supérieur de la lésion et isthme utérin) et de la relecture des lames qui est recommandée systématiquement pour vérifier la profondeur d'invasion et l'existence ou non d'embolies. Les cas de cancers où un traitement conservateur est envisageable sont résumés dans le tableau I.

Lorsqu'une trachélectomie élargie (résection du col, d'une portion de l'isthme et des paramètres) est proposée, la patiente doit être prévenue des risques de :

Tableau I – Stades de cancers du col où un traitement conservateur peut être proposé.

Stade FIGO	Traitement conservateur
1A1 (micro-invasif < 3 mm)	Conisation
1A2 (micro-invasif entre 3 et 5 mm)	Conisation ou trachélectomie élargie
IB1 inférieur ou égal à 2 cm sans embolies	Trachélectomie élargie avec lymphadénectomie pelvienne (si N-)
Lésion de 2 à 3 cm, existence d'embolies, adénocarcinome	Discuté selon les auteurs, au cas par cas, le risque semble plus élevé
Lésion > 3 cm, stades ≥ IB2	NON

- renoncement à un traitement conservateur en peropératoire en cas d'atteinte ganglionnaire pelvienne ou de lésion plus étendue avec atteinte de la tranche de section en examen extemporané [9 % des cas selon Plante *et al.* (12)] ;
- totalisation du traitement avec deuxième intervention.

Il faut de plus informer loyalement sur les résultats en termes de récurrence (4,1 % à trois ans), de mortalité (2,5 %) et de fertilité ultérieure après trachélectomie élargie. 43 % des patientes ayant eu une trachélectomie élargie ont eu une grossesse. Le taux de fausse couche du premier trimestre est de 16 %, celui de perte fœtale du deuxième trimestre de 10 % ; 68 % des patientes poursuivant une grossesse ont accouché au troisième trimestre et 72 % de ces dernières ont accouché à terme. Enfin, la trachélectomie élargie peut être une source d'infertilité. Pour certains auteurs, après une information exhaustive, seul un tiers des patientes ayant une indication à une trachélectomie élargie ont opté pour cette stratégie. Les patientes sont bien sûr prévenues qu'après chirurgie radicale, curiethérapie et/ou radio-chimiothérapie, une grossesse n'est plus envisageable.

Après conisation ou trachélectomie élargie, si elle est nécessaire, une AMP n'est pas contre-indiquée. Le problème essentiel peut résider dans les difficultés de cathétérisation du col, notamment après trachélectomie.

Cancer du sein

Peu de données existent concernant le recours à une procréation médicalement assistée chez une femme ayant un antécédent de cancer du sein. À long terme, les stimulations ovariennes ne semblent pas délétères dans la population générale sur le risque de cancer du sein (13). Cependant, à court terme, il est décrit une augmentation de l'incidence des cancers du sein dans l'année

suivant la procréation médicalement assistée (14, 15).

Chez une femme ayant eu un cancer du sein, donc à la fois à haut risque de second cancer et à risque de récurrence, des stimulations ovariennes par méthodes standard ne semblent donc pas envisageables à ce jour. Cependant, une fécondation *in vitro* est envisageable après recueil d'ovocytes en cycles naturels, même si les chances de succès sont bien moindres évidemment. La patiente doit être adressée dans un centre spécialisé dans la procréation médicalement assistée et les décisions prises conjointement entre gynécologues-obstétriciens et oncologues.

Dans le cadre d'études en cours, les inhibiteurs d'aromatase, létrozole et anastrozole, sont évalués pour leur potentiel d'induction d'ovulation ou pour leur capacité à limiter l'hyperœstrogénémie induite par une induction habituelle (il n'y a pas d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication) (16). Cependant, l'innocuité de ces drogues dans cette situation est largement remise en question par les données les plus récentes, elles doivent donc être réservées à l'évaluation en recherche clinique.

De récentes données sur le cancer du sein semblent suggérer que les traitements de l'infertilité n'augmentent pas le risque de cancer du sein chez les patientes à haut risque (familial et/ou génétique) (17).

Conclusion

En cas de patiente en âge de procréer, la problématique de la préservation de la fertilité doit être abordée dès le début de la prise en charge. Un traitement conservateur peut être proposé dans certains cas bien déterminés, dans d'autres cas les données sont plus incertaines. Une prise en charge spécialisée et multidisciplinaire est nécessaire (oncologue, chirurgien, spécialiste d'AMP, psychologue). Il faut savoir expliquer que, dans certains cas, le traitement conservateur est formellement contre-indiqué, et que la prise en charge carcinologique prime. Les données concernant les conséquences des traitements d'infertilité sont souvent parcellaires et le couple doit être informé de certaines incertitudes. Il faut, dans la mesure du possible, envisager les progrès futurs et les possibles évolutions de prise en charge pour préserver au mieux les chances de la patiente, une fois la rémission obtenue, d'obtenir une grossesse.

Références

1. Morice P (2006) Borderline tumours of the ovary and fertility. *Eur J Cancer* 42: 149-58
2. Palomba S, Zupi E, Russo T *et al.* (2007) Comparison of two fertility-sparing approaches for bilateral borderline ovarian tumours: a randomized controlled study. *Hum Reprod* 22: 578-85
3. Sönmezer M, Oktay K (2008) Assisted reproduction and fertility preservation techniques in cancer patients. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15: 514-22
4. Basille C, Olivennes F, Le Calvez J *et al.* (2006) Impact of gonadotrophins and steroid hormones on tumour cells derived from borderline ovarian tumours. *Hum Reprod* 21: 3241-5
5. Attar E, Berckman S, Topuz S *et al.* (2004) Evolutive peritoneal disease after conservative management and the infertility drugs in a patient with stage IIIC borderline micropapillary serous carcinoma (MPSC) of the ovary: case report. *Hum Reprod* 19: 1472-5
6. Morice P, Leblanc E, Rey A *et al.* (2005) GCCLCC and SFOG. Conservative treatment in epithelial ovarian cancer: results of a multicentre study of the GCCLCC (Groupe des chirurgiens de centre de lutte contre le cancer) and SFOG (Société française d'oncologie gynécologique). *Hum Reprod* 20: 1379-85
7. Park JY, Kim DY, Suh DS *et al.* (2008) Outcomes of fertility-sparing surgery for invasive epithelial ovarian cancer: oncologic safety and reproductive outcomes. *Gynecol Oncol* 110: 345-53
8. Lacey JV Jr, Mutter GL, Nucci MR *et al.* (2008) Risk of subsequent endometrial carcinoma associated with endometrial intraepithelial neoplasia classification of endometrial biopsies. *Cancer* 113: 2073-81
9. Chiva L, Lapuente F, González-Cortijo L *et al.* (2008) Sparing fertility in young patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 111 (Suppl 1): s101-s104
10. Samson SL, Bentley JR, Fahey TJ *et al.* (2005) The effect of loop electrosurgical excision procedure on future pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 105: 325-32
11. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P *et al.* (2006) Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 367: 489-98
12. Plante M, Renaud MC, Hoskins IA, Roy M (2005) Vaginal radical trachelectomy: a valuable fertility-preserving option in the management of early-stage cervical cancer. A series of 50 pregnancies and review of the literature. *Gynecol Oncol* 98: 3-10
13. Gauthier E, Paoletti X, Clavel-Chapelon F E3N group (2004) Breast cancer risk associated with being treated for infertility: results from the French E3N cohort study. *Hum Reprod* 19: 2216-21
14. Venn A, Watson L, Bruinsma F *et al.* (1999) Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet* 354: 1586-90
15. Salhab M, Al Sarakbi W, Mokbel K (2005) In-vitro fertilization and breast cancer risk: a review. *Int J Fertil Womens Med* 50: 259-66
16. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Lostritto K, Oktay K (2007) Relative potencies of anastrozole and letrozole to suppress estradiol in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation before in-vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2197-200
17. Kotsopoulos J, Librach CL, Lubinski J *et al.* (2008) Infertility, treatment of infertility, and the risk of breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations: a case-control study. *Cancer Causes Control* 19: 1111-9

J. Conard

Implications des pathologies hématologiques sur l'assistance médicale à la procréation

Introduction

La pratique de l'assistance médicale à la procréation (AMP) s'est développée ces dernières années et les modalités de la stimulation ovarienne et de la fécondation *in vitro* (FIV) ont subi des modifications au cours du temps (1). L'une des complications de l'AMP est la survenue de thromboses veineuses ou artérielles. Différentes pathologies hématologiques sont associées à une augmentation du risque de thrombose veineuse, et en particulier les thrombophilies biologiques congé-

nitales (déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation : antithrombine (AT), protéine C (PC), protéine S (PS), mutation facteur V Leiden (FVL) ou prothrombine G20210A, hyperhomocystéinémie), ou des anomalies acquises (anticoagulant circulant avec augmentation des anticorps antiphospholipides, syndromes myéloprolifératifs : polyglobulie, thrombocythémie essentielle) (tableau I) (2, 3).

La thrombose étant multifactorielle, d'autres facteurs de risque veineux, comme la grossesse, sont fréquemment associés à ces anomalies biologiques en cas de thrombose (tableau I).

Tableau I – Principaux facteurs de risque de thrombose veineuse et artérielle.

Thrombose	Facteurs de risque biologiques		Autres facteurs de risque
	Héréditaires	Acquis	
Veineuse (TVP-EP, ou autres veines)	Déficits en AT, PC, PS Résistance à la PCa avec FVL Prothrombine (FII) G20210A Hyperhomocystéinémie Augmentation du FIX (FIX Padua) Augmentation du FVIII, XI	Temps de céphaline (TCA) court Anticoagulant circulant Résistance acquise à la PCa Polyglobulie Vaquez Thrombocythémie essentielle Thrombopénie induite par l'héparine	Âge, groupe sanguin non-0 Obésité Chirurgie Cancer Grossesse Hyperstimulation ovarienne sévère Contraception avec éthinylestradiol (comprimés, patch, anneau vaginal) Estradiol par voie orale Traitements par tamoxifène, anti-aromatases Antipsychotiques atypiques Immobilisation, alitement, plâtre Longs voyages en avion, voiture, bus Antécédent personnel de thrombose Tabac ?
Artérielle (AVC-IM)	Hyperhomocystéinémie Déficit en PZ ?	Anticoagulant circulant Diabète Dyslipidémie Polyglobulie de Vaquez Thrombocythémie essentielle Thrombopénie induite par l'héparine	Âge Hypertension artérielle Tabac Contraception Hyperstimulation ovarienne sévère Traitements hormonaux de la ménopause

TVP : thrombose veineuse profonde, EP : embolie pulmonaire, AT : antithrombine, PC : protéine C, PS : protéine S, PCa : PC activée, FVL : facteur V Leiden.

Dans la population générale, le risque de thrombose lié à la grossesse est multiplié environ par six par rapport aux femmes non enceintes n'ayant pas de contraception (4). Ce risque est néanmoins modéré compte tenu du risque très faible observé dans la tranche d'âge 15 à 50 ans, l'incidence annuelle étant de moins de 0,5 thrombose pour 1 000 (5). En revanche, le risque est significatif s'il existe d'autres facteurs de risque associés à la grossesse : une thrombophilie ou une hyperstimulation ovarienne par exemple. Les facteurs de risque de thrombose artérielle (accident ischémique cérébral, infarctus du myocarde) sont pour la plupart, différents de ceux qui sont associés à la thrombose veineuse (tableau I). Classiquement, âge, hypertension artérielle, tabac, dyslipidémie, diabète et activation plaquettaire sont des facteurs de risque importants d'athérosclérose dont la complication est la rupture de la plaque athéromateuse. Récemment, une association entre athérosclérose et thrombose veineuse a été suggérée (6). La reconnaissance des différents facteurs de risque de thrombose lors des procédés d'AMP devrait permettre l'évaluation du risque individuel de thrombose et la mise en route éventuelle d'une prévention adaptée. À notre connaissance, il n'existe pas encore de recommandations claires concernant la prise en charge des patientes candidates à une AMP ayant des antécédents de thrombose et/ou des anomalies biologiques prédisposant aux thromboses. Les recommandations de l'*American College of Chest Physicians* (ACCP) concernant la grossesse, publiées en 2008, n'abordent pas la prévention et le traitement des thromboses associées aux stimulations ovariennes avec ou sans fécondation *in vitro* (4, 7). Cette question est cependant de plus en plus souvent posée aux gynécologues et aux hématologues spécialisés en hémostase.

Hyperstimulation ovarienne

La stimulation ovarienne peut être simple ou associée à une insémination intra-utérine, une fécondation *in vitro* ou une micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est une complication de l'AMP. Il comporte plusieurs degrés de sévérité (8).

- Hyperstimulation minimale : légère distension abdominale, douleurs abdominales modérées, augmentation de la taille des ovaires à l'échographie (> 8 cm).
- Hyperstimulation modérée : douleurs abdominales modérées, nausées avec parfois vomissements, épanchement liquidien intra-abdominal de moyenne abondance à l'échographie avec augmentation du volume ovarien (8 à 12 cm).

- Hyperstimulation sévère : ascite clinique, parfois hydrothorax, oligurie, hémococoncentration avec hématocrite > 45 %, hypoprotéinémie, taille des ovaires > 12 cm.
- Hyperstimulation très sévère : ascite tendue ou large hydrothorax, hématocrite > 55 %, hyperleucocytose > 25 000/mL, oligoanurie, thrombose, détresse respiratoire aiguë.

L'hyperstimulation se produit après administration de gonadotrophine chorionique humaine (hCG) ou bien lorsque le taux d'hCG endogène augmente, après implantation de l'embryon. Les formes minimales ou modérées sont fréquentes (environ 1/3 des cycles de fécondation *in vitro*), les formes sévères ou très sévères sont rares (environ 0,2 à 1,8 % et 0,008 % respectivement) mais constituent une complication grave de l'AMP. La fréquence des hyperstimulations sévères est difficile à évaluer en raison des modifications apportées aux protocoles de stimulation au cours du temps et de leur rareté. Elles sont habituellement observées après fécondation *in vitro*. Elles sont exceptionnelles après stimulation par citrate de clomifène. Elles surviennent soit environ neuf jours après l'injection de gonadotrophine chorionique, témoignant d'une réponse ovarienne excessive à l'injection : elles sont dites précoces, soit plus tard, souvent associées à une grossesse débutante avec augmentation supplémentaire d'hCG : elles sont considérées comme tardives, plus graves et durent plus longtemps (8). Le risque d'hyperstimulation est augmenté chez les femmes jeunes ayant un syndrome des ovaires polykystiques. L'hyperstimulation ovarienne sévère est plus fréquente lorsqu'un grand nombre de follicules a été produit (20 ou plus) et qu'il est associé à un taux élevé d'estradiol (supérieur à 3 000 pg/mL). Des protocoles permettent de réduire le risque d'hyperstimulation sévère, mais ce syndrome ne peut pas être totalement évité. Il doit être pris en charge dans des centres spécialisés en fécondation *in vitro*.

Manifestations thrombo-emboliques

Les premiers cas de thromboses après AMP ont été rapportés en 1989 (9) puis 1991 (10) et en 1994, une revue française de 25 cas a été publiée (11). D'autres revues ont ensuite rassemblé respectivement 57 cas (12), 65 cas (13), 90 cas (14), 71 cas (15), 106 cas (16). Le risque de thrombose veineuse associé à une grossesse spontanée est inférieur à une thrombose pour 1 000 grossesses et en cas d'assistance médicale à la procréation, l'odds ratio (OR) est de 4,3 (IC 95 % 2,0-9,4) (17). Le risque est plus élevé en cas de grossesse gémellaire spontanée ou surtout stimulée : 2,6 (1,1-6,2) et 6,6 (2,1-21,0) respectivement (17).

Les thromboses surviennent dans la grande majorité des cas après administration d'hCG et sont associées à une FIV. Elles surviennent en moyenne 40 jours après le transfert d'embryon ou 27 jours après une induction d'ovulation (15). Elles sont associées à un syndrome d'hyperstimulation sévère dans 80 % des cas environ, et une grossesse dans 70 à 80 % des cas. Les thromboses sont le plus souvent veineuses : thromboses veineuses profondes, embolies pulmonaires (75 % des cas). Mais elles peuvent aussi être artérielles : thromboses artérielles des membres inférieurs, cérébrales, mésentériques, de la carotide. En cas d'hyperstimulation ovarienne sévère, la fréquence des thromboses est estimée à un cas sur 128 (18) ou deux sur 49 (19), ou un cas sur 2 650 à un cas sur 6 400 cycles (12), soit environ 1,6 pour 100 000 cycles/femme.

D'autres facteurs de risque sont souvent présents : thrombophilie héréditaire (environ 40 % des cas), âge supérieur à 35 ans (25 % des cas) et, parfois, pose d'un cathéter central (15).

Les thromboses veineuses et artérielles ont la particularité d'être essentiellement localisées au niveau des vaisseaux de la tête et du cou (thromboses veineuses cérébrales, thromboses des veines jugulaires ou sous-clavières, accidents ischémiques cérébraux, thromboses de la carotide), alors que classiquement les thromboses observées chez les femmes enceintes sont essentiellement des thromboses veineuses profondes du membre inférieur gauche. Ainsi, les thromboses des veines jugulaires sont fréquentes, alors qu'elles sont particulièrement rares en dehors de cette condition. Elles surviennent surtout lorsque les patientes sont enceintes. La cause de cette localisation particulière est encore mystérieuse. Elle a été attribuée au drainage de quantités élevées d'estrogènes contenues dans le liquide d'ascite par le canal thoracique (20). Une autre explication serait la compression des veines jugulaires et sous-clavières par des vestiges branchiaux qui se rempliraient de liquide (similaire au liquide d'ascite) et se fissureraient lors de l'hyperstimulation (21). Les IRM suggèrent que le nombre et la taille des kystes au moment de l'hyperstimulation ovarienne auraient une importance dans le développement d'une thrombose et dans sa localisation uni- ou bilatérale. Toutefois, l'analyse histologique ne permet pas actuellement un diagnostic de certitude. Il s'agit donc d'une hypothèse séduisante qui demande à être confirmée. Quel que soit le mécanisme précis des thromboses, l'activation de la coagulation lors des hyperstimulations sévères et l'existence éventuelle d'une thrombophilie ont probablement aussi un rôle important.

Les thromboses artérielles sont plus rares et surviennent plus tôt : 10,5 jours après le transfert, 8,2 jours après administration d'hCG dans les

inductions d'ovulation (15). Une revue de 34 cas a récemment été publiée (22). Il s'agissait de thromboses artérielles des vaisseaux de la tête et du cou dans 19 cas sur 34 (artères cérébrales $n = 12$, carotides ou vertébrales $n = 7$). Neuf patientes avaient plus de 34 ans, 19 étaient enceintes au moment de la thrombose. Des séquelles ont persisté chez 10 patientes et 2 sont décédées. Il est intéressant de constater que la proportion de thromboses artérielles par rapport à celle des thromboses veineuses est différente après AMP : 1 cas sur 3 environ, alors qu'elle est plutôt de 1 cas sur 10 ou 20 chez les femmes prenant des traitements hormonaux (22). Il est toutefois possible que les thromboses artérielles laissant plus souvent des séquelles soient plus souvent rapportées que les thromboses veineuses.

Modifications sanguines et hyperstimulation ovarienne

L'hyperstimulation ovarienne s'accompagne d'une modification de la perméabilité capillaire, d'une hémococoncentration qui entraîne une hyperviscosité et de modifications de l'hémostase (23-25). De plus, il a été décrit une expression exagérée du facteur tissulaire par les monocytes activés (26), une activation du système des kinines (27), des modifications du facteur tissulaire et du TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*), inhibiteur physiologique de la phase initiale de la coagulation (28).

Les anomalies de l'hémostase observées sont une augmentation du nombre des plaquettes et des taux de facteurs de coagulation : fibrinogène, facteurs V, VIII, von Willebrand, et une diminution des inhibiteurs physiologiques de la coagulation – antithrombine, protéine S et une résistance acquise à la PC activée (23-25). Il en résulte une augmentation des marqueurs d'activation de coagulation : D-dimères, complexes thrombine-antithrombine et une accélération du temps de coagulation au thromboélastogramme (29). Par ailleurs, la fibrinolyse est diminuée. Les mêmes modifications sont également observées pendant la grossesse. Elles conduisent à un état d'hypercoagulabilité pouvant favoriser les thromboses veineuses. L'augmentation du fibrinogène et la résistance acquise à la protéine C activée ont été corrélées aux taux d'estradiol et persistent pendant la phase de support lutéale (25).

Le groupe sanguin A a été associé à une augmentation du risque d'hyperstimulation ovarienne et à des thromboses jugulaires (30). Ceci est à rapprocher des taux plus élevés de facteur VIII chez les patients ayant ce groupe sanguin, et les augmentations de ce facteur sont aussi des facteurs de risque de thrombose.

En cas d'hyperstimulation ovarienne sévère, dans une étude portant sur un nombre relativement faible de patientes, les anomalies ont été observées pendant dix jours après l'injection d'hCG (31).

Elles ont été encore retrouvées quatre semaines après injection d'hCG en cas de grossesse, mais une normalisation a été observée en l'absence de grossesse (31). Le mécanisme des thromboses artérielles est mal connu et les anomalies de l'hémostase en cause sont peu nombreuses (tableau I).

Facteurs biologiques de risque de thrombose et hyperstimulation ovarienne

Anomalies hématologiques congénitales

Compte tenu des modifications de l'hémostase associées aux hyperstimulations et à la grossesse (en particulier diminution des taux d'AT et PS, résistance acquise à la protéine C activée), une augmentation du risque de thrombose veineuse est attendue chez les femmes ayant des modifications congénitales de ces paramètres. Parmi les cas rapportés par Chan *et al.*, une thrombophilie biologique était présente dans 41 % des cas (15). Dans une étude cas-témoins de coût-efficacité, il n'a pas été trouvé d'augmentation de la prévalence des thrombophilies en cas d'hyperstimulation (32). En conséquence, la recherche systématique de thrombophilie avant fécondation *in vitro* n'a pas été jugée coût-efficace. En revanche, la recherche de thrombophilie serait utile en cas d'antécédent personnel ou familial de thrombose veineuse (16, 33).

Chez les femmes ayant eu une thrombose artérielle après stimulation ovarienne, une thrombophilie a été détectée dans 19 % des cas (22). Il est actuellement admis qu'en général, les thrombophilies constitutionnelles sont moins fréquentes dans les thromboses artérielles que dans les thromboses veineuses.

La thrombophilie a également été impliquée dans les échecs d'implantation. En effet, une hypercoagulabilité chez la mère pourrait entraîner une altération de la circulation utéro-placentaire et un échec de grossesse après FIV ou ICSI. Une association avec l'échec d'implantation a été observée chez les femmes porteuses des mutations FV Leiden ou de FII G20210A (34), et aussi en cas de thrombophilie combinée ou de mutation MTHFR 677TT (35) mais non retrouvée par d'autres auteurs (36). Une étude génétique plus complète a été réalisée chez 42 femmes ayant eu plusieurs échecs d'implantation après FIV (en moyenne 4,3) et chez 20 témoins (37). Elle a comporté l'étude de dix mutations affectant l'hémostase : FV Leiden, FII 20210A, MTHFR 677 C/T, MTHFR A1298C, FV Y1702C, FV HR2, PAI 4G/5G, β -fibrinogène 0455 G/A, FXIII V34L, HP 1. La mutation homozygote PAI

4G/4G, qui induit une hypofibrinolyse, était plus fréquente : 38 % vs 10 % ($p = 0,03$) ; il y avait davantage de mutations homozygotes : 74 % vs 20 % ($p = 0,007$) dont la mutation MTHFR A1298C (qui n'est pas la mutation recherchée en routine), et le nombre total de mutations hétérozygotes et homozygotes était plus élevé : 74 % vs 20 % ($p = 0,004$). L'existence d'anticorps antiphospholipides est aussi plus fréquente chez les femmes qui ne sont pas enceintes après plusieurs transferts d'embryons (26, 37). Ainsi, la coagulation et la fibrinolyse seraient nécessaires à l'invasion des trophoblastes et pour éviter les dépôts de fibrine dans les vaisseaux placentaires. La recherche de thrombophilie pourrait donc être proposée après plusieurs échecs de FIV.

Anomalies hématologiques acquises

La présence d'anticoagulant circulant et les anticorps anticardiolipine sont des facteurs de risque de thrombose veineuse (0,5 à 30 %) et les critères du diagnostic de syndrome des antiphospholipides (SAPL) comportent l'association d'un facteur de risque clinique (thrombose ou complication de la grossesse) et d'un facteur de risque biologique (38). Peu d'études ont concerné l'induction d'ovulation et l'hyperstimulation ovarienne chez des femmes ayant un lupus érythémateux disséminé (LED) ou un syndrome des antiphospholipides (SAPL) (39) mais une étude récente a été publiée (40). Il apparaît que la fécondation *in vitro* serait possible dans des cas sélectionnés en prenant des précautions pour le protocole de FIV, mais qu'elle doit être déconseillée chez des patientes ayant un LED avec hypertension mal contrôlée, insuffisance rénale et antécédent de thrombose (40).

Les syndromes myéloprolifératifs (polyglobulie de Vaquez, thrombocythémie essentielle ou splénomégalie myéloïde) sont des facteurs de risque de thrombose veineuse et artérielle. Le nombre des plaquettes est élevé dans les thrombocythémies mais il s'agit souvent de plaquettes moins fonctionnelles, ce qui explique le risque de thrombose mais aussi de saignement. Un cas de saignement intra-abdominal massif a été rapporté après ponction d'ovocytes chez une patiente ayant une thrombocythémie essentielle (41).

Prévention des thromboses

Détection des femmes à risque élevé de thrombose

Un interrogatoire orienté effectué avant AMP doit rechercher l'existence d'antécédents personnels ou

familiaux de thrombose avant l'âge de 50 ans. Si des antécédents sont retrouvés, une recherche de thrombophilie biologique est conseillée, bien qu'il n'existe pas de recommandation très précise à ce sujet. Elle comporte les examens suivants : temps de Quick, temps de céphaline + activateur (TCA) avec recherche d'anticoagulant circulant, dosage du fibrinogène, antithrombine, protéine C, protéine S, test de résistance à la protéine C activée (avec recherche de la mutation FV Leiden si le test est anormal), recherche de la mutation G20210A du gène de la prothrombine ou facteur II. En cas d'antécédent personnel, surtout s'il s'agit d'une thrombose proximale ou embolie pulmonaire, les dosages d'anticorps anticardiolipine et anti β 2-GP1, ainsi que celui de l'homocystéine sont ajoutés aux précédents.

La recherche de thrombophilie, non pas avant AMP, mais seulement en cas d'hyperstimulation ovarienne sévère, a été suggérée pour réduire le nombre des examens de laboratoire mais permettre d'éviter plus efficacement une thrombose veineuse survenant en tout début de grossesse (19). Il convient de rappeler qu'un âge supérieur à 35 ans, l'obésité, l'alitement, l'immobilisation ou un antécédent personnel de thrombose sont aussi des facteurs de risque de thrombose veineuse.

Détection des femmes à risque d'hyperstimulation sévère

Les femmes de moins de 35 ans, de faible poids, les taux élevés d'estradiol (supérieurs à 3 000 pg/mL), la taille et le nombre des follicules (plus de 20) et l'existence d'un syndrome des ovaires polykystiques, d'une hyperprolactinémie, d'une hypothyroïdie ou d'antécédent d'hyperstimulation sévère sont des facteurs de risque d'hyperstimulation sévère. Une réponse excessive après stimulation simple peut aussi laisser prévoir une hyperstimulation ovarienne sévère après fécondation *in vitro*.

Éviter une hyperstimulation ovarienne sévère et diminuer le risque de thrombose

La prévention des thromboses passe par l'indication et les modalités de la stimulation et de la fécondation *in vitro*. L'administration de contraception contenant de l'éthinyl-estradiol est contre-indiquée dans la programmation des FIV car elle augmente le risque de thrombose veineuse. La FSH recombinante est préférée à la FSH d'origine urinaire car elle induit moins d'anomalies de l'hémostase (42), la progestérone naturelle est préférée à l'hCG pendant la phase lutéale.

Les protocoles sont adaptés pour éviter les hyperstimulations ovariennes sévères : stimulation modé-

rée pour éviter les taux excessif d'estradiol, annulation éventuelle du cycle, *coasting*, doses faibles d'hCG, de préférence transfert d'un seul embryon, congélation des embryons surnuméraires.

Chez les femmes à très haut risque de thrombose veineuse, les cycles spontanés sont conseillés (43). En cas de don d'ovocytes, l'administration d'estradiol par voie transdermique est préférée car le risque de thrombose veineuse est plus faible qu'avec la voie orale.

Traitement anticoagulant et ses modalités

Peu d'informations sont disponibles. Elles concernent surtout le traitement préventif en cas d'hyperstimulation ovarienne sévère, parfois le traitement d'une thrombose survenant au cours d'une hyperstimulation, beaucoup moins d'informations concernent la prévention chez les femmes qui ont des facteurs de risque veineux préexistants à la stimulation (16).

- En cas d'hyperstimulation ovarienne sévère sans thrombose, le traitement anticoagulant préventif par HBPM (Lovenox® 40 mg ou Fragmine® 5 000 UI par jour par exemple) est administré pendant la période d'hyperstimulation et poursuivi pendant au moins un mois, en cas de grossesse, plus longtemps s'il existe d'autres facteurs de risque (8). Les doses préventives d'HBPM ou d'héparine non fractionnée ont semblé parfois insuffisantes (44-46).
- En cas de thrombose lors d'une hyperstimulation ovarienne sévère, un traitement anticoagulant par HBPM est administré à dose curative (Lovenox® 1 mg/kg ou Fragmine® 100 UI/kg à raison de deux injections par jour), poursuivi pendant la grossesse et au moins six semaines post-partum. Une certaine résistance a parfois été observée, ce qui incite à vérifier l'efficacité de la dose d'HBPM administrée en surveillant le taux d'activité anti-Xa. Dans un cas de thrombose de la veine cave supérieure, un traitement thrombolytique par le t-PA (*tissue-plasminogen activator*) avait été administré alors que la femme était enceinte (21). Ce type de traitement est habituellement réservé à des cas de thrombose mettant la vie de la mère en danger, des embolies pulmonaires massives par exemple (4).
- Chez les femmes à risque veineux (antécédent personnel et/ou thrombophilie biologique), la situation est complexe : le recours à un traitement anticoagulant préventif, le moment du début de son administration et les doses ne sont pas bien définies. Une étude a concerné des femmes à haut risque ou très haut risque veineux (47). Des doses d'HBPM de 0,6 à 1 mg/kg ont été administrées aux femmes à risque veineux, à partir du 1^{er} jour de GnRH ou de gonadotrophine. Un groupe de

19 femmes à haut risque ont eu 49 cycles de FIV, les taux d'estradiol étaient de $1791 \pm 1\,420$ pg/mL, le nombre d'ovocytes de 13 ± 8 . Le groupe de cinq femmes à très haut risque, en raison de thrombophilie biologique, d'antécédent de thrombose ou ayant une anticoagulation au long cours, ont eu 24 cycles spontanés contrôlés. Aucun cas d'hémorragie ou de thrombose n'a été constaté.

Récemment, Nelson et Greer ont proposé une conduite à tenir chez les femmes à risque veineux ayant une FIV (16) (tableau II).

- À la lumière de la littérature et de notre expérience personnelle, l'attitude suivante peut être proposée : FVL ou F II 20210A hétérozygote sans antécédent (ATCD) personnel de thrombose : prévention par HBPM (Lovenox® 40 mg ou Fragmine® 5 000 UI) après la ponction d'ovocytes ou seulement en cas d'hyperstimulation sévère ; prolongée un mois en cas de grossesse, reprise six semaines dans le post-partum. Prévention poursuivie pendant la grossesse en cas de facteur de risque surajouté : obésité ou immobilisation par exemple.
- Autres thrombophilies héréditaires sans antécédent personnel de thrombose : en cas de déficit en antithrombine, le risque de thrombose est élevé, une discussion pluridisciplinaire est importante et la FIV est parfois contre-indiquée bien que des posologies d'HBPM soient indiquées dans les propositions de Nelson et Greer (16). Pour les déficits en protéine C ou protéine S, le moment de la prévention est décidé au cas par cas, mais un traitement préventif est habituellement administré après la ponction d'ovocytes ou seulement en cas d'hyperstimulation sévère.

- ATCD personnel de thrombose veineuse ± thrombophilie. Un traitement préventif est justifié et le moment du début peut être décidé en fonction de la nature de l'antécédent : prévention débutée dès le début de la stimulation avec une « fenêtre », lors de la ponction des ovocytes, si le risque est élevé (embolie pulmonaire ou thrombose veineuse proximale par exemple, ou thrombose surale avec thrombophilie), seulement après la ponction d'ovocyte en cas de risque estimé plus faible (antécédent de thrombose veineuse surale ancienne sans thrombophilie biologique par exemple).

Les doses d'HBPM utilisées sont des doses préventives (Lovenox® 40 mg ou Fragmine® 5 000 UI par jour) mais elles ont parfois été considérées comme insuffisantes, ce qui incite au contrôle de l'activité anti-Xa.

Dans le cas particulier des patientes ayant un LED ou des anticorps antiphospholipides, une attitude a été proposée par Bellver *et al.* (40) :

- en cas d'anticorps antiphospholipides sans antécédent de thrombose, un traitement anticoagulant préventif est conseillé après la ponction d'ovocytes, dès le début de la phase lutéale ;
- en cas de thrombose avec anticorps antiphospholipides : la patiente a un traitement anticoagulant au long cours. Ce traitement est remplacé par un traitement par HBPM à dose curative (Lovenox® 1 mg/kg ou Fragmine® 90 UI deux fois par jour), dès le début de la stimulation, interrompu 12 à 24 heures avant la ponction d'ovocytes et repris 6 à 12 heures après. Le même traitement est maintenu si le test de grossesse est positif, les antivitamines K (AVK) sont reprises s'il est négatif. L'aspirine est

Tableau II – Proposition de prévention des thromboses veineuses lors d'AMP, d'après Nelson et Greer (16).

Situation clinique	Conduite suggérée
1 ATCD de TV avec FR transitoire (pas de grossesse ni CO) et pas d'autre FR (ex. obésité)	Surveillance ou HBPM dose préventive : Lovenox® 40 mg ou Fragmine® 5 000 UI par jour) ± compression élastique
1 ATCD de TV idiopathique ou 1 ATCD + thrombophilie ou 1 ATCD + FR (ex. IMC > 35)	HBPM dose préventive à partir du début de la stimulation et pendant toute la grossesse ± compression élastique Déficit en AT : HBPM dose plus élevée : Lovenox® 0,5 à 1 mg/kg ou Fragmine® 50 à 100 UI/kg, 2 fois par jour
Plusieurs ATCD, pas de thrombophilie, pas d'AVK	HBPM dose préventive + compression élastique à partir du début de la stimulation et pendant toute la grossesse
Plusieurs ATCD, AVK au long cours	Relais par HBPM : Lovenox® 0,5 à 1 mg/kg ou Fragmine® 50 à 100 UI/kg, 2 fois par jour avant la stimulation et pendant toute la grossesse + compression élastique
Thrombophilie biologique sans ATCD de TV	Surveillance ou HBPM dose prophylactique ± compression élastique Indication de prophylaxie plus forte si déficit en AT ou si autres FR
FR de TV avant stimulation, sans ATCD de TV ni thrombophilie biologique	Si plusieurs FR (ex. BMI élevé, immobilité, pré-éclampsie), ou si 1 seul FR mais majeur (ex. obésité morbide), considérer prévention par HBPM

ATCD : antécédent ; TV : thrombose veineuse ; FR : facteur de risque ; CO : contraception orale ; IMC : indice de masse corporelle ; AVK : antivitamines K.

- arrêtée environ une semaine avant la ponction d'ovocytes ;
- en cas de LED sans SAPL : pas de traitement anticoagulant préventif.

Conclusion

La pratique de l'AMP s'est développée ces dernières années et la survenue de thromboses veineuses ou artérielles, rares mais parfois sévères, en est une complication. Les modifications hématologiques associées aux stimulations ovariennes et à la grossesse, ainsi que des facteurs de risque biologiques héréditaires ou acquis, présents chez la patiente avant toute stimulation augmentent le risque de thrombose, veineuse en particulier. La prévention des thromboses nécessite la détection des femmes à risque et l'adaptation des protocoles d'AMP pour éviter une hyperstimulation ovarienne sévère. Une collaboration étroite entre gynécologue, hématologue et médecin vasculaire est indispensable afin de déterminer le niveau de risque individuel, le moment et la durée du traitement anticoagulant, ainsi que sa posologie. Cette collaboration est nécessaire avant d'entreprendre une stimulation et aussi chez les femmes développant une hyperstimulation ovarienne sévère. La recherche éventuelle de thrombophilie biologique peut être envisagée dans ces deux situations, et peut-être aussi après plusieurs échecs d'implantation.

Références

- Rossin B, Pouly JL, Belaisch-Allart J *et al.* (2009) La stimulation de l'ovulation pour fécondation *in vitro*, en France : choix et résultats en fonction des protocoles et des gonadotrophines. *Gynécologie Obstétrique Fertilité* 37: 864-72
- Samama MM for the Sirius Study Group (2000) An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients. *Arch Intern Med* 160: 3415-20
- Seligsohn U, Lubetsky A (2001) Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344: 1222-31
- Bates SM, Greer IA, Pabinger I *et al.* (2008) Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy and pregnancy. American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) *Chest* 133: 844S-86S
- Oger E (2000) Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'étude de la thrombose de Bretagne occidentale. *Thromb Haemostasis* 83: 657-60
- Prandoni P, Bilora F, Marchiori A *et al.* (2003) An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med* 348: 1435-41
- Conard J, Horellou MH, Samama MM (2009) Grossesse et maladie thromboembolique veineuse. À propos des recommandations nord-américaines et européennes. *J M Vascul* 34: 300-13
- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) (2006) The management of ovarian hyperstimulation syndrome. Green-top Guideline N°5
- Boulieu D, Ninet J, Pinède L (1989) Thrombose veineuse précoce de siège inhabituel, en début de grossesse après stimulation ovarienne. *Contracept Fertil Sex* 17: 725-7
- Fournet N, Surrey E, Kerin F (1991) Internal jugular vein thrombosis after ovulation induction with gonadotropins. *Fertil Steril* 56: 354-6
- Benifla JL, Conard J, Naouri M *et al.* (1994) Syndrome d'hyperstimulation ovarienne et thrombose. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 23: 778-83
- Stewart JA, Hamilton J, Murdoch AP (1997) Thromboembolic disease associated with ovarian stimulation and assisted conception techniques. *Hum Reprod* 12: 2167-73
- Ou YC, Kao YL, Lai SL *et al.* (2003) Thromboembolism after ovarian stimulation: successful management of a woman with superior sagittal sinus thrombosis after IVF and embryo transfer: case report. *Hum Reprod* 18: 2375-81
- Rao AK, Chitkara U, Milki AA (2005) Subclavian vein thrombosis following IVF and ovarian hyperstimulation: a case report. *Hum Reprod* 20: 3307-12
- Chan WS, Dixon ME (2008) The "ART" of thromboembolism: a review of assisted reproductive technology and thromboembolic complications. *Thromb Res* 121: 713-26
- Nelson SM, Greer IA (2008) The potential role of heparin in assisted conception. *Human Reprod Update* 14: 623-45
- Jacobsen AF, Skjeldested FE, Sandset PM (2008) Ante- and postnatal risk factors of venous thrombosis: a hospital-based case-control study. *J Thromb Haemostasis* 6: 905-12
- Delvigne A, Demoulin A, Smits J *et al.* (1993) The ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a Belgian multicentric study. I. Clinical and biological features. *Hum Reprod* 8: 1353-60
- Mara M, Koryntova D, Kapral *et al.* (2004) Thromboembolic complications in patients undergoing in-vitro fertilization: retrospective clinical study. *Ceska Gynekol.* 69: 312-16
- Bauersachs RM, Manolopoulos K, Hoppe I *et al.* (2007) More on: the "ART" behind the clot: solving the mystery. *J Thromb Haemostasis* 5: 438-9
- Salomon O, Schiby G, Heiman Z *et al.* (2009) Combined jugular and subclavian vein thrombosis following assisted reproductive technology-new observation. *Fertil Steril* 92: 620-5
- Girolami A, Scandellari R, Tezza F *et al.* (2007) Arterial thrombosis in young women after ovarian stimulation: case report and review of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 24: 169-74
- Aune B, Hoie KE, Oian P *et al.* (1991) Does ovarian stimulation for in-vitro fertilization induce a hypercoagulable state? *Hum Reprod* 6: 925-7
- Biron C, Galtier-Dereure F, Rabesandratana H *et al.* (1997) Hemostasis parameters during ovarian stimulation for in vitro fertilization: results of a prospective study. *Fertil Steril* 67: 104-9
- Curvers J, Nienhuis SJ, Nap AW *et al.* (2001) Activated protein C resistance during in-vitro fertilization treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95: 222-4
- Balasch J, Reverter JC, Fabregues F *et al.* (1996) Increased induced monocyte tissue factor expression by plasma from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 66: 608-13
- Kodama H, Takeda S, Fukuda J *et al.* (1997) Activation of plasma kinin system correlates with severe coagulation disorders in patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reprod* 12: 891-5
- Rogolino A, Coccia ME, Fedi S *et al.* (2003) Hypercoagulability, high tissue factor and low tissue factor pathway inhibitor levels in severe ovarian hyperstimulation syn-

drome: possible association with clinical outcome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14: 277-82

29. Harnett MJP, Bhavani-Shankar K, Datta S, Tsen LC (2002) In-vitro fertilization-induced alterations in coagulation and fibrinolysis as measured by thromboelastography. *Anesth Analg* 95: 1063-6

30. Binder H, Flegel WA, Emran J *et al.* (2008) Association of blood group A with early-onset ovarian hyperstimulation syndrome. *Transfus Clin Biol* 15: 395-401

31. Kodama H, Fukuda J, Karube H *et al.* (1996) Status of the coagulation and fibrinolytic systems in ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 66: 417-24

32. Fabregues F, Tassies D, Reverter JC *et al.* (2004) Prevalence of thrombophilia in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome and cost-effectiveness of screening. *Fertil Steril* 81: 989-95

33. Dulitzky M, Cohen SB, Inbal A *et al.* (2002) Increase prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 77: 463-7

34. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A *et al.* (2001) Inherited thrombophilia and in-vitro fertilization implantation failure. *Fertil Steril* 76: 201-2

35. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA *et al.* (2006) Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 21: 2694-8

36. Martinelli I, Taioli E, Ragni G *et al.* (2003) Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 88: 789-93

37. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R (2006) Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online* 12: 322-7

38. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T *et al.* (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4: 295-306

39. Le Thi Huong D, Wrcbsler B, Piette JC (2003) Ovulation induction therapy and systemic lupus erythematosus. *Ann Med Interne (Paris)* 154: 45-50

40. Bellver J, Pellicer A (2009) Ovarian stimulation for ovulation induction and in-vitro fertilization in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Fertil Steril* 92: 1803-10

41. El-Shawarby SA, Margara RA, Trew GH *et al.* (2004) Thrombocythemia and hemoperitoneum after transvaginal oocyte retrieval for in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 82: 735-7

42. Ricci G, Cerneca F, Simeone R *et al.* (2004) Impact of highly purified urinary FSH and recombinant FSH on haemostasis: an open-label, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 19: 838-48

43. Shulman A (2006) Safety of IVF under anticoagulant therapy in patients at risk for thrombo-embolic events. *Reprod Biomed Online* 12: 354-8

44. Edris F, Kerner CM, Feyles V *et al.* (2007) Successful management of an extensive intracranial sinus thrombosis in a patient undergoing IVF: case report and review of literature. *Fertil Steril* 88: 705.e9-14

45. Cupisti S, Mueller A, Strauss R *et al.* (2007) Severe ovarian hyperstimulation syndrome in a twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res* 33: 585-9

46. Chipwete SE, Bugren S, Rafla N (2009) Thrombosis post ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 91: 1956.e13-e14

47. Yinon Y, Pautzner R, Dulitzky M *et al.* (2006) Safety of IVF under anticoagulant therapy in patients at risk for thrombo-embolic events. *Reprod Biomed Online* 12: 354-8

Abréviations

ACCP : American College of Chest Physicians	HBPM : héparine de bas poids moléculaire
AMP : assistance médicale à la procréation	hCG : <i>human chorionic gonadotrophin</i>
AT : antithrombine	ICSI : micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
ATCD : antécédent	IRM : imagerie par résonance magnétique
AVK : antivitamines K	LED : lupus érythémateux disséminé
BMI : <i>body mass index</i>	MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase
CO : contraception orale	OD : odds ratio
FII : facteur II	PAI : <i>plasminogen activator inhibitor</i>
FV : facteur V	PC : protéine C
FVL : facteur V Leiden	PS : protéine S
FVIII : facteur VIII	SAPL : syndrome des antiphospholipides
FIX : facteur IX	TCA : temps de céphaline + activateur
FXIII : facteur XIII	TFPI : <i>tissue factor pathway inhibitor</i>
FIV : fécondation <i>in vitro</i>	t-PA : <i>tissue plasminogen activator</i>
FR : facteur de risque	TV : thrombose veineuse

O. Fain

Implications des pathologies auto-immunes sur la fertilité et l'aide médicale à la procréation

Introduction

Le taux d'infertilité est de 10 à 20 % dans les pays occidentaux. Les maladies auto-immunes et, en premier lieu, le lupus érythémateux systémique et le syndrome des antiphospholipides (SAPL) peuvent être en cause par des mécanismes variés : anovulation, ménopause précoce, toxicité gonadique des traitements, pertes fœtales par ischémie placentaire...

Fertilité, et maladies auto-immunes

Fertilité grossesse et lupus

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune polyviscérale (tableau I) qui peut être révélée au cours d'une grossesse ou dans le post-partum.

Tableau I – Critères de classification du lupus érythémateux systémique de l'American College of Rheumatology de 1982 modifiés en 1997.

- 1/ Éruption malaire.
- 2/ Lupus discoïde.
- 3/ Photosensibilité.
- 4/ Ulcérations buccales ou naso-pharyngées.
- 5/ Polyarthrite non érosive.
- 6/ Pleurésie ou péricardite.
- 7/ Atteinte rénale : protéinurie supérieure à 0,5 g/24 h.
- 8/ Atteinte neurologique : convulsions ou psychose.
- 9/ Atteintes hématologiques : anémie hémolytique ou leucopénie inférieure à 4 000/mm³ ou lymphopénie inférieure à 1 500/mm³ ou thrombopénie inférieure à 100 000/mm³.
- 10/ Anti-DNA ou anti-Sm ou antiprotéine C ou anticorps anticardiolipines IgG, IgM ou fausse sérologie syphilitique positive (VDRL +, TPHA -).
- 11/ Présence de facteurs antinucléaires.

Lupus si au moins quatre critères sont présents.

La fertilité des femmes lupiques est identique à celle de la population générale en dehors des poussées de la maladie, qui peuvent être responsables de périodes d'aménorrhée, mais elle est diminuée en cas d'insuffisance rénale et chez les femmes ayant reçu du cyclophosphamide pour une forme grave de la maladie notamment rénale.

La toxicité gonadique du cyclophosphamide est fonction de l'âge et des doses cumulées reçues. Le risque d'aménorrhée prolongée est de 28 %, 12 % chez les femmes de moins de 25 ans, 62 % chez celles de plus de 30 ans. Le risque est nul avant 25 ans quand la dose cumulée est inférieure à 8 grammes, et il est de 90 % si elle dépasse 12 g/m² (1). Ces données ont amené à limiter l'utilisation du cyclophosphamide au cours du lupus afin de ne pas dépasser 6 grammes (dose totale) et d'utiliser préférentiellement le mycophénolate mofetil. Une protection ovarienne est nécessaire en cas d'utilisation du cyclophosphamide soit par macroprogénitifs soit par agonistes de la LH-RH (2, 3).

La fréquence de poussées lupiques au cours de la grossesse varie suivant les séries entre 18 et 74 % (4). Les pertes fœtales au cours du lupus sont le plus souvent la conséquence d'un syndrome des antiphospholipides (SAPL) associé ou plus rarement secondaire à la présence d'anticorps anti-SSA chez la mère à l'origine d'une myocardite fœtale.

Le risque est fonction de l'activité de la maladie dans les douze mois précédant le début de la grossesse. Les lupus actifs pendant cette période et les femmes ayant ou ayant eu une glomérulonéphrite sont principalement à risque. (5). Les complications obstétricales au cours de la grossesse sont plus fréquentes que dans la population générale : fausses couches et morts fœtales souvent dans le cadre d'un SAPL associé, prématurité, retard de croissance intra-utérin, rupture prématurée des membranes, prééclampsie, éclampsie, HELLP syndrome.

Les enfants nés de mère lupique ont plus de risque d'être hypotrophe ou de développer un lupus néonatal. Le lupus néonatal associe des lésions cutanées

(éruption, photosensibilité) et des atteintes hémato­logiques survenant habituellement entre la 2^e et la 5^e semaine de vie et régressant dans les six mois. La présence d’anticorps anti-SSA chez la mère expose à la survenue d’une myocardite fœtale avec bloc auriculo-ventriculaire (BAV) pouvant aboutir soit à une mort fœtale soit à un bloc auriculo-ventricu­laire irréversible. Une grossesse au cours du lupus doit être programmée. Un délai de un an, après une poussée viscérale sévère notamment rénale et uniquement si la poussée est contrôlée, est indis­pensable. Les traitements du lupus (prednisone et hydroxychloroquine) ne doivent pas être arrêtés. La contraception est indispensable surtout lorsque la maladie n’est pas contrôlée et sous immunosup­presseurs (cyclophosphamide et mycophénolate mofetil). La contraception œstroprogestative est contre­indiquée ; seuls sont autorisés les macroprogestatifs (acétate de chlormadinone). Le stérilet est décon­seillé du fait du risque infectieux sous corticothérapie et traitement immunosuppresseur et du risque hémorragique sous anticoagulant (SAPL associé).

SAPL et grossesse

Le syndrome des antiphospholipides est l’asso­ciation d’une manifestation clinique (thrombose artérielle, thrombose veineuse, pathologie obsté­tricale) et d’un marqueur biologique : anticoagu­lant circulant lupique (ACC) ou anticorps anticar­diolipines (ACL) (tableau II). Les thromboses veineuses sont fréquentes. Elles sont localisées aux membres inférieurs et peuvent être associées ou non à des embolies pulmonaires. Certaines localisations inhabituelles sont décrites : les thromboses des membres supérieurs, les throm­

boses du système hépato-biliaire et les thromboses veineuses rénales. Les thromboses artérielles sont responsables principalement d’accidents vasculai­res cérébraux mais elles peuvent toucher tous les territoires. Les manifestations obstétricales sont la conséquence d’une ischémie placentaire et sont dominées par les fausses couches spontanées et les morts fœtales (tableau II). Le SAPL obstétrical semble être une entité particulière où le risque de récurrence d’événements obstétricaux est important mais celui de thrombose faible. Les anticorps antiphospholipides (APL) regroupent l’anticoagulant circulant (ACC) de type lupi­que (antiprothrombinase) et les anticardiolipines IgG et IgM, anticorps anti-bêta2 GP1 IgG et IgM. D’autres anticorps associés au SAPL sont décrits : antiphosphatidylethanolamine, anti-an­nexine V. La présence d’anticorps antimitochon­dries anti-M5 est associée à la survenue de per­tes fœtales avec thrombopénie dans le cadre de SAPL primaire ou secondaire (6) mais également indépendamment de l’existence de tout anticorps antiphospholipide (7). Les réactions sérologiques syphilitiques peuvent être faussement positives de façon dissociée VDRL positif mais TPHA négatif. D’autres manifestations peuvent survenir au cours du SAPL :

- cardiaques : épaississement valvulaires mitral ou aortique avec sténose ou insuffisance ;
- livedo reticularis, purpura nécrotique, ulcères jambes ;
- neurologiques : chorée, surdité, myélite transverse, pseudo-sclérose en plaques ;
- néphropathies : microangiopathie thrombotique ;
- thrombocytopénie périphérique ;
- anémie hémolytique auto-immune.

Le syndrome catastrophique des antiphospholipides est une défaillance multiviscérale avec souvent

Tableau II – Définition du SAPL (critères de Sydney).

Association d’un signe clinique	Thrombose artérielle ou veineuse (thrombose superficielle exclue) Pathologie obstétricale
Avec un marqueur biologique	Anticoagulant circulant de type lupique = antiprothrombinase et/ou anticardiolipines à taux moyen ou élevé (aCl IgG > 40 GPL) contrôlés + à 12 semaines < 5 ans entre événement clinique et positivité aPL
Manifestations obstétricales	– 1 mort fœtale tardive >10 SA (fœtus morphologiquement normal) – 3 fausses couches spontanées < 10 SA (sans anomalies anatomiques, hormonales ou chromosomiques de la mère et du père) – 1 naissance prématurée (fœtus morphologiquement normal) < 34 semaines du fait éclampsie ou pré-éclampsie Ou signes d’insuffisance placentaire : anomalies doppler suggérant une hypoxie fœtale oligohydramnios retard de croissance intra-utérin poids de naissance < 10 ^e percentile âge gestationnel Hématome rétroplacentaire

hypertension artérielle maligne secondaire à des thromboses multiples touchant plus de trois organes : rein, poumons, système nerveux central, peau, associée à une thrombopénie, une coagulation intravasculaire disséminée. Les facteurs déclenchants sont les infections, l'arrêt des traitements anticoagulants ou antiagrégants. La mortalité à court terme est de 50 %.

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) peut être isolé (SAPL primaire), ou associé à une autre pathologie le plus souvent auto-immune et notamment un lupus (SAPL secondaire).

Un à 5 % sujets contrôles ont des ACL, 15 à 30 % des lupiques ont un ACC, 50 à 80 % un ACL ; 30 % des lupiques ont un SAPL. Le risque de thrombose est de 50 % à 20 ans au cours du lupus s'il existe un ACC. Le risque de pertes fœtales est multiplié par 26 en cas d'APL. Un APL est trouvé dans 15 % des échecs de grossesse récurrents.

Les pertes fœtales répétées (> ou = 2) touchent 2 à 5 % des femmes en âge de procréer. L'association est clairement établie entre pertes fœtales répétées et SAPL (8), le pourcentage varie entre 15 et 90 % de PFR selon les séries. En présence d'APL le risque de pertes fœtales est de 30 % lors de la 1^{re} grossesse et de 90 % après plusieurs fausses couches. Le risque relatif de fausses couches précoces est de 2,56 ; de pertes fœtales de 26,6 ; de retard de croissance intra-utérin de 6,22 (9). Le mécanisme en cause est une ischémie placentaire due à une vasculopathie thrombosante des artères spiralées.

Le traitement d'un SAPL obstétrical associe de faibles doses d'aspirine (< 250 mg/j) et une héparine

de bas poids moléculaire (HBPM) à dose préventive, permettant une naissance dans 80 % des cas. En cas d'échec, les attitudes thérapeutiques, non basées sur des études prospectives, sont les suivantes : augmentation des doses d'HBPM (dose curative) avec surveillance de l'activité anti-Xa et ou immunoglobulines intraveineuses (4). Chez les femmes ayant des anticorps antiphospholipides sans arguments en faveur d'un SAPL, la prescription d'aspirine est habituelle. En cas de SAPL incomplet : une ou deux fausses couches, une HBPM est souvent associée à l'aspirine, notamment dans des situations à risques : femmes plus âgées, taux élevés d'anticardiolipines ou d'anti-bêta 2GP1, présence d'un anticoagulant circulant et PMA. Au cours des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP), la prescription d'aspirine est recommandée en présence d'APL, l'association d'une HBPM est fonction des antécédents thrombotiques et obstétricaux. Une prévention de la thrombose par HBPM et aspirine est souhaitable lors des stimulations ovariennes, étant donné l'hyperœstrogénie induite. Une prophylaxie de la thrombose par HBPM est recommandée dans le post-partum pour une période moyenne de 6 semaines (10).

Autoanticorps et infertilité

En cas d'infertilité inexpiquée, la recherche d'autoanticorps est positive dans 9 à 65 % des cas (tableau III). Les anticorps les plus fréquemment retrouvés sont les anticorps antimuscles lisses et les APL.

Tableau III – Autoanticorps et infertilité, d'après Cervera (4).

Auteur		n	AML %	AT %	FAN %	aPL %
Wilson (34)	Dysfonction ovarienne	77	35#	10	20#	ND
	Contrôles fertiles	77	3	14	3	ND
Taylor (35)	Infertilité inexpiquée	41	49#		10	17#
	Femme enceinte	351	17		3	6
Roussey (36)	Infertilité inexpiquée	45	ND	9#	ND	42#
	Contrôles fertiles	15	ND	0	ND	7
Reimand (37)	Infertilité inexpiquée	34	35#	6	12 #	6
	Contrôles fertiles	392	5	4	4	0
Marai (38)	Infertilité inexpiquée	20	ND	0	ND	65#
	Contrôles fertiles	15	ND	0	ND	7
Shoenfeld (39)	Infertilité inexpiquée	69	ND	ND	ND	12#
	Contrôles fertiles	120	ND	ND	ND	2

AML : anticorps antimuscles lisses ; AT : anticorps antithyroïdiens ; FAN : facteurs antinucléaires ; aPL : anticorps antiphospholipides.

$p < 0,05$.

ND : données non disponibles.

Dans une cohorte de 136 femmes infertiles, Geva (11) met en évidence un lupus non diagnostiqué dans deux cas, soit une prévalence de 1,5 %.

La présence d'anticorps antiphospholipides est associée aux fausses couches à répétition, aux morts fœtales et à d'autres complications obstétricales, mais sont-ils responsables d'infertilité ? Un certain nombre d'études (4, 12) n'ont pas montré de différence en termes de prévalence d'APL chez les femmes infertiles par rapport à une population témoin, et en cas de réussite ou d'échec des méthodes d'AMP. Dans une méta-analyse reprenant 2 053 femmes ayant bénéficié d'une fécondation *in vitro*, Hornstein (12) note la présence dans 34 % des cas d'un taux anormal d'APL mais sans différence concernant l'évolution de la grossesse et notamment le taux d'accouchement d'enfants vivants. Les essais thérapeutiques associant aspirine et prednisone ou aspirine et héparine (4) n'ont pas montré d'efficacité significative par rapport à l'abstention thérapeutique. De ce fait Cervera (4) ne recommande pas de traitement dans ces circonstances. Des études prospectives, à plus grande échelle, sont cependant nécessaires. En cas d'échecs répétés, il nous semble licite de proposer l'association aspirine, héparine de bas poids moléculaire, par analogie à la prise en charge des SAPL obstétricaux.

Pathologie endocrinienne, auto-immunité et infertilité

Certaines maladies auto-immunes endocrinologiques, responsable d'insuffisance gonadique, surrénalienne, thyroïdienne peuvent être à l'origine d'une ménopause précoce (13, 14). De nombreux anticorps sont décrits : cy-Ad et St-C dans la maladie d'Addison, anti-zone pellucide et anti-FSH et LH dans les insuffisances gonadiques, anti-DNA chez 10,5 % des femmes ayant une ménopause précoce contre 3,3 % des témoins (15).

Thyroïde, auto-immunité et fertilité

Un taux normal d'hormones thyroïdiennes est nécessaire à la maturation des ovocytes. La pathologie thyroïdienne auto-immune touche 5 à 20 % des femmes, en âge de procréer, et est une cause d'augmentation des fausses couches, principalement du 1^{er} trimestre. L'association entre maladie auto-immune thyroïdienne et certaines causes de stérilité – endométriose, syndrome des ovaires polykystiques et insuffisance gonadique précoce – est décrite à des degrés divers dans la littérature mais de façon plus fréquente que dans la population générale (16). La présence d'anticorps anti-

thyroïdiens augmente de trois à cinq fois le risque de fausses couches, indépendamment d'une dysthyroïdie, de l'existence de facteurs antinucléaires ou d'anticorps anticardiolipines, avec un odds ratio de 2,73 dans la méta-analyse de Prummel (17), que ce soit pour une grossesse spontanée ou dans le cadre d'une PMA. Plusieurs mécanismes sont probablement en cause : l'âge (les femmes présentant une maladie auto-immune thyroïdienne sont plus âgées), une hypothyroïdie infrabiochimique pendant la grossesse (TSH discrètement augmentée), des anomalies immunologiques – nombre de lymphocytes B CD5/CD20 augmenté et fonction des lymphocytes T anormale. Une réduction très significative des fausses couches (75 %) et des accouchements précoces (69 %) chez les femmes euthyroïdiennes, présentant des anticorps antithyroïdiens (antithyréoperoxydase : anti-TPO), sous traitement par l'évothyroxine (LT4 1 mg/kg/j) pendant la grossesse par rapport aux femmes non traitées, a été mise en évidence par les études de Negro, lors des grossesses spontanées (18) et une tendance cependant non significative pour les grossesses dans le cadre d'une AMP avec un taux de fausses couches de 33 %, chez les femmes traitées et de 52 % chez les femmes non traitées (19).

Des recommandations d'experts ont été établies (20) :

- traitement de toute hypothyroïdie avant la grossesse avec comme objectif une TSH < ou = 2,5 micro-U/mL ;
- augmentation des doses à partir de 4 à 6 semaines de 30 à 50 % ;
- surveillance des femmes ayant des anti-TPO pendant la grossesse du fait du risque d'hypothyroïdie ;
- traitement des hypothyroïdies infracliniques : TSH au-dessus de la normale avec T4 libre normale ;
- diminution des doses de LT4 après l'accouchement.

Bien qu'il existe un lien entre anticorps antithyroïdiens et pertes fœtales, il n'est pas recommandé actuellement de rechercher systématiquement ces anticorps et de traiter les patients dont les anticorps sont positifs.

Mais l'étude de Negro (21), si elle est confirmée par deux études internationales en cours ; amènera probablement à une détection plus systématique de ces anticorps en cas de pertes fœtales ou de stérilité et un traitement plus systématique des ces femmes par LT4.

Maladie cœliaque et pertes fœtales

La maladie cœliaque est une maladie auto-immune due à une intolérance au gluten et caractérisée par

la présence d'anticorps antitransglutaminase, anti-gliadine et antiendomysium. Les complications obstétricales sont plus fréquentes que dans la population générale. Une maladie coéliqua est mise en évidence dans 8 % des infertilités inexplicables dans une étude de Méloni (22) en Sardaigne, région à forte prévalence de maladie coéliqua. Les mécanismes ne sont pas clairement élucidés. La recherche de facteurs de thrombophilie pouvant expliquer ces pertes fœtales a montré la présence plus fréquente d'un variant 4G du gène de la PAI1 : *plasminogen activator inhibitor-1* (23).

Traitement de l'infertilité et maladies auto-immunes

Le rôle déclenchant des œstrogènes dans les poussées lupiques et leur risque thrombogène sont des notions classiques qui amènent à contre-indiquer les œstrogènes à visée contraceptive ou de substitution lors de la ménopause, au cours du lupus et du SAPL. Bien que des études récentes (24) relativisent ce risque.

L'induction de l'ovulation, à l'origine d'une forte hyperœstrogénémie, peut être délétère dans ces pathologies. Bien que deux études (25, 26) ne montrent pas plus d'utilisation des techniques d'AMP parmi les femmes lupiques par rapport aux témoins, le risque individuel est à prendre en compte.

La stimulation ovarienne fait appel au chlomiphène ou aux gonadotrophines à doses variables suivant la technique d'AMP utilisée. L'augmentation des taux d'œstrogènes est de six fois et celle de progestérone de trois fois, ce qui est cependant moindre qu'une grossesse normale. Au cours de la fécondation *in vitro* avec transfert d'embryon, survient une activation de la coagulation et de la fibrinolyse et une augmentation des taux de VEGF pouvant être à l'origine dans 1 à 10 % des cas d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (27).

Ce syndrome est responsable d'un tableau de fuite vasculaire avec ascite, épanchement pleural, hémocoagulation, diminution de la perfusion rénale, coagulation intravasculaire disséminée, thromboses et syndrome de détresse respiratoire. Bien que théorique, le risque de poussée lupique au cours de la stimulation ovarienne n'est pas majeur. Dans l'étude de Le Thi Huong (28), une poussée lupique est survenue dans 25 % des cycles d'induction de l'ovulation (sur 114 cycles chez 21 femmes), 27 % après gonadotrophines et 6 % après chlomiphène. La présence d'une glomérulonéphrite lupique augmente le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (29). Une augmentation du taux des APL est décrite après stimulation pouvant révéler

un SAPL. Des observations de syndrome catastrophique des antiphospholipides ont été décrites, associées à un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (30, 31) avec une mortalité supérieure à 50 %, rendant utile la recherche d'APL avant stimulation chez les femmes ayant des fausses couches à répétition.

Au cours du lupus et du SAPL, il semble prudent de ne proposer les traitements hormonaux pour l'induction de l'ovulation qu'en cas de maladie non évolutive depuis au moins six mois et en l'absence d'atteintes cardiaque, rénale, neurologique ou d'hypertension artérielle non contrôlée.

L'utilisation de nouveaux protocoles de stimulation limitant l'utilisation des gonadotrophines chez les patientes lupiques ou ayant un SAPL devrait être proposée (32), voire l'utilisation d'antioestrogènes ou d'inhibiteurs des aromatasés (33). Les patients ayant un SAPL, et ce d'autant qu'elles ont des antécédents thrombotiques et plus de 40 ans doivent bénéficier d'une thromboprophylaxie, qui sera suspendue 24 heures avant et réintroduite 24 heures après la ponction des ovocytes pour réduire le risque hémorragique mais poursuivi pendant le début de la grossesse, voire pendant toute la grossesse s'il existe un SAPL.

Conclusion

La recherche d'une maladie auto-immune parfois peu symptomatique et d'autoanticorps est indispensable en cas d'infertilité, car le traitement de ces affections, notamment le SAPL, permet d'aboutir à des grossesses à terme et les techniques d'AMP peuvent être délétères sur la pathologie auto-immune sous-jacente et nécessiter donc une prise en charge adaptée.

Références

1. Boumpas DT, Austin HA, Vaughan EM *et al.* (1993) Risk of sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann Intern Med* 119: 366-9
2. Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A *et al.* (2008) Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril* 89:166-73
3. Somers EC, Marder W, Christman GM *et al.* (2005) Use of a gonadotropin-releasing hormone analog for protection against premature ovarian failure during cyclophosphamide therapy in women with severe lupus. *Arthritis Rheum* 52: 2761-7
4. Cervera R, Balasch J (2008) Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Update* 14: 359-66
5. Doria A, Tincani A, Lockshin M (2008) Challenges of lupus pregnancies. *Rheumatology* 47 (Suppl 3): iii9-12

6. La Rosa L, Covini G, Galperin C *et al.* (1998) Anti-mitochondrial M5 type antibody represents one of the serological markers for anti-phospholipid syndrome distinct from anti-cardiolipin and anti- β_2 -glycoprotein I antibodies Clin Exp Immunol 112: 144-51
7. Oliver-Miñarro D, Sanchez-Ramón S, Rodriguez-Mahou M *et al.* (2007) Isolated type 5 antimitochondrial auto-antibodies are associated with a history of thrombocytopenia and fetal loss. Fertil Steril 87:976.e17-8
8. Carmona F, Balasch J (2002) Fetal and obstetric manifestations and infertility in the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, eds. The Antiphospholipid Syndrome II: Autoimmune Thrombosis. Amsterdam, Elsevier: 205-211
9. Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A, Tanaka K (1995) Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. Obstet Gynecol 86: 555-9
10. Erkan D, Patel S, Nuzzo M *et al.* (2008) Management of the controversial aspects of the antiphospholipid syndrome pregnancies: a guide for clinicians and researchers. Rheumatology 47 (Suppl 3): iii23-7
11. Geva E, Geva LL, Burke M *et al.* (2004) Undiagnosed systemic lupus erythematosus in a cohort of infertile women. Am J Reprod Immunol 51: 336-40
12. Hornstein MD, Davis OK, Massey JB *et al.* (2000) Antiphospholipid antibodies and in-vitro fertilization success: a meta-analysis. Fertil Steril 73: 330-3
13. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA (1997) Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. Endocr Rev 18:107-34
14. Nelson LM (2009) Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. N Engl J Med 360: 606-14
15. Blumenfeld Z, Halachmi S, Peretz BA *et al.* (1993) Premature ovarian failure—the prognostic application of autoimmunity on conception after ovulation induction. Fertil Steril 59: 750-5
16. Poppe K, Velkeniers B, Glinoeer D; Medscape (2008) The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 4: 394-405
17. Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM (2004) The environment and auto-immune thyroid diseases. Eur J Endocrinol 150: 605-18
18. Negro R, Formoso G, Mangieri T *et al.* (2006) Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. J Clin Endocrinol Metab 91: 2587-91
19. Negro R, Mangieri T, Coppola L *et al.* (2005) Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. Hum Reprod 20: 1529-33
20. Abalovich M, Amino N, Barbour LA *et al.* (2007) Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 92 (Suppl 8): S1-S47
21. Negro R, Formoso G, Coppola L *et al.* (2007) Euthyroid women with autoimmune disease undergoing assisted reproduction technologies: the role of autoimmunity and thyroid function. J Endocrinol Invest 30: 3-8
22. Meloni GF, Dessole S, Vargiu N *et al.* (1999) The prevalence of coeliac disease in infertility. Hum Reprod 14: 2759-61
23. Ciacci C, Tortora R, Scudiero O *et al.* (2009) Early pregnancy loss in celiac women: The role of genetic markers of thrombophilia. Dig Liver Dis 41: 717-20
24. Petri M (2008) Sex hormones and systemic lupus erythematosus. Lupus 17: 412-5
25. Bengtsson AA, Rylander L, Hagmar L *et al.* (2002) Risk factors for developing systemic lupus erythematosus: a case-control study in southern Sweden. Rheumatology 41: 563-71
26. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL *et al.* (2002) Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study. Arthritis Rheum 46: 1830-9
27. Costa M, Colia D (2008) Treating infertility in autoimmune patients. Rheumatology 47 (Suppl 3): iii38-41
28. Le Thi Huong D, Wechsler YY, Piette JC (2003) Ovulation induction therapy and systemic lupus erythematosus. Ann Med Interne 154: 45-50
29. Guballa N, Sammaritano L, Schwartzman S *et al.* (2000) Ovulation induction and in-vitro fertilization in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 43: 550-6
30. Chauvet E, Canet S, Huchard G *et al.* (2005) Syndrome catastrophique des antiphospholipides après induction de l'ovulation. Rev Med Int 26: 956-9
31. Koo EJ, Rha JH, Lee BI *et al.* (2002) A case of cerebral infarct in combined antiphospholipid antibody and ovarian hyperstimulation syndrome. J Korean Med Sci 17: 574-6
32. Nargund G, Fauser BCJM, Macklon NS *et al.* (2007) For the Rotterdam ISMAAR consensus group on terminology for ovarian stimulation for IVF5. The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod 22: 2801-4
33. Heijnen E, Marinus JC, De Klerk C *et al.* (2007) Mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. Lancet 369: 743-9
34. Wilson C, Eade OE, Elstein M *et al.* (1975) Smooth-muscle antibodies in infertility. Lancet i: 238-239
35. Taylor PV, Campbell JM, Scott JS (1989) Presence of autoantibodies in women with unexplained infertility. Am J Obstet Gynecol 161: 377-9
36. Roussev RG, Kaider BD, Price DE, Coulam CB (1996) Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. Am J Reprod Immunol 35: 415-20
37. Reimand K, Talja I, Metskula K *et al.* (2001) Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. Reprod Immunol 51: 167-76
38. Marai I, Carp HJA, Shai S, Shabo R *et al.* (2004) Autoantibody panel screening in recurrent miscarriages. Am J Reprod Immunol 51: 235-40
39. Shoenfeld Y, Carp HJA, Molina V *et al.* (2006) Autoantibodies and prediction of reproductive failure. Am J Reprod Immunol 56: 337-44

M. Lachowsky et D. Winaver

Implications psychologiques de l'infertilité

Se vivre infertile

L'infertilité n'est pas toujours une maladie, mais elle est parfois plus qu'une maladie. Elle est toujours douleur, pas toujours physique, douleur morale souvent partagée, à parts évidemment inégales, par le couple et même la famille. De nos jours stérilité, mot qui fait mal, a été remplacée par infertilité. L'infertilité en effet contient une notion d'espoir : il suffirait d'attendre, en recourant si besoin, aux progrès de la science médicale pour assurer la continuité. À l'inverse, la stérilité met un point final à une branche de l'arbre généalogique sinon à l'arbre lui-même, elle coupe dans le vif de la lignée, c'est la rupture. Être le rameau stérile n'est pas facile à vivre, ni même à dire, selon la réflexion d'une patiente.

Inversement, est-ce marquer sa place transgénérationnelle, ajouter sa trace ou en laisser une nouvelle, ou s'agit-il d'une nécessité, comme l'écrit Platon dans *Le Banquet* : « C'est de cette manière que tout ce qui est mortel se conserve, non point en restant toujours le même comme ce qui est divin, mais en laissant toujours à la place de l'individu qui vieillit et s'en va un jeune qui lui ressemble ».

À la sécheresse, au vide de la stérilité s'oppose douloureusement l'eau, la plénitude de la fertilité, « donner le jour » ou « donner la vie », ces expressions, certes un peu désuètes, en font foi, elles expriment ce que ressentent celles et ceux qui viennent nous dire leur désarroi. Il n'y a pas si longtemps, les médecins, avant de prendre en compte la demande des couples infertiles, exigeaient deux ans sans grossesse. Ce délai s'est abaissé, il est devenu très variable selon les cas et, surtout, les âges. Comment cela se passe-t-il maintenant ? Aujourd'hui une femme ou un couple se sent infertile dès que la grossesse ne survient pas au moment précis où elle est désirée. La crainte, la douleur s'installent, nées de l'étonnement et de l'incompréhension :

« Comment, j'ai arrêté ma pilule, et je ne suis pas enceinte ? Qu'est-ce qui ne va pas chez moi, qu'est-ce qui ne va pas chez nous ? »

Soumises à la pression de la famille, se comparant à leurs amies enceintes, les femmes se vivent déjà comme différentes, presque anormales ou plutôt hors normes. Notre société ne sait pas attendre. Comme à l'adolescence, tout délai entre le désir et sa réalisation est vécu comme une blessure. Est-ce cette frustration qui fait déjà mal ? En tous cas, elle précipite les femmes dans le cabinet du gynécologue, c'est une urgence.

La consultation

Lors d'une première consultation, la grille bien réglée de l'interrogatoire devrait, sinon faire place, du moins s'enrichir de quelques questions sur le mode de la conversation, pouvant paraître banales et familières mais touchant en fait à l'intime : elles aident le praticien à saisir une situation toujours particulière, la qualité du couple – sa simple présence, avec ses regards, ses attitudes –, la vérité de la demande, le vrai désir, pour soi, pour l'autre, pour les autres, et surtout cette ambivalence commune à toutes les femmes... et sans doute aux hommes aussi. Désir d'enfant et désir de grossesse, les deux ne se superposent pas toujours : si pour certaines le beau ventre rond affiche leur réussite, pour d'autres il trouble l'image de leur corps dont elles acceptent mal la transformation, pour d'autres encore la peur de l'accouchement occupe le devant de la scène, dont la grossesse n'est que le prélude... obligé, sauf cas particuliers. En effet, il est des femmes qui ne sauraient s'imaginer enceintes, il est des couples qui se tourneront plutôt vers l'adoption – jeu égal et extrabiologique pour les deux partenaires – que vers le don de gamètes, mais il en est aussi qui, en désespoir de cause, feront leur la grossesse d'une tierce personne, cette mère porteuse que la loi française réfute. Bien entendu, une seule entrevue ne saurait ouvrir toutes ces perspectives : temps, patience, tact et empathie avec une certaine

dose d'humilité sont ici peut-être plus qu'ailleurs indispensables à une relation médecin-patiente de qualité, malgré l'urgence souvent affichée. En fait, il est capital que le médecin résiste à la pression du couple qui exige, immédiatement, toutes les techniques dont la science dispose aujourd'hui pour concevoir un enfant. Et d'ailleurs pourquoi ? Telle patiente n'a que 26 ans, elle a le temps, le temps biologique, celui-là même qui est compté aux femmes de la quarantaine, si présentes et si demandeuses aujourd'hui dans nos consultations.

– « Docteur, je viens pour une FIV.

– Mais...

– Vous comprenez, j'ai 26 ans, ça fait six mois déjà que nous essayons. J'ai plein d'amies qu'on a fait attendre. On leur a dit qu'elles étaient jeunes et, finalement, après des années de traitement...

– Ce que vous voulez dire, c'est que ça n'a servi à rien puisque de toutes façons on en arrive à la FIV ?

– Euh oui... d'ailleurs, hier soir encore, on en a parlé à la télé ! »

Il lui faut temporiser, en se faisant du temps un allié plutôt qu'un ennemi. Les explorations les plus simples vont lui permettre de leur expliquer leur fonctionnement physiologique et de repérer leurs dysfonctionnements : rapports peu fréquents, obsession de la date d'ovulation, choix erroné du « bon jour » pour faire l'amour. Avec pour corollaire assez fréquent des « pannes » du mari, vécues par la femme comme des refus, des baisses de désir – désir d'amour ou désir d'enfant –, toujours sources de conflits et surtout de risques pour ce couple qui se sent déjà en danger.

Pièges, iatrogénie

Demander une courbe de température à la patiente n'est pas anodin. Prendre sa température au réveil tous les matins peut modifier les habitudes du couple et perturber leur libido. Quant au test post-coïtal, il ne faut pas le banaliser mais en expliquer le but, afin que l'homme ne vive pas le contrôle de ses spermatozoïdes comme le contrôle de sa virilité. Ces explorations, quoique simples et non agressives, sont déjà une atteinte à l'intimité du couple. Mais voir au microscope les spermatozoïdes en mouvement peut être aussi rassurant que bénéfique. Quant à l'examen gynécologique, il est parfois un révélateur. Encore faut-il que le médecin soit, à ce moment-là, attentif aux réticences, aux silences, aux larmes, aux paroles. Attentif à tordre le cou à ces mythes tellement répandus : « Docteur, on m'a toujours dit qu'on ne pouvait pas avoir d'enfant quand on n'a pas de plaisir, je veux dire pas d'orgasme » ou « N'est-ce pas la pilule qui m'a ren-

due stérile à force de la prendre ? ». Attentif aussi à ses propres paroles, on sait l'effet iatrogène des sentences et prophéties médicales. « Ma mère m'a amenée un jour chez son gynécologue et il a dit que j'avais un utérus petit et rétroversé, infantile même », et ma mère a répondu : « Alors, elle aura du mal à avoir des enfants. » Malédiction médicale, malédiction maternelle, tout est en place pour que s'installe l'angoisse d'infertilité, elle-même cause d'infertilité, chez ces femmes fragiles. Le récit dramatisé de l'accouchement de la mère, de femmes mortes en couches, de ce sang dangereux qui ponctue la vie des femmes, a fait partie de leur enfance et aujourd'hui elles ont peur pour elles-mêmes et, parfois, honte de cette peur. Pour certaines, un antécédent de fausse couche provoquée fait resurgir regret et culpabilité. Et que penser des suites de la décision de mettre fin à une grossesse après l'amniocentèse révélatrice d'une anomalie chromosomique ? Notre patiente voit alors l'infertilité comme un juste retour des choses : « J'ai tué mon enfant, toute faute se paie » nous a-t-elle dit. Et comment oublier cette autre patiente murmurant dans un soupir : « Je ne sais ce qui me fait le plus peur, que « ça » rate ou que « ça » réussisse ? »

Parfois, c'est la relation à la mère qui les a mises dans des situations douloureuses, elles n'ont pas su ou pu les dépasser ni les mettre en mots, elles s'expriment par l'infertilité, seul symptôme qu'elles nous apportent, arbre qui leur cache la forêt. Impossibilité de devenir une mère comme leur mère, trop bonne ou trop mauvaise, peur de prendre la place de la mère en y perdant sa place d'enfant, incapacité à payer cette dette transgénérationnelle qui lui donnerait sa juste place dans la lignée. Peur de l'inceste : il serait monstrueux de faire un enfant avec la mère ou avec le père. Le père, lui aussi, peut être source de douleur dans l'infertilité. Une mauvaise relation au père risque d'être dangereuse. Si ce père n'a pas pris tôt sa place, la fille va se retrouver seule face à sa mère. Si la petite fille ne s'est pas sentie fille dans les yeux de son père, son identité sexuelle peut en être compromise. Si elle a été infantilisée par son père, elle ne se donnera pas le droit d'être femme et d'aimer un autre homme. C'est elle que nous verrons pour difficultés et douleurs sexuelles : elle a mal, elle a peur de faire l'amour, elle a peur d'avoir mal, elle a mal parce qu'elle a peur et, de toutes façons, elle n'a pas de plaisir.

Heureusement, il est des cas où ces examens de « défrichage » sont normaux, l'échographie pelvienne aussi, la femme est rassurée sur son fonctionnement hormonal, l'homme est rassuré sur la qualité de son sperme, ils acceptent d'attendre encore un peu. Dans le cas contraire, le médecin gère une situation mouvante. Il va falloir aller plus loin. Là encore, attention aux formulations iatrogènes !

« Mauvaise répondeuse », quelle résonance pour nos patientes ? « Glaire hostile », comment est-ce entendu ? Incriminer la qualité de sa glaire vis-à-vis des spermatozoïdes de son partenaire revient, pour elle, à mettre en doute la qualité de ses sentiments à son égard. Si le corps de l'un est hostile au corps de l'autre, s'aime-t-on vraiment ou du moins assez pour faire un enfant ? Du côté masculin, une oligoasthénospermie est une définition scientifique que nous pouvons traduire, alors qu'un sperme « pauvre », mot quotidien ni valorisé ni masqué par une terminologie médicale, peut être humiliant.

Maladies des corps et annonces

On note parfois le soulagement du couple à la découverte d'une anomalie organique, qui les dédouanerait d'une étiologie psychologique : « Vous voyez bien que ce n'est pas dans la tête, Docteur ! ». Pour eux, cela se guérirait plus facilement et plus rapidement, la balle n'est plus dans leur camp, mais dans celui de la médecine : chirurgie ou procréation médicale assistée (PMA) en deviennent des gestes rassurants, tout invasifs qu'ils soient. Cependant l'inquiétude est grande si se révèle une anomalie jusque-là ignorée. L'homme ou la femme se découvre malade alors qu'il se croyait en bonne santé. Il est d'abord dans la sidération, son corps l'a trahi, il n'a plus de repères. Dévalorisé puis déprimé, il se culpabilise : il est porteur du défaut, de la faute, il est responsable à lui seul de la maladie infertilité. Cette situation est douloureuse pour le couple, difficile pour le médecin. C'est à lui d'annoncer la mauvaise nouvelle. Toute annonce est bien entendu reçue différemment selon la gravité de l'affection, la personnalité du couple et celle du médecin. L'annonce la plus violente est sans doute celle d'une azoospermie. Il n'est pas question de faire transmettre cette nouvelle par le biologiste, encore moins par la partenaire et surtout pas de se laisser piéger par le téléphone. La connaissance de cette anomalie grave, insoupçonnable, va bouleverser la vie de ce patient, et nous en connaissons tous des familles – et surtout la lignée masculine – qui ne seront jamais mis au fait de la situation. Vécues différemment l'insuffisance de la réserve ovarienne, la ménopause précoce, n'en sont pas tout à fait le miroir mais amènent le même type de décision. Si nous avons tous rencontré des couples où le don de gamète était assez aisément toléré et accepté car considéré comme salvateur, il en est d'autres qui nécessitent travail et soutien psychologique professionnels plus longs, tant pour l'homme que pour la femme, ainsi que pour l'entité couple. Être à même de faire le deuil de la transmission biologique sans y voir une atteinte à son statut, à sa dignité

d'homme et de femme, être à même de porter « un demi-étranger dans son ventre » selon l'expression d'une patiente, autant d'obstacles à mettre au clair et surtout en mots, avant l'éventuelle grossesse, et même parfois, pendant. Sans négliger ici, qu'à la douleur de chacun des partenaires, s'ajoute sa tolérance ou sa reconnaissance de la souffrance de l'autre. Elle est difficilement supportable, s'il a été prouvé que l'on en est « responsable ». Souffrez-vous *pour* l'autre, *avec* lui ou *par* lui ? Si c'est *par* lui, les deux se retrouvent seuls et l'avenir du couple en est menacé. Certes, il existe souvent des causes à la fois masculines et féminines à l'infertilité, ce qui va permettre au couple de mieux s'ajuster face aux responsabilités, et face à ce qui les attend encore dans leur quête d'un enfant. En effet, après la découverte et l'annonce du diagnostic, viennent les propositions thérapeutiques. S'il s'agit de techniques de PMA, la vie, leur vie, va en être profondément marquée. Le parcours du combattant, ce cliché toujours exact, bouleverse le quotidien. Problèmes professionnels, abandon de tout autre projet, de carrière comme de vacances, le présent et l'avenir vont se refermer sur ces seuls objectifs : des embryons transférables et des gonadotrophines élevées après maints rendez-vous, maintes interprétations et, hélas, maintes déceptions.

Le temps, la société

Si les cas extrêmes ne sont pas les plus fréquents, ils sont en passe de le devenir : tandis que dans notre environnement croissent les xénotoxiques, la fertilité masculine baisse, l'âge de la première maternité augmente, les familles recomposées aussi, et voilà qui évoque une réflexion sur le temps, ce grand souci des êtres humains, le temps qui passe comme le temps qui reste, le temps qui efface comme celui qui imprime sa marque sur les corps. Mais nous l'entendons dans nos consultations, les femmes et les hommes ne veulent pas toujours les mêmes choses en même temps. En même temps ? Mais c'est exactement ce qu'ils n'ont pas. Au contraire de celui linéaire et continu des hommes, celui des femmes est rythmé, discontinu, scandé et surtout borné par le sang, sa présence et son absence. Ce cycle féminin n'a qu'un temps et c'est bien pour cela que les femmes ne l'ont pas, ce temps. Les hommes ont le temps, non pas celui de la longévité, mais celui de la reproduction, qui ne s'arrête qu'avec eux. Les femmes savent leur temps de maternité limité par la ménopause, les hommes savent leur temps de paternité illimité, du moins dans l'absolu. Les règles des femmes entre puberté et ménopause, autant de marqueurs de la féminité mais aussi de frontières à la maternité. La médecine a d'ailleurs mis une

étiquette sur ces années de la vie féminine, c'est la « période de vie génitale active » – on peut s'interroger sur cette formulation – mais si la ménopause garde encore son potentiel douloureux, n'est-ce pas aussi parce qu'elle marque la fin du pouvoir de procréation ? Ce terme inéluctable et inchangé de leur fertilité semble bien peu compatible avec leur longévité, sans cesse accrue, et leur manière de considérer la vie, sans parler de leur apparence physique. Et que dire de leur quarantaine : la femme de 40 ans a plus de la moitié de sa vie devant elle. Si elle est jeune pour sa mère et ses amies, elle n'est plus si jeune pour son employeur, encore moins pour sa fille, plus du tout jeune pour son entraîneur sportif et franchement âgée pour son accoucheur. Un enfant si je veux... ou si je peux ? Pourtant, nous ne cessons de l'entendre par nos patientes, la quarantaine dépassée est aujourd'hui pour bien des femmes le temps de la maternité, et une certaine presse ne cesse de leur en donner – photos à l'appui – autant de preuves que de désirs. Mais nous le savons, même si elles le nient pour conjurer le sort, leur fertilité est loin de ce qu'elle était cinq à dix ans plus tôt, temps où d'autres désirs et d'autres nécessités les habitaient. Échelons à gravir et rage de vivre mais aussi partenaires sans désir de paternité, autant de dragons à terrasser avant d'en arriver à la découverte de la joie de procréer... ou de sa difficulté. Partenaires sans désir de paternité, peut-être vaudrait-il mieux dire sans désir d'enfant ? Deux sentiments qui pourraient, comme du côté féminin, être différents, ne pas forcément coexister, être sinon intellectuellement, du moins émotionnellement distincts. En effet, fonder une famille, devenir père et s'insérer dans une lignée en prenant sa place aux deux niveaux de l'arbre généalogique est sans doute aussi inscrit au programme de la plupart des hommes, de façon plus superficielle et sociale pour les uns, profonde et évidente pour les autres, totalement insupportable pour de multiples motifs conscients et inconscients enfin, pour certains, plus rares tout de même. Mais le désir d'avoir un enfant, de le faire ici et maintenant avec la femme de sa vie à ce moment précis, voilà qui est encore autre chose. Engagement vis-à-vis de cette femme, de cet enfant, installation dans un autre mode de vie, c'est un changement de vitesse risqué, comme le disait le compagnon d'une patiente. Ce qui pour la femme est un gain lui paraît une perte, une perte d'années, celles de sa jeunesse, de sa liberté, autrement dit de son temps d'homme. Il y a un temps pour tout dit l'Écclésiaste, et les femmes le vivent dans leur corps, elles veulent y croire. Maternité doit se conjuguer avec féminité pour réaliser cette vraie femme, cette femme à part entière qu'elles veulent être... mais quand elles le décideront. Cette complétude se situe-t-elle plus chez l'homme dans sa puissance ? Réussite tant sexuelle que profes-

sionnelle, affirmation nécessaire et suffisante de sa masculinité sans besoin de la preuve par la procréation ? Mais si ce pouvoir de reproduction considéré comme une certitude se révèle brutalement défectueux, ou pire nul, le choc n'en est que plus rude, exposant le manque et la fragilité, érodant l'image et le temps. Pour quelques couples demandant d'office une étude des deux partenaires, des deux « demandeurs », combien de patients et même de patientes sont convaincus de la « responsabilité » féminine dans l'infertilité ? On peut aussi y voir un inconscient hommage à la femme, la femme des mythes, et à son pouvoir aussi prestigieux que fabuleux. Allons plus loin de façon un peu téméraire, en donnant à Ève le rôle du fauteur de trouble dès l'origine, ne lui fait-on pas porter la responsabilité de la notion de temps, de sa mesure et de sa limite ? Les deux genres ont donc chacun du temps et de l'âge une représentation correspondant à sa spécificité, à laquelle s'ajoute pour chacun à la fois sa conception personnelle et celle de son groupe, sans oublier celle que la vie et ses aléas lui auront modelée au fil du temps. Mais il fuit, ce temps et à la cinquantaine ? Le temps des enfants peut paraître révolu pour les femmes à partir d'un certain âge (ou d'un âge certain) mais qui dira la violence du désir de le porter, ce premier et surtout ce dernier enfant, d'encore exercer ce privilège du passé ? Qui dira la différence entre ne pas vouloir et ne pas pouvoir, preuve vécue comme une sanction du passage des années, celles de la femme et non de l'homme ?

Et après ?

Mais revenons à notre couple, qui se sent porteur de la maladie infertilité : la venue de cet enfant, preuve tangible de la guérison de leur infertilité, est-elle toujours guérison ? Non, si ce bébé n'a pour seule fonction que de réparer sa mère, et surtout s'il n'a été que le seul projet qui donnait à l'homme et à la femme l'illusion d'être un couple. Oui, heureusement, si ce bébé est l'accomplissement d'un amour et d'un projet partagés, avec sans doute une vision de durée, d'inscription dans un temps commun. La gestion de l'échec, de sa répétition, est douloureuse et plus difficile. On retrouve des situations peu éloignées des précédentes, aboutissant par des voies différentes à l'éclatement ou la fusion du couple. Usure due aux espoirs sans cesse déçus, sentiment d'années gâchées ou perdues, la décision de cesser cette quête peut être bénéfique si elle est partagée. Que la décision soit évoquée par ce tiers détenteur du savoir sinon du pouvoir, le gynécologue, est souvent capital : il atténue ainsi la responsabilité de chacun des partenaires. En quelque sorte, il les dédouane.

Et qu'en pense-t-il, ce médecin ?

La compassion, souffrir avec, c'est ce qu'il éprouve, c'est ce que le patient est en droit d'attendre, en gardant à l'esprit que si le médecin est trop dans la douleur, il sera paralysé donc inefficace. Une certaine distance est indispensable, la « bonne distance » de Balint, ce qui n'empêche pas l'empathie. Le gynécologue peut s'interroger lui aussi sur le devenir du couple et sur la place de l'enfant, donc sur la validité de son rôle dans cette histoire d'infertilité. Mais lorsque l'enfant – ou plutôt la grossesse – paraît, le sentiment d'impuissance et de dévalorisation, cette souffrance narcissique, née des échecs, qu'il lui a fallu reconnaître et dépasser, doit s'apaiser, s'apaiser assez pour lui permettre ce nécessaire mais difficile arbitrage entre ses doutes

et ses certitudes, un savant dosage entre *evidence-based medicine* et *experience-based medicine*, sans oublier celle basée sur les patients.

Conclusion

Fertilité et infertilité, désir des femmes et désir des hommes, temps des femmes et temps des hommes, discordances et concordances, c'est le passionnant théâtre des corps et des cœurs où nous, gynécologues, sommes parfois spectateurs parfois acteurs, souvent entraînés dans une intimité où nous ne sommes pas toujours très à l'aise. Mais comme l'a écrit Canguilhem, « Guérit-on jamais du désir de guérir ? »

R. Frydman

Infertilité et AMP : implications éthiques

Introduction

La maîtrise de la « reproduction humaine » entraîne de formidables espérances thérapeutiques mais également des craintes chez les chercheurs et dans l'opinion publique. Peu à peu, à l'échelle individuelle, s'énonce le souhait d'un enfant indemne de « tout problème », *un enfant parfait*. Il s'agit là d'une question fondamentale qui touche à l'existence même de l'homme, à la rencontre du hasard et de la nécessité. À l'échelle collective, apparaît une autre question tout aussi fondamentale : les lois du marché appliquées aux sciences du vivant ne risquent-elles pas de conduire à court ou à long terme à une commercialisation de la cellule humaine, dont on est loin de pouvoir encore évaluer toutes les conséquences ?

Traiter une infertilité est un objectif médical louable, mais incontestablement les progrès scientifiques liés à l'assistance médicale à la procréation (AMP) ont choqué nos consciences du fait de nombreuses remises en question fondamentales (quand commence la personne humaine ? qu'est-ce qu'une multifiliation ?). Depuis 25 ans, d'importants débats ont eu lieu. Des comités d'éthiques locaux se sont créés et, en 1984, un Comité national d'éthique des sciences de la vie a vu le jour. Enfin, une loi dite « de bioéthique » est parue en juillet 1994, renouvelée en août 2004. Le terme « assistance médicale à la procréation » a soulevé bien des passions, tantôt l'espérance, tantôt l'inquiétude.

L'espérance, pour les médecins chercheurs engagés dans l'aventure des procréations médicalement assistées, il s'agissait et il s'agit toujours de traiter une situation ressentie comme pathologique : la stérilité du couple. Face à l'ordre naturel défaillant, une solution audacieuse, la fécondation *in vitro* a été envisagée, il y a maintenant plus de trente ans, afin de dépasser certains obstacles mécaniques empêchant la rencontre des gamètes. Espoir certes, qui nécessite pour se réaliser de maîtriser la connaissance des mécanismes intimes des phéno-

mènes. Cependant, cette force, qui pousse vers la connaissance les chercheurs et les médecins, les amène parfois sur des terrains inconnus d'où surgit l'inquiétude. En développant l'insémination artificielle, le don de sperme, le don d'ovocytes, la congélation d'embryons, l'injection intracytoplasmique, le diagnostic préimplantatoire, la maturation *in vitro*, les médecins ont sans doute transgressé l'ordre des choses. Ils ne voulaient que parer à certaines stérilités, ils en arrivent à bouleverser la morale et le droit, voire certaines représentations anthropomorphiques de « l'Homme ».

Ils avaient sous-estimé ces évidences en transformant les conditions de la reproduction, en introduisant une tierce personne dans le couple, ou en figeant la vie par le froid qui la place hors du temps, ils allaient rendre possible une série de situations naguère inimaginables et bouleverser l'idée même de filiation.

Si, initialement, on a crié au miracle devant cette fécondation faite hors la mère, si ultérieurement on a condamné la fécondation *in vitro* sous prétexte qu'elle dissociait l'acte sexuel de l'acte procréatif, aujourd'hui, les passions s'apaisent et la voie raisonnable s'impose peu à peu pour tous.

Depuis le début des années 1970, de nombreuses méthodes d'assistance médicale à la procréation ont subi un essor important, particulièrement en France. Ces méthodes se sont développées, en dehors d'un cadre législatif ou réglementaire, et les nombreux problèmes posés par ces techniques ont conduit les médecins à une réflexion éthique approfondie sur leur pratique.

La plus ancienne de ces méthodes est l'insémination artificielle avec donneur (IAD). Elle a été prise en charge, dès 1973, par les CECOS qui ont proposé d'emblée une réflexion éthique sur son bien-fondé.

D'autres techniques d'AMP sont apparues dans les années 1980 avec, en particulier, la fécondation *in vitro*. Cette étape vers la maîtrise de la procréation a suscité de vives réactions dans nos sociétés. De

nombreux pays ont choisi de mettre en place rapidement une législation en espérant un meilleur contrôle de ces méthodes. Une réflexion à l'échelle européenne est toujours en cours. Mais force est de constater que peu d'observatoires d'évaluation ont été mis en place.

En France, le Comité national d'éthique a traité certains aspects de ces AMP et proposé plusieurs recommandations. De leur côté, les professionnels de l'AMP ont présenté une plateforme éthique, dont l'objectif était d'énoncer les grands principes en matière de procréations médicalement assistées et d'en fixer les limites dans un cadre strictement thérapeutique.

L'Agence de la biomédecine a été créée en mai 2005. Elle a pour mission d'encadrer et d'évaluer les pratiques de l'AMP en France.

Cette spécialité est certainement une des pratiques médicales les plus encadrées.

Principes généraux

Il y a quelques années encore, l'éthique médicale avait pour référence le serment d'Hippocrate : le médecin était seul responsable devant son patient et devait agir en son âme et conscience, dans le seul intérêt de son patient. Le développement des nouvelles techniques a rendu ces règles déontologiques insuffisantes. En effet, le médecin et le patient ne sont plus tout à fait seuls ; le premier a besoin d'une équipe médicale et le deuxième est entouré d'un environnement social et économique qui le détermine beaucoup. Ainsi, les règles déontologiques, qui doivent guider la pratique des AMP, doivent-elles répondre à ces nouvelles exigences : réflexion et décision collégiale dans le respect du patient et en accord avec les règles socio-économiques de nos sociétés.

L'AMP fait appel à des équipes pluridisciplinaires associant tout particulièrement cliniciens et biologistes de la reproduction.

Consentement éclairé

Ceci signifie d'abord que les principaux acteurs des AMP (les couples infertiles) aient été dûment informés des méthodes proposées, de leurs risques éventuels et qu'ils aient donné leur accord préalable à tout ce qui sera réalisé à partir de leurs gamètes. Le médecin doit s'assurer de ce consentement, qui doit être renouvelé pour les deux partenaires à intervalles réguliers, en particulier en cas d'embryons congelés.

Ce premier principe appliqué aux couples demandeurs d'AMP entraîne une obligation de transpa-

rence des résultats des techniques proposées. Les couples doivent recevoir une information la plus complète possible sur les méthodes utilisées, notamment sur leurs principes et les raisons de leur choix. Les résultats escomptés doivent être annoncés en taux de naissances attendues par cycle débuté ou en taux cumulatifs sur une période fixée. Les résultats fournis doivent être ceux du centre adapté au type de traitement utilisé et de la situation individuelle du couple. Le médecin doit s'assurer qu'il ne crée pas d'espoir injustifié, notamment lors d'instaurations de traitements lourds aux résultats peu favorables. Le couple est informé des risques éventuels de grossesses multiples et de risque pour sa santé (hyperstimulation ovarienne, tendance non encore formellement démontrée au cancer de l'ovaire au-delà d'un certain seuil de stimulation).

Dans le cadre de l'autoconservation de gamètes ou d'embryons, il convient de rappeler que l'équipe médicale n'est que le dépositaire des gamètes ou embryons confiés. Les couples doivent être recontactés annuellement et restent responsables de leur devenir.

Les donneurs de gamètes et d'embryons doivent de même recevoir une information précise sur les conditions du don. De plus, ce consentement doit être totalement libre et il est donc nécessaire de prêter une attention particulière sur le rôle du pouvoir médical : les éventuels donneurs de gamètes ne doivent pas attendre les bénéfices directs de la part du médecin qui organisera ce don. La législation française insiste sur le caractère gratuit et anonyme du don de gamètes ou d'embryons.

Cadre thérapeutique

Les AMP ne sont utilisées que dans un cadre exclusivement thérapeutique. Les AMP ne sauraient être un nouveau mode de procréation, elles ne sont qu'une solution face à l'impossibilité d'obtenir un enfant naturellement. Ces méthodes ne peuvent donc s'adresser qu'à des couples hétérosexuels, ayant un projet parental.

La définition de l'infécondité devra être rappelée au couple et la médecine de la reproduction ne devra prendre sa place que dans le cadre de la pathologie.

Il conviendra ainsi d'éviter les médications abusives et prématurées, avant une étude suffisante de la fertilité du couple et un bilan clinique et paraclinique complet. Il conviendra aussi d'éviter les médications abusives et inutiles en raison de l'absence de chance réelle de succès. Le couple sera averti de l'influence de l'âge de la femme sur les résultats des traitements : une diminution notable des résultats est observée après 38 ans et particulièrement drastique après 42 ans.

La prise en charge médicale est déconseillée au-delà de la 42^e année.

Le bilan pré-AMP (échographie ovarienne, bilan hormonal féminin et bilan masculin) permet à la fois d'évaluer les chances de succès selon les types d'AMP proposés et d'optimiser les conditions de son déroulement. Une mention particulière est faite concernant la recherche des risques de transmission de certaines affections graves à l'enfant à naître (génétique ou infectieuse), en particulier la séropositivité VIH.

Le diagnostic préimplantatoire ne peut être réalisé que dans les centres agréés (trois en France en 2009).

Responsabilité sociale

Toute demande d'AMP doit être analysée en fonction de l'intérêt de l'enfant à venir. Toute disposition sera prise afin de prévenir les risques des grossesses multiples de haut rang.

Comme dans toute pratique médicale, les médecins pratiquant les AMP doivent être conscients de leur responsabilité au sujet des individus qu'ils prennent en charge, mais aussi au sujet de la société. Dans ce sens, les techniques les plus simples et les moins coûteuses (induction, IAC) doivent être préférées, à chances équivalentes (en taux cumulatif), aux techniques plus lourdes (FIVETE).

Les acteurs de l'AMP doivent savoir amener les couples à l'abandon de la médicalisation après un bilan défavorable des tentatives et proposer des solutions alternatives (don, adoption).

Non-commercialisation

Enfin, les déclarations des droits de l'homme nous amènent à réaffirmer la notion de non-commercialisation des produits du corps humain. Les dons de gamètes et d'embryons ne peuvent donc être réalisés qu'en l'absence de toute idée de profit. La gestation pour autrui (les mères porteuses) n'est pas acceptée en France.

Recherche

La recherche en vue de l'amélioration des résultats de l'AMP est licite dans certaines conditions :

- le couple doit être informé de sa participation à un essai thérapeutique ; toute nouvelle molécule proposée le sera dans le cadre de la loi. Toute nouvelle proposition thérapeutique sera soumise à l'avis d'un Comité consultatif de protection de personnes ;
- le couple doit pouvoir donner un consentement éclairé par écrit après un délai de réflexion ;

- il est recommandé que, devant certaines techniques nouvelles, la méthode puisse être d'abord validée par des équipes particulièrement habilitées dans le cadre de protocoles ayant été soumis à un Comité d'éthique ;
- en toutes occasions, des essais comparatifs, si possible prospectifs et randomisés, doivent être conduits.

La recherche sur l'embryon (ou zygote) humain est possible dans la loi d'août 2004. Nous rappellerons qu'il n'est pas licite de produire des embryons en dehors d'un projet parental et que tout projet de recherche sur l'embryon humain doit être soumis à l'Agence de biomédecine. Le droit à l'expérimentation sur le zygote humain doit permettre d'améliorer les performances de la FIV. Aujourd'hui, nous avons une méconnaissance qualitative des potentialités de chaque zygote, ce qui amène à transférer trop d'embryons de manière à s'assurer d'un taux de grossesse acceptable. Mais en contrepartie, le pourcentage de grossesses multiples est élevé. Une connaissance de leur potentialité (étude de l'influence du milieu, expression de certaine gène) permettra de réduire le nombre de zygote humain à transférer. À l'inverse, il ne s'agit pas d'obtenir un droit sans contrôle à expérimenter sur le zygote humain. Mais dans un cadre précis et transparent c'est la seule façon d'étudier la fertilité humaine et d'apporter un soulagement aux souffrances qu'amène la stérilité du couple.

Ainsi, pour reprendre les paroles de J. Bernard : « entre les Ponce Pilate de la science et les chercheurs désespérés, se dessine le troisième point, celui de la responsabilité, c'est-à-dire de la maîtrise de la Reproduction humaine tant au niveau individuel que collectif ».

L'éthique peut aujourd'hui donner un cadre serein à la réflexion sur le devenir de l'homme. L'homme a toujours été capable d'utiliser en mal les progrès de la connaissance, mais l'avancée technique n'est pas en soi porteuse de barbarie. L'énergie atomique peut être pacifique ou destructrice, ou plus simplement un train peut emmener des déportés dans un camp d'extermination ou des congés payés en vacances (1). Des interdictions définitives de progrès scientifiques, de crainte que quelques déviations facilement identifiables se produisent, relèvent en fait de non-assistance à personne en danger.

Cependant, l'éthique n'est pas figée, et s'adapte à l'évolution des sociétés.

Aujourd'hui, une centaine de nombres de thématiques sont toujours en discussion.

Faut-il être en couple pour bénéficier d'une AMP, les couples homosexuels peuvent-ils en bénéficier ? La mère porteuse ou gestation pour autrui est-elle condamnable ? Le choix du sexe de l'enfant doit-il être interdit ? Le don de gamètes doit-il être anonyme et forcément gratuit ?

Dans toutes ces questions, s'insèrent des visions du monde, des idéologies différentes.

Finalement, c'est souvent une opposition entre un ultralibéralisme individuel tout puissant et une optique plus collective. D'un côté on entend « Je suis seul à décider de ce qui est bien pour moi et mon enfant ». La médecine n'est qu'un prestataire de service qui devient un élément d'un marché mondial, une suite de confrontation entre l'offre et la demande. De l'autre, la pratique médicale découle d'une réflexion plus collective, (ce qui est bien pour l'équilibre des couples et de l'enfant), et ne décide d'intervenir que lorsqu'il y a souffrance, rupture avec le cours normal des choses, en un mot, qui évite d'être une réponse à ce qui ne serait que désir de convenance.

Les possibilités scientifiques offertes pour les cellules souches embryonnaires, la création de néogamètes, les enfants dits du double espoir, la préservation de la fertilité par congélation de tissu ovarien ultérieurement réimplanté sont quelques-unes des questions éthiques qui devraient être débattues dans les années qui viennent, à l'aune de plusieurs piliers éthiques, un libre accès médical pour tous, une non-utilisation mercantile du corps humain ; le contraire aboutirait à l'assouvissement des plus faibles aux plus forts.

Et pourtant, de nouvelles situations sont à prévoir car le progrès des connaissances est une force irrépressible.

La nécessité d'une vision mondiale

Face à un procès instruit contre la science, qui s'appuie sur la nostalgie de la vie naturelle, du paradis perdu, ou encore sur l'accusation formulée par Martin Heidegger qui reproche à la science d'avoir « désenchanté le monde », il est indispensable que les scientifiques – et pas seulement ceux du vivant – sachent non pas apporter le bonheur aux hommes malgré eux, mais instaurer le dialogue avec le public à propos de l'avalanche quotidienne de découvertes scientifiques et d'avancées technologiques. Les scientifiques ne sont plus de simples dépositaires du savoir, ce sont des acteurs de la pénétration du savoir dans la culture de la société. La réhabilitation de la science, et particulièrement des sciences de l'homme et du vivant, passe par une nécessaire information de nos concitoyens par les scientifiques eux-mêmes. Dans ce cadre, la création de comités d'éthique nationaux est un instrument de choix. Il s'y côtoie certes des scientifiques, mais également d'autres acteurs de la société ayant une approche plus philosophique, religieuse, sociologique ou juridique, selon les courants de pensée existant dans le pays. Aujourd'hui, tout est mondialisé, y

compris les sciences du vivant. Cela fait planer des inquiétudes qui ne peuvent laisser personne indifférent. Devant l'immensité des problèmes que pose l'utilisation de produits humains, n'est-ce pas dans un cadre mondial qu'il faut aujourd'hui réfléchir à ces questions ? Devant les risques de dérapage aux conséquences incalculables que fait peser – ce qu'il faut bien appeler – l'un des marchés mondiaux les plus prometteurs de ces vingt prochaines années, n'est-ce pas au niveau mondial qu'il faut créer les garde-fous nécessaires ?

Faut-il créer un comité international d'éthique qui garantirait l'application de règles éthiques internationales ? Une organisation mondiale de la protection des produits humains qui équilibrerait, avec des pouvoirs identiques, la toute-puissante Organisation mondiale du commerce ? Quel que soit le type d'institution qu'il est devenu nécessaire de mettre en place, une chose est sûre : il faut élaborer un code éthique international garanti par l'Assemblée générale des Nations unies, qui préciserait l'ensemble des règles qui seraient valables pour tous (non-commercialisation du génome, interdiction du clonage humain reproductif, etc.), tout en tenant compte des diversités culturelles et des spécificités de chaque société. C'est à ce prix que le progrès pourra continuer à être au service de l'homme et non le contraire.

Conclusion

Pour reprendre la proposition du Mouvement universel de la responsabilité scientifique que préside Jean Dausset, il ne peut être question d'arrêter, voire de ralentir cet élan instinctif vers la connaissance qui constitue l'honneur de l'Homme. En conséquence, il ne saurait être question de limiter la recherche et l'avance scientifique car toute connaissance est une libération de nombreuses servitudes et c'est pour cela que le progrès existe bel et bien. En revanche, c'est sur l'utilisation des connaissances qu'il faut porter notre réflexion et notre attention afin de toujours les restituer dans le respect du droit de l'être humain.

Ainsi, la science s'appuie sur l'éthique afin de soutenir le temple de la raison. L'équilibre n'est pas encore parfaitement trouvé car c'est un domaine évolutif. L'important est que l'on veuille bien garder une sage témérité. C'est l'humanisme scientifique qui est à l'ordre du jour.

Référence

1. Thibault C, Dauzier L (1960) Fertilysins and in-vitro fecundation of the rabbit egg. C R Hebd Seances Acad Sci 250: 1358-9

G. Tachdjian, O. Féraud,
C. Bas, A. Magniez,
N. Oudrhiri
et A.L. Bennaceur-Griscelli

Cellules souches embryonnaires et cellules pluripotentes induites, aspects biologiques et applications

Introduction

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) ont été dérivées à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes humains en 1998 (1). Grâce à leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation cellulaire potentielle dans tous les types de cellules du corps humain, ces CSEH ont révolutionné la recherche biomédicale ces dernières années. La technologie des CSEH a ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche fondamentale et dans les applications thérapeutiques en médecine. Les CSEH offrent donc la possibilité de développer des modèles cellulaires humains dans différents domaines de la recherche médicale tels que les maladies humaines et la pharmacologie.

Récemment, des techniques de reprogrammation cellulaire ont été décrites permettant la production de cellules pluripotentes induites (iPS) à partir de cellules somatiques (2). Comme les CSEH, ces cellules iPS peuvent se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme. Ainsi, cette technologie permet d'envisager la production de cellules pluripotentes à partir de cellules différenciées de patients de façon spécifique. Cependant, en dépit de son énorme potentiel, la technologie des cellules souches n'a pas encore conduit à de nouvelles thérapeutiques. Dix ans après la description de la première lignée de cellules souches embryonnaires humaines, les propriétés biologiques des CSEH sont toujours en cours d'exploration.

Dans cet article, nous décrivons la biologie des cellules souches embryonnaires humaines et les cellules pluripotentes induites ainsi que les perspectives d'applications de ces cellules en médecine.

types cellulaires fœtaux ou adultes. Quelques cellules de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste sont pluripotentes avec le potentiel de former toutes les cellules somatiques et germinales dans l'organisme. *In vivo*, cet état de pluripotence des cellules de la MCI est transitoire au cours du programme du développement embryonnaire qui dirige ces cellules vers la différenciation cellulaire. Cependant, ces cellules de la masse cellulaire interne peuvent être isolées et maintenues *in vitro* dans un état indifférencié et correspondre à ce que l'on appelle les cellules souches embryonnaires (3, 4). Les cellules souches embryonnaires ont été dérivées la première fois, en 1981, à partir de cellules de la MCI chez la souris par Martin (4) et par Evans et Kaufman (3). En 1998, les cellules souches embryonnaires humaines ont été dérivées à partir d'embryons surnuméraires obtenus par fécondation *in vitro* (1). Les cellules souches embryonnaires expriment des marqueurs spécifiques, tels que des antigènes embryonnaires spécifiques, des activités enzymatiques (phosphatase alcaline, télomérase) et des gènes de pluripotence tels qu'OCT4 et NANOG qui sont rapidement réprimés au cours de la différenciation. Sous certaines conditions de culture cellulaire, les cellules souches embryonnaires peuvent proliférer de façon indéfinie dans un état indifférencié. Ces cellules souches embryonnaires gardent la capacité comme les cellules de la MCI de se différencier en n'importe quel type cellulaire. *In vivo*, ces cellules souches embryonnaires se différencient en tératomes qui correspondent à des tumeurs comportant des cellules différenciées provenant des trois feuillets embryonnaires endoderme, mésoderme et ectoderme. Les cellules souches embryonnaires humaines représentent donc une source illimitée de cellules ou de tissus pour la thérapie cellulaire.

Pluripotence

La pluripotence correspond au fait qu'une cellule souche a la capacité de se différencier dans n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme. Les cellules souches pluripotentes peuvent ainsi donner naissance à tous les

Cellules souches embryonnaires humaines

Dérivation des lignées CSEH

Il existe différentes sources de cellules souches humaines qui varient en fonction de leur potentiel de développement. Les cellules souches adultes multi-

potentes peuvent être dérivées de la moelle osseuse ou d'autres organes. Les cellules souches fœtales multipotentes peuvent être obtenues à partir du sang de cordon ombilical ou de tissus fœtaux humains (5).

Les CSEH pluripotentes proviennent d'embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro* réalisée pour la prise en charge des couples infertiles ou d'embryons atteints d'une maladie génétique détectée par le diagnostic génétique préimplantatoire.

La dérivation des premières lignées de CSEH a été initialement adaptée des techniques précédemment développées chez la souris (1). Pour établir une lignée de CSEH à partir de la MCI d'un blastocyste, le blastocyste est incubé avec de la pronase pour digérer la zone pellucide. Le blastocyste sans la zone pellucide est traité avec un anticorps antihumain total et du complément de porc. Cette méthode, appelée immunochirurgie, permet la lyse des cellules trophoblastiques par une réaction anticorps – complément. La MCI, ainsi isolée, est placée dans une boîte de culture cellulaire sur une couche nourricière composée de cellules fibroblastiques murines, dont l'activité mitotique a été inactivée. Les cellules de la MCI qui se développent sont ensuite transférées par dissection cellulaire mécanique dans de nouvelles boîtes de culture environ tous les sept jours. L'observation microscopique permet d'apprécier la morphologie du développement des CSEH (6). Le milieu de culture utilisé pour la culture des CSEH est basé classiquement sur le milieu de Dulbecco modifié selon Eagle et de milieu F12 (DMEM/F12 1:1) complété avec 20 % de substitut de sérum (*Knock Out Serum Replacer, Invitrogen*) et 10 ng/mL de facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), une cytokine permettant le maintien des CSEH en état d'autorenouvellement. À ce jour, la majorité des CSEH a été dérivée à partir de la méthode de dérivation classique (7) ou des alternatives n'utilisant pas l'immunochirurgie, telles la culture du blastocyste entier (8) ou la dissection laser (9). Les lignées de CSEH peuvent être maintenues en culture indéfiniment en gardant le potentiel de différenciation dans tous les types cellulaires humains y compris en cellules trophoblastiques. La dérivation et la mise à disposition des lignées de CSEH sont encadrées par des règles éthiques et légales dans la plupart des pays. En France, la recherche sur l'embryon est encadrée par la loi de bioéthique, et les autorisations de dérivation de CSEH et d'utilisation des CSEH en recherche sont données par l'Agence de la biomédecine.

Culture des lignées de CSEH

Le maintien en culture et l'amplification des CSEH sont des étapes cruciales dans l'étude des CSEH et

de leurs applications, car elles fournissent le matériel cellulaire initial pour toutes les étapes suivantes de la recherche. Pour permettre le maintien indifférencié et l'amplification des CSEH, les colonies cellulaires sont généralement cultivées sur des champs de fibroblastes murins. Les fibroblastes murins fournissent dans le milieu de culture des facteurs de croissance qui permettent la croissance indifférenciée des CSEH. Contrairement aux cellules souches embryonnaires murines, dont l'état indifférencié est maintenu par l'ajout de LIF dans le milieu de culture, le LIF humain ne permet pas aux CSEH de conserver leur état indifférencié (1).

La méthode la plus utilisée pour maintenir des CSEH dans un état indifférencié est l'amplification cellulaire par microdissection mécanique des cellules (6). Les colonies cellulaires sont découpées en petits morceaux, qui sont transférés dans de nouvelles boîtes de culture. Cette étape d'amplification cellulaire est répétée tous les cinq à sept jours. Les principaux avantages de la méthode de dissection mécanique est l'absence d'utilisation d'enzymes et la possibilité de sélectionner morphologiquement les CSEH à l'état indifférencié par rapport à des cellules en cours de différenciation dans les colonies cellulaires. La culture des CSEH peut se faire en l'absence de fibroblastes murins sur des matrices contenant des facteurs de croissance solubles (10). Des études ont montré que l'état indifférencié des CSEH peut être maintenu en utilisant la voie de signalisation Wnt (11), la combinaison de facteurs de croissance LIF, TGFβ1 (*transforming growth factor β1*) et bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (12), la combinaison de facteurs noggin et bFGF (13) ou des concentrations élevées de bFGF seul (14).

L'utilisation d'enzymes pour la dissociation cellulaire est plus simple et plus rapide que la microdissection mécanique des cellules. Différentes enzymes ont été utilisées pour l'amplification des CSEH telles que la collagénase IV, la trypsine ou la dispase. Des études ont suggéré que l'utilisation d'enzymes pour l'amplification des CSEH pourrait induire des altérations génétiques des CSEH durant la culture *in vitro* (15). Les mécanismes impliquant les conditions de culture cellulaire dans la survenue d'instabilités chromosomiques ne sont pas actuellement connus. Des progrès ont été réalisés pour le développement des conditions de culture et dans l'identification de molécules qui maintiennent l'autorenouvellement et la pluripotence des cellules (16). Un des développements important de la culture des CSEH est l'utilisation de milieux de culture ne contenant pas de substances d'origine animale. L'absence d'éléments d'origine animale est un élément important pour une utilisation en thérapeutique.

Concernant la cryoconservation des CSEH, plusieurs méthodes sont utilisées, telles que la vitrification des cellules (17) ou la congélation lente des cellules (18).

Caractérisation des CSEH

Les CSEH n'existent pas à l'état physiologique et correspondent donc à un artéfact de culture cellulaire *in vitro*. Les CSEH peuvent être maintenues indéfiniment en culture *in vitro*. Les cellules peuvent être conservées dans des banques pour servir de sources cellulaires pour la génération de différents types cellulaires humains. Les cellules différenciées à partir des CSEH peuvent être utilisées pour des applications *in vitro* ou pour des applications thérapeutiques futures.

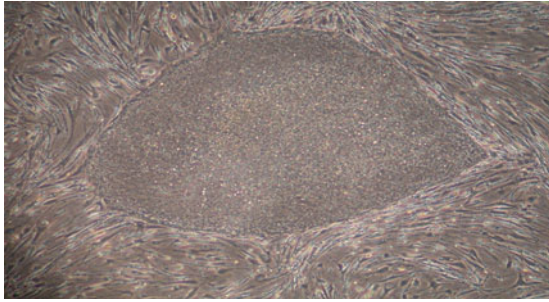


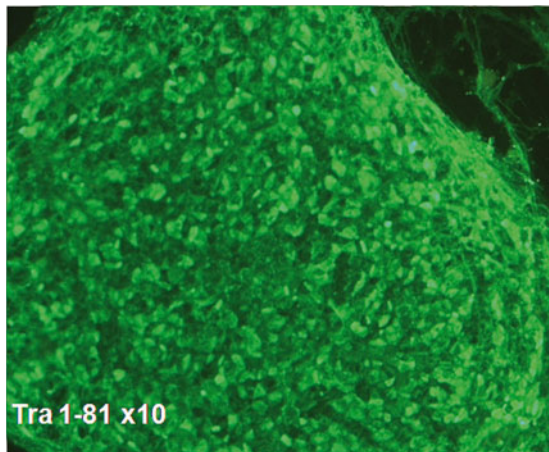
Fig. 1 – Aspect morphologique d'une colonie de cellules souches embryonnaires humaines.

Les CSEH peuvent être caractérisées phénotypiquement par leurs morphologies cellulaires et par les profils d'expression de leurs marqueurs (fig. 1). Les CSEH sont de petite taille, avec un rapport nucléocytoplasmique important et de larges nucléoles.

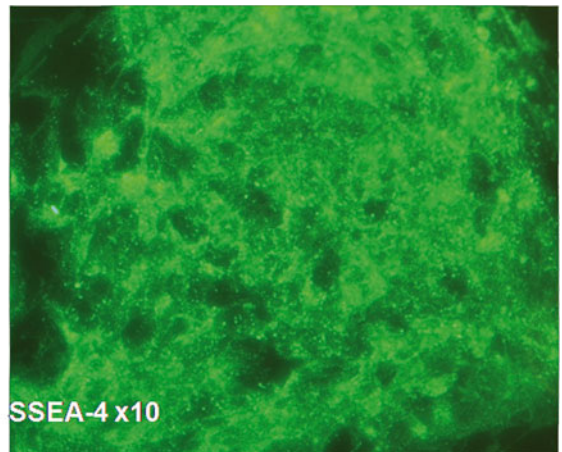
La morphologie des CSEH, qui ont une différenciation spontanée, présente des aspects cellulaires différents avec des modifications des limites des colonies cellulaires ou de la taille des cellules. Les CSEH en cours de différenciation présentent ainsi des colonies cellulaires avec des bordures différentes.

Les marqueurs cellulaires de surface spécifiques des CSEH sont SSEA-3 (*stage-specific embryonic antigen 3*), SSEA-4, TRA-1-60 (*tumor rejection antigen 1-60*) et TRA-1-81 (tableau I) (fig. 2).

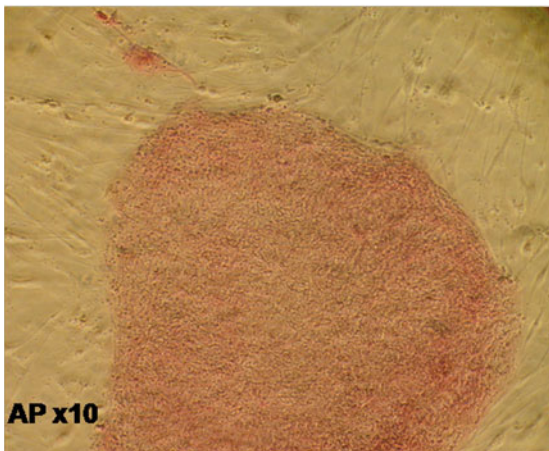
Ces marqueurs cellulaires disparaissent au cours de la différenciation cellulaire. Contrairement aux cellules souches embryonnaires murines, les CSEH n'expriment pas SSEA-1 (tableau I). Par ailleurs, les CSEH ont une activité phosphatase alcaline et une activité télomérase (1). Les CSEH expriment une combinaison de facteurs transcription spécifique : OCT-4 (*POU-domain transcription factor Octamer-4*), Nanog et Sox 2 (tableau I).



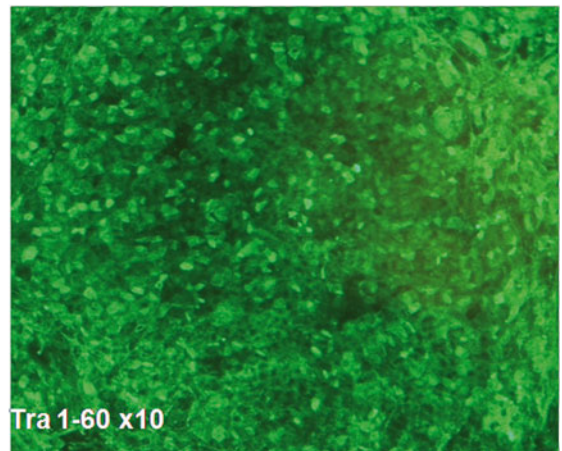
Tra 1-81 x10



SSEA-4 x10



AP x10



Tra 1-60 x10

Fig. 2 – Marqueurs cellulaires des cellules souches embryonnaires humaines [Tra-1-81, SSEA-4, phosphatase alcaline (AP), Tra-1-60].

Tableau I – Marqueurs cellulaires, cytokines et facteurs de transcription dans les cellules souches embryonnaires murines et humaines.

	Cellules ES murines	Cellules ES humaines
Marqueurs		
SSEA-1	+	-
SSEA-3	-	+
SSEA-4	-	+
Tra 1-60	-	+
Tra 1-81	-	+
Phosphatase alcaline	+	+
Cytokines		
LIF	+	-
FGF2	-	+
Facteurs de transcription		
Sox-2	+	+
Rex-1	+	+
Oct-4	+	+
Nanog	+	+

L'étude de la pluripotence fait partie de la caractérisation des CSEH et de leur contrôle de qualité. La pluripotence peut être analysée *in vitro* par la différenciation spontanée et la formation de corps embryoides (6). Les marqueurs de différenciation des trois feuillets embryonnaires sont ensuite analysés par immunocytochimie. La pluripotence est aussi analysée *in vivo* par la xénogreffe des CSEH dans des souris immunodéprimées. La xénogreffe de cellules pluripotentes va entraîner la formation de tératomes. L'étude histologique de ces tératomes, qui sont des tumeurs comportant différents tissus provenant des trois feuillets embryonnaires, montre par exemple la présence de tissus tels que muscle, cartilage, os (mésoderme), intestin, trachée (endoderme) et neurones (ectoderme) (19) marquant ainsi la pluripotence des CSEH originelles.

Génétique des CSEH

Il a été montré que des altérations génétiques peuvent survenir durant la culture des CSEH (20). *In vivo*, le taux de mutations spontanées dans une cellule somatique normale (contenant environ 3 x 10⁹ nucléotides) est de l'ordre de 10⁻⁷ à 10⁻⁸ par division cellulaire (21), soit environ 100 mutations par cellule à chaque cycle cellulaire. Certaines de ces mutations procurent aux cellules mutées un avantage sélectif qui leur permet de croître plus rapidement. *In vitro*, lors de la culture à long terme ce type d'avantage aboutit progressivement à la substitution des cellules non mutées initiales par les cellules porteuses de la mutation. Dès 2004, plusieurs études ont démontré que les conditions de culture classiques des cellules ES humaines *in vitro*, permettant le maintien

de leur état indifférencié, induisaient de façon non négligeable une instabilité chromosomique. Des trisomies des chromosomes 12, 17 ou X ont ainsi été mises en évidence très fréquemment (22, 23). L'hypothèse qui prévaut actuellement pour expliquer ce phénomène est que l'amplification de certains gènes qui se trouvent sur ces chromosomes confère un avantage sélectif aux cellules souches indifférenciées. Les mécanismes impliqués dans la survenue des anomalies chromosomiques dans les CSEH ne sont pas actuellement connus. L'instabilité chromosomique des CSEH en culture pourrait être due au type de cellules de coculture ou des matrices cellulaires utilisées, aux milieux de culture ou des techniques de dissociation cellulaire. Les anomalies chromosomiques actuellement le plus souvent observées correspondent à des trisomies, qui peuvent affecter la différenciation, la régulation du cycle cellulaire et la croissance cellulaire. La présence d'anomalies chromosomiques dans les CSEH soulève aussi le problème de leur utilisation en thérapeutique avec d'éventuels risques de cancérogenèse associés. L'étude cytogénétique des CSEH est donc indispensable dans le cadre des recherches sur les CSEH et de la validation des protocoles thérapeutiques.

L'étude cytogénétique fait donc partie du contrôle de qualité de la culture des CSE. Les méthodes utilisées pour l'analyse cytogénétique incluent les techniques de cytogénétique conventionnelle, d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) et l'hybridation génomique comparative (CGH) (fig. 3).

Les techniques de cytogénétique conventionnelle permettent de classer les chromosomes en fonction de leur profil de bandes. Le caryotype obtenu permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre ou des remaniements chromosomiques dont la taille est supérieure à 10 Mb. La technique de FISH utilise des sondes d'ADN spécifiques de régions chromosomiques ou de chromosome entier. Cette technique permet de mettre en évidence de façon ciblée l'absence ou la présence de plusieurs copies d'une région chromosomique dans le génome. La CGH permet une analyse globale du nombre de copies de séquences d'ADN (gains ou pertes) dans le génome. Son principe est de cohybrider un ADN total témoin normal avec l'ADN total à tester, chacun marqué par un fluorochrome différent, sur des métaphases normales. Elle permet ainsi de réaliser une analyse globale du génome sans *a priori* sur une région particulière du génome. Les variations de quantité d'ADN entre les deux échantillons (normal et testé) sont mesurées par les rapports des intensités de fluorescence des deux fluorochromes le long des chromosomes. La CGH sur puces à ADN cumule les avantages des techniques de FISH et de CGH sur chromosomes, en y ajoutant une meilleure sensibilité pour la détection des remaniements de petite taille, une plus grande précision dans la délimitation

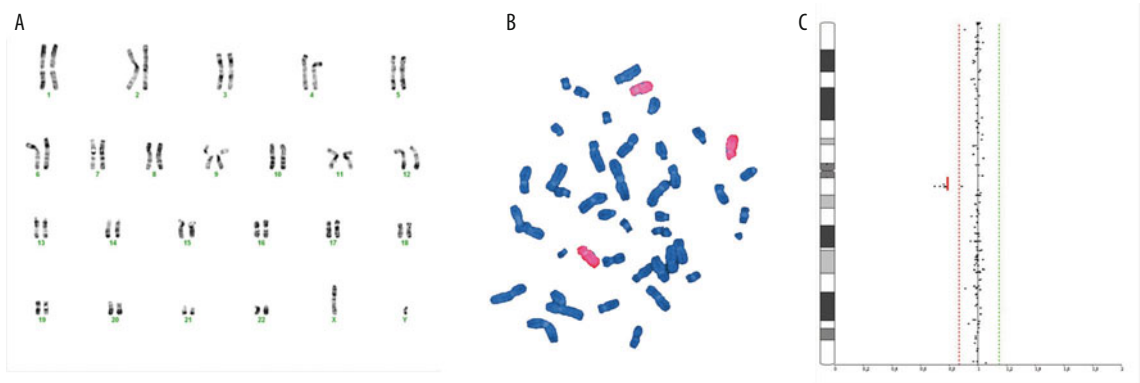


Fig. 3 – Étude cytogénétique des cellules souches embryonnaires humaines. A : caryotype 46, XY ; B : trisomie 12 en hybridation *in situ* fluorescente ; C : gain de la région 20q11.21 par microarrays CGH.

des régions d'ADN perdues ou gagnées. En utilisant cette technologie, il a ainsi été montré que les CSEH s'associent à la survenue d'instabilités génomiques avec de nouveaux « hot spots » impliquant des gènes favorisant l'autorenouvellement et possiblement la transformation tumorale (24). Ces techniques d'analyse des chromosomes dans les CSEH sont complémentaires. En effet, le caryotype présente une faible résolution d'analyse des chromosomes, la FISH ne permet pas l'analyse de tous les chromosomes et la CGH est incapable de détecter une translocation équilibrée, un faible mosaïcisme ou une triploïdie.

La variabilité observée dans le potentiel de différenciation des différentes lignées de CSEH disponibles suggère des différences dans le statut transcriptionnel et épigénétique. Les mécanismes épigénétiques dans les CSEH font intervenir la méthylation de l'ADN ou la modification des histones. Des variations épigénétiques ont été observées entre les lignées de CSEH, en particulier au niveau des gènes soumis à empreinte sur le chromosome X dans les lignées CSEH féminines (25). La survenue de modifications épigénétiques au cours de la culture des CSEH peut poser des problèmes quant à leur utilisation en médecine (26). Les variations épigénétiques sont une explication aux différences phénotypiques observées entre les lignées de CSEH. L'étude du chromosome X a ainsi montré des variabilités d'expression dans les CSEH (27).

Cellules pluripotentes induites (iPS)

Une des grandes avancées récentes dans le domaine de la recherche dans les cellules souches a été la découverte que l'introduction de plusieurs gènes peut induire la pluripotence dans les cellules somatiques. Le groupe de recherche dirigé par Shinya Yamanaka de l'université de Kyoto a montré que des cellules somatiques murines transduites par des virus rétroviraux avec quatre facteurs de transcription Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4 peuvent reprogrammer

une cellule somatique dans un état génétique comparable à celui des cellules souches embryonnaires (2). En surexprimant de façon transitoire différentes combinaisons de 24 gènes connus pour être impliqués dans la pluripotence des CSE murines, Takahashi et Yamanaka ont identifié ces quatre facteurs de transcription dont l'expression est suffisante pour produire des cellules semblables aux CSEH (2).

Ces cellules ont été dénommées cellules pluripotentes induites (iPS). Ces cellules ont des propriétés similaires aux cellules souches embryonnaires en termes de marqueurs d'expression, d'activité transcriptionnelle et de la possibilité de différenciation dans différents tissus des trois feuillets embryonnaires (28). La relative simplicité avec laquelle les cellules iPS peuvent être obtenues fait de cette technique une approche très attractive pour étudier la reprogrammation nucléaire et l'utilisation potentielle en clinique. Par exemple, des cellules iPS ont été utilisées pour traiter la drépanocytose chez la souris (29).

En 2007, la génération d'iPS a été réalisée à partir de la transfection de cellules somatiques humaines par les équipes de Shinya Yamanaka et James Thomson (30, 31). Ces cellules iPS humaines exprimaient les marqueurs de cellules souches embryonnaires humaines et étaient capables de se différencier dans des cellules des trois feuillets embryonnaires. Yamanaka *et al.* ont utilisé les mêmes quatre facteurs de transcription que dans leur étude chez la souris (30). Thomson *et al.* ont utilisé une nouvelle combinaison de quatre facteurs de transcription incluant OCT4, SOX2, NANOG et LIN28 (31). Ces découvertes ont donc montré qu'un nombre peu important de facteurs est nécessaire pour générer des cellules pluripotentes à partir de cellules différenciées et que ces mécanismes moléculaires sont conservés entre les espèces.

La cascade transcriptionnelle liée à l'expression de ces facteurs est actuellement peu connue (32).

La technologie des cellules iPS a entraîné une révolution dans la recherche sur les cellules souches. Ainsi, les cellules iPS ne nécessitent pas d'embryons humains pour leur production. Il est maintenant

possible de créer des modèles cellulaires de maladies humaines à partir de cellules différenciées de patients (33). Cette technologie ouvre la possibilité pour le développement d'une thérapie cellulaire personnalisée. Cependant, cette approche possède des limites pour son utilisation en médecine. La reprogrammation utilisant le gène c-Myc entraîne la formation de tumeurs chez la souris (34). Il a été cependant montré que c-Myc n'était pas absolument nécessaire pour la génération de cellules iPS mais avec une reprogrammation moins efficace, lorsque cet oncogène n'était pas utilisé (35). Un autre problème concerne le fait que la transfection de multiples copies des gènes peut induire des mutations aux sites d'insertion dans le génome et ainsi déréguler des gènes endogènes. La surexpression de ces gènes transfectés peut aussi poser un problème s'ils continuent de s'exprimer dans les tissus différenciés. En effet, une expression résiduelle dans quelques cellules différenciées peut être à l'origine d'un processus tumoral. Bien que les gènes transfectés soient silencieux dans la majorité

des cellules iPS, il existe une probabilité de réactivation de l'expression de ces gènes induisant de nouveau une pluripotence avec son risque tumoral. De nouvelles approches de reprogrammation utilisant des expressions transitoires des gènes ou de petites molécules ont été récemment décrites (36) mais leur efficacité reste encore à confirmer.

Applications

Les CSEH ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme. Les cellules différenciées à partir de CSEH pourraient être ainsi utilisées en thérapie cellulaire. La première étape dans la différenciation cellulaire à partir de CSEH est la formation de corps embryoides (fig. 4 et 5). Les corps embryoides correspondent à des structures cellulaires dans lesquelles se différencient les trois feuillets embryonnaires endoderme, mésoderme et ectoderme (19). Les CESH peuvent

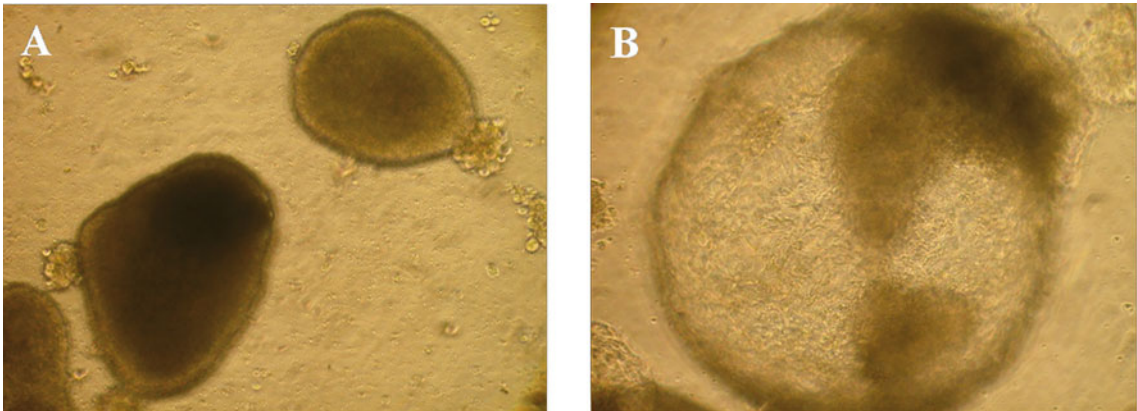


Fig. 4 – Corps embryoides après 3 jours (A) et 11 jours (B) de différenciation (grossissement x 10).

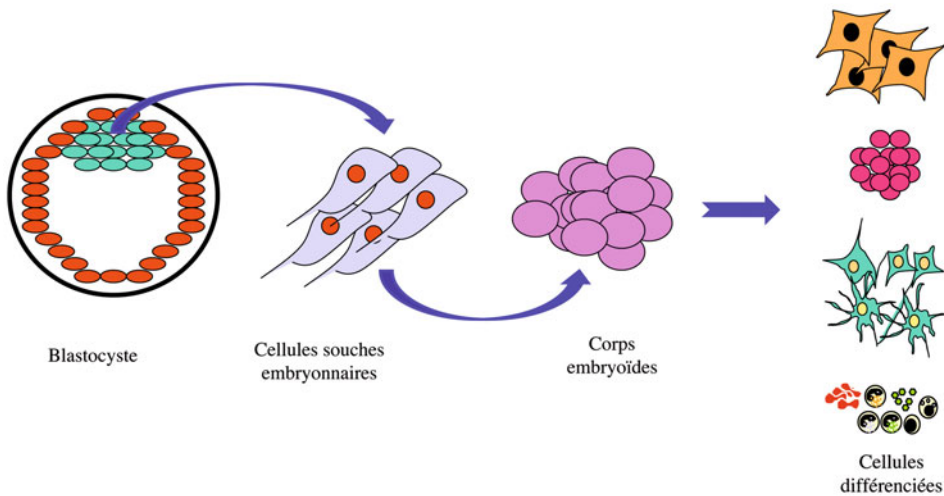


Fig. 5 – Origine des cellules souches embryonnaires et différenciation cellulaire.

ensuite, dans des milieux de culture appropriés, se différencier en cellules différenciées fonctionnelles de différents tissus, comme par exemple les cellules hépatiques, les neurones, les cellules hématopoïétiques... (37-48) (tableau II).

Les CSEH offrent aussi la possibilité d'étudier les mécanismes moléculaires du développement humain et des maladies humaines. La recherche sur la physiopathologie des maladies humaines est limitée par les modèles cellulaires utilisés. Le développement des CSEH, et en particulier des iPS, permet d'envisager de créer des modèles cellulaires humains pour n'importe quelle pathologie humaine.

La compréhension des mécanismes moléculaires de la prolifération et de la différenciation des CSEH s'est développée de façon importante ces dernières années. La caractérisation de ces mécanismes est un prérequis nécessaire pour une utilisation théra-

peutique. Les principaux axes de recherche sont la médecine régénératrice et la pharmacologie.

CSEH en médecine régénératrice

Une des applications potentielles les plus importantes est la génération de cellules et de tissus fonctionnels pour une thérapie cellulaire dédiée à la réparation des organes. La régénération des tissus lésés est limitée dans le corps humain. Seulement quelques tissus comme par exemple le foie, le sang et les vaisseaux ont une capacité de réparation cellulaire. Les CSEH pourraient donc être une source cellulaire pour remplacer les tissus lésés. Le principal argument du potentiel des CSEH est leur capacité à générer un nombre important de cellules humaines différenciées fonctionnelles (fig. 6).

Tableau II – Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines dans les cellules des trois feuillets embryonnaires.

Feuillet embryonnaire	Lignée cellulaire	Références
Ectoderme	Kératinocytes	37
	Cornée	38
	Neurones dopaminergiques	39
	Neurones moteurs	40
	Oligodendrocytes	41
Mésoderme	Ostéoblastes	42
	Chondrocytes	43
	Cardiomyocytes	44
	Cellules hématopoïétiques	45
	Cellules endothéliales	46
Endoderme	Cellules pancréatiques	47
	Hépatocytes	48

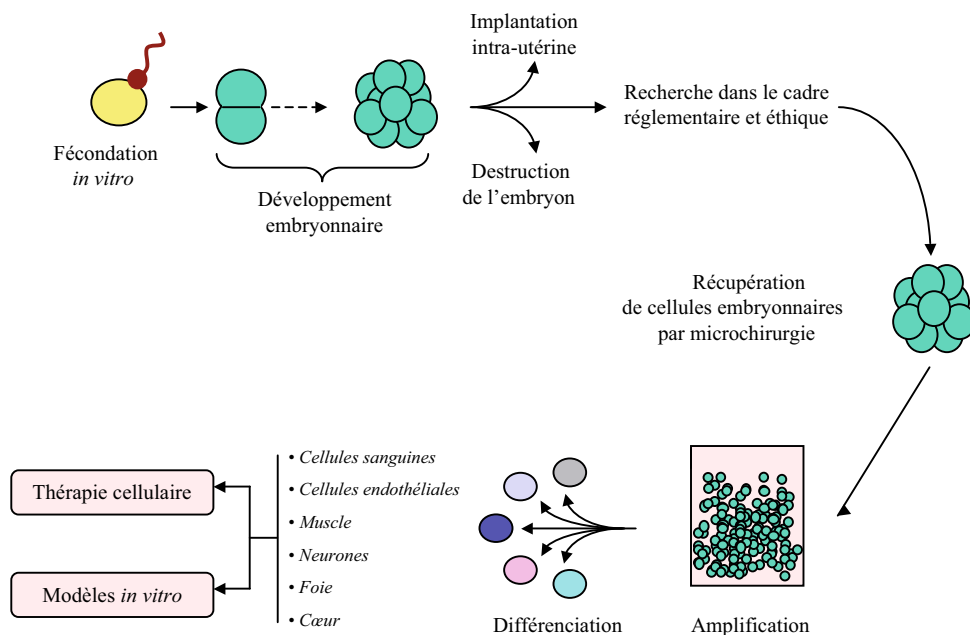


Fig. 6 – Production des cellules souches embryonnaires humaines et leurs applications.

Par ailleurs, les CSEH seraient moins susceptibles à un rejet immunitaire que les cellules adultes. Ces propriétés des CSEH permettent d'envisager une thérapie cellulaire pour des maladies diverses telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le diabète ou l'infarctus du myocarde.

CSEH en pharmacologie

Actuellement, la majorité des tests *in vitro* de toxicologie se fait sur des modèles cellulaires animaux. Les résultats obtenus dans ces expériences sont difficilement extrapolables entre espèces chez l'homme. Les organismes modèles diffèrent de l'homme pour de nombreux aspects, tels que par exemple la taille et la physiologie. La souris, qui est un des modèles animaux principaux utilisés, diverge d'un ancêtre commun avec l'homme il y a 75-80 millions d'années conduisant à des différences dans l'anatomie et la physiologie importantes, même aux stades précoces du développement (49). Les lignées cellulaires humaines obtenues, à partir de tissus cancéreux, sont les seules alternatives actuellement. Ces lignées cellulaires peuvent proliférer en culture mais ont une faible capacité de différenciation.

Perspectives

La dérivation des premières lignées de CSEH a été obtenue, il y a une dizaine d'années et bien que ces cellules offrent un potentiel thérapeutique, un certain nombre de problèmes n'ont pas été résolus pour les utiliser en médecine. Les conditions de culture des CSEH et les protocoles de différenciation doivent être standardisés. La stabilité génétique doit être contrôlée pour éviter, en particulier, un risque tumoral après injection des cellules chez un patient. La fonctionnalité des cellules différenciées doit être évaluée *in vitro* et *in vivo*. Les neurones obtenus à partir de cellules pluripotentes doivent pouvoir médier les signaux chimiques et électriques. Les cellules pancréatiques doivent pouvoir sécréter de l'insuline en réponse aux concentrations de la glycémie dans le sang. L'incompatibilité des cellules doit aussi être étudiée et il a été proposé une banque cellulaire pour répondre à la diversité HLA (50). Le développement des cellules pluripotentes induites pourrait résoudre le problème immunologique. Cependant, la dérivation des cellules iPS utilisant des transfections virales ne permet pas encore d'envisager une utilisation clinique.

Bien qu'un certain nombre de mécanismes cellulaires et moléculaires de la pluripotence et de la différenciation cellulaire soient inconnus, les CSEH et les iPS représentent un développement majeur de la biologie pour des applications thérapeutiques en médecine.

La recherche sur les CSEH est encore une discipline jeune. Cependant, cette recherche a avancé de façon significative depuis dix ans. Il paraît ainsi réalisable d'envisager à court terme la génération de cellules pluripotentes, de manière standardisée, pour des applications variées, y compris une utilisation clinique. Il est aussi important de développer en parallèle un contrôle de qualité pour les cellules pluripotentes produites.

Références

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS *et al.* (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7
2. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76
3. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
4. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by terato-carcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-8
5. Vats A, Bielby RC, Tolley NS *et al.* (2005) Stem cells. *Lancet* 366: 592-602
6. Heins N, Englund MC, Sjoblom C *et al.* (2004) Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 367-76
7. Amit M, Itskovitz-Eldor J (2002) Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200: 225-32
8. Kim HS, Oh SK, Park YB *et al.* (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23: 1228-33
9. Turetsky T, Aizenman E, Gil Y *et al.* (2008) Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 23: 46-53
10. Sjogren-Jansson E, Zetterstrom M, Moya K *et al.* (2005) Large-scale propagation of four undifferentiated human embryonic stem cell lines in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 233: 1304-14
11. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L *et al.* (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10: 55-63
12. Amit M, Margulets V, Segev H *et al.* (2003) Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 68: 2150-6
13. Wang G, Zhang H, Zhao Y *et al.* (2005) Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 934-42
14. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH *et al.* (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24: 568-74

15. Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM *et al.* (2005) Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 19-20
16. McDevitt TC, Palecek SP (2008) Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Curr Opin in Biotechnol* 19: 527-33
17. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO (2001) Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 16: 2187-94
18. Katkov II, Kim MS, Bajpai R *et al.* (2006) Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* 53: 194-205
19. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D *et al.* (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6: 88-95
20. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N *et al.* (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37: 1099-103
21. Kondrashov AS (2003) Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Hum Mutat* 21: 12-27
22. Draper JS, Smith K, Gokhale P *et al.* (2004) Recurrent gain of chromosome 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22: 53-54
23. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E *et al.* (2007) Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in-vivo. *Nat Biotechnol* 25: 207-15
24. Lefort N, Feyeux M, Bas C *et al.* (2008) Embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21 in the human. *Nat Biotechnol* 26: 1361-63
25. Shen Y, Matsuno Y, Fouse S *et al.* (2008) Inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4709-14
26. Allegrucci C, Denning C, Priddle H, Young I (2004) Stem-cell consequences of embryo epigenetic defects. *Lancet* 364: 206-8
27. Silva S, Rowntree R, Mekhoubad S, Lee J (2008) X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4820-5
28. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG *et al.* (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2: 151-9
29. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S *et al.* (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318: 1920-3
30. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-72
31. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K *et al.* (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-20
32. Kim J, Chu J, Shen X *et al.* (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132: 1049-61
33. Park IH, Arora N, Huo H *et al.* (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134: 877-86
35. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-7
36. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K *et al.* (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26: 101-6
37. Zhou H, Wu S, Joo JY *et al.* (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-4
38. Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP (2008) Retinoic Acid and Bone Morphogenetic Protein Signaling Synergize to Efficiently Direct Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26: 372-80
39. Ahmad S, Stewart R, Yung S *et al.* (2007) Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial like cells by in-vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25: 1145-55
40. Yan Y, Yang D, Zarnowska ED *et al.* (2005) Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23: 781-90
41. Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED *et al.* (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 215-21
42. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G *et al.* (2005) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25: 4694-705
43. Bielby RC, Boccacini AR, Polak JM, Buttery LD (2004) In-vitro differentiation and in-vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 10: 1518-25
44. Toh WS, Yang Z, Liu H *et al.* (2007) Effects of culture conditions and BMP2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25: 950-60
45. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91: 501-8
46. Chadwick K, Wang L, Li L *et al.* (2003) Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102: 906-15
47. Wang ZZ, Au P, Chen T *et al.* (2007) Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in-vivo. *Nat Biotechnol* 25: 317-8
48. Jiang J, Au M, Lu K *et al.* (2007) Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25: 1940-53
49. Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS *et al.* (2005) Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 643-55
50. Ostrer H, Wilson DI, Hanley NA (2006) Human embryo and early fetus research. *Clin Genet* 70: 98-107
51. Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S *et al.* (2005) Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366: 2019-25

O. Coll et V. Vernaève

Risque viral et prise en charge en assistance médicale à la procréation

Introduction

L'assistance médicale à la procréation (AMP) a pour but de traiter l'infertilité. Les cliniciens et biologistes impliqués ont une formation spécifique ayant pour but de dispenser les soins les plus adaptés possibles aux patients pris en charge. Il existe néanmoins un problème important qui se pose lorsque l'un des patients est porteur de certains virus qui peuvent être à l'origine d'infections chroniques et sévères, comme dans le cas du virus de l'immuno-déficience humaine (VIH), et de virus hépatotropes comme les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC). Ces infections peuvent véhiculer le risque d'une contamination du partenaire si celui-ci est séro-négatif, réduire les probabilités de survenue d'une grossesse et, potentiellement, être transmises à d'autres patients. Par conséquent, les centres d'AMP doivent avoir des protocoles spécifiques pour dépister les patients infectés et, dans ce cas, tout en les informant si besoin, éviter les transmissions sexuelles, mère-enfant et croisée. Des mesures universelles de prévention doivent être mises en place, si toutefois les centres décident de prendre en charge ces patients. Ce chapitre cherche à résumer les aspects plus importants de ce risque viral en AMP.

Prévalence

Le nombre estimé de personnes infectées dans le monde par le VHB est de 350 millions, 170 millions pour le VHC (1) et 33,4 millions pour le VIH (www.unaids.org). La prévalence de l'infection par VHB et VHC en Europe et aux États-Unis est de 2 % et 1,2 % respectivement. En France, 400 000 personnes sont infectées par le VIH. D'autres études montrent en France une prévalence chez la femme enceinte de l'antigène HBs (AgHBs) entre 0,54 et 1,56 % (2).

De nombreuses mesures ont été mises en place pour réduire le risque de transmission virale, à savoir : usage de préservatif, vaccins, thérapies antivirales et mesures sanitaires, mais le risque de primo-infection existe toujours chez les patients non infectés.

Transmission sexuelle et intrafamiliale

Le VIH et le VHB sont transmissibles par voie sexuelle. Les couples sérodiscordants pour le VIH doivent utiliser le préservatif lors des rapports, ce qui les rend fonctionnellement infertiles et doivent avoir recours à l'AMP pour obtenir une grossesse avec un risque minime de transmission. Les partenaires, y compris leurs contacts intrafamiliaux, des patients infectés par le VHB doivent être vaccinés. Il n'y a pas de transmission sexuelle du VHC, sauf en cas de co-infection par le VIH.

Transmission mère-enfant

En absence de mesures de prévention, le risque de transmission mère-enfant du VHB est de 2 à 15 % si la mère est AgHBe ou VHB-ADN négatif et de 80 à 90 % si ces deux marqueurs sont positifs. Si des mesures de prévention sont mises en place, la transmission mère-enfant est 5-15 % et se produit quasi exclusivement lorsque la mère est AgHBe positif (3). Le risque de transmission mère-enfant par le VHC est globalement de 1,7 %. Si l'ARN du VHC est détecté dans le sang de la mère (VHC-ARN positif), le taux de transmission vertical est de 4,3 %. Ce taux est de 19,4 % si la mère est co-infectée par le VIH. La transmission en cas de VHC-ARN négatif est exceptionnelle (4). Aujourd'hui, il n'existe pas de mesures spécifiques pour prévenir la transmission du VHC. Dans les pays industrialisés, grâce aux mesures de prévention, la transmission mère-enfant du VIH est passée de 14-25 % à 1-5 % avec une transmission exceptionnelle si toutes les mesures sont mises en place (5).

Vaccins

Depuis de nombreuses années, il existe un vaccin très efficace pour prévenir l'infection par le VHB. Cependant, pour le VIH et le VHC, celui-ci ne sera pas disponible avant plusieurs années.

Choix reproductif

Les patients porteurs de ces infections chroniques ont le même désir de procréation que les sujets non infectés. Comme déjà dit, il y a des thérapies très efficaces dans de nombreux cas pour éviter ou diminuer les complications sévères des patients infectés par le VHC et le VHB. Ainsi et grâce aux thérapies antirétrovirales, les patients VIH ont une espérance de vie très élevée. Selon les données de la cohorte danoise, la survie au moment du diagnostic est de 51 ans supplémentaires de vie pour les patients VIH positifs et VHC négatifs (6).

Santé sexuelle et reproductive des patients infectés par le VIH

Aujourd'hui, ces patients ont les mêmes droits reproductifs que les sujets non infectés, donc la médecine doit donner une issue favorable au désir procréatif de ces patients. Ainsi, selon l'OMS et le *United Nations Population Fund* (UNFPA), les pays ont l'obligation légale de promouvoir et protéger les droits liés à la santé sexuelle et reproductive des infectés par le VIH. Les autorités sanitaires doivent garantir que les patients infectés aient accès aux centres qui peuvent les traiter sans les pénaliser de par leur infection.

Conseil prénatal

En cas d'infection virale, l'équipe médicale doit informer les couples des dérives potentielles de leurs infections. Lors du consentement éclairé, ces circonstances spécifiques, doivent être discutées clairement.

Fertilité chez l'homme avec infection virale

VHB et VHC

Les infections par le VHB et VHC ne semblent pas avoir d'impact direct sur le spermogramme ni sur la fertilité. Le VHB peut être retrouvé dans le sperme des hommes infectés (7), mais il n'y a pas d'études sur l'efficacité de son élimination par lavage. Nous pratiquons un lavage sans vérification ultérieure

de la présence de l'ADN du VHB de l'échantillon obtenu, comme pour le VHC. L'existence du vaccin contre le VHB rend moins nécessaire cette vérification, mais il est indispensable de stocker les spermatozoïdes déjà lavés pour réduire le risque potentiel de contamination croisée. Le risque de transmission sexuelle du VHC est négligeable, sauf si l'homme est co-infecté par le VIH (8) et sa transmission en AMP n'a pas été décrite. On retrouve le VHC par réaction d'amplification en chaîne (PCR) dans 11 % à 30 % d'échantillons de sperme de patients infectés (9-11). Ces études suggèrent que le traitement du sperme, par gradients et lavages successifs, élimine toujours le VHC (11, 12). Ces résultats démontrent que la technique est efficace pour éliminer les acides nucléiques du VHC et mettent en cause le besoin de réaliser de façon systématique la recherche de l'ARN de ce virus par PCR à la suite du lavage (12). Les altérations de la qualité du sperme liées au VHB et VHC semblent nulles ou minimales, mais une étude approfondie suggère une augmentation de l'apoptose et/ou la nécrose des spermatozoïdes des hommes infectés par rapport aux sujets contrôlés (13).

VIH

Les rapports sexuels sont aujourd'hui la voie principale de transmission du VIH. De nombreux facteurs modulent ce risque. Le VIH est présent dans l'éjaculat des hommes infectés et des cas de transmission du VIH et VHB par insémination intra-utérine (IIU) ont été rapportés dans le passé (14). Selon une étude américaine, le risque d'infection par IIU utilisant un sperme de donneur entre 1986 et 2004 était de 1 sur 25 000 (*Chlamydia*, etc.) et seulement une infection par VIH avait été rapportée. Cela indique que dans les conditions présentes, le risque de transmission par IIU du VIH, VHB et VHC est tout à fait négligeable (15).

En 1992, Semprini a rapporté les premiers cas d'insémination après lavage du sperme chez les couples sérodiscordants (16). Le but de la technique, qui consiste à réaliser un gradient de densité et ensuite un *swim-up*, est d'obtenir des spermatozoïdes mobiles non infectés et surtout d'éliminer le plasma séminal qui peut contenir des particules virales libres et les cellules rondes potentiellement infectées (17). Actuellement, une partie de la préparation spermatique est utilisée pour la validation virologique (l'ADN proviral et l'ARN) et le reste pour la technique choisie d'AMP. Les tests de PCR utilisés pour la détection du VIH-1 sur le plasma ou les cellules séminales ont été développés par les différentes équipes, puisqu'il n'y a pas de tests commerciaux à appliquer au sperme. Les seuils de détection ont évolué lors de ces dernières années.

Le seul contrôle de qualité sur le seuil a été réalisé dans le réseau CREAThe (18). Malheureusement, cette technique de lavage puis tests PCR consomme beaucoup de spermatozoïdes et d'autres méthodes ont été développées pour réduire les pertes de gamètes (19).

La fertilité spontanée de l'homme infecté par le VIH est inconnue. Les taux rapportés d'oligozoospermie sévère et azoospermie sont comparables à ceux décrits dans la population d'hommes VIH négatifs et faibles (2 % et 1 % respectivement). La fertilité naturelle de ces couples paraît aussi normale. Une série récente, incluant 22 couples, dont l'homme était traité par traitements antirétroviraux et ayant eu au moins un rapport non protégé (plus thérapie postexposition pour la femme) a montré que le taux de grossesse avait été très élevé à la suite de trois rapports puisque plus de 50 % des femmes étaient enceintes (20).

Les paramètres séminaux chez l'homme, infecté par le VIH depuis longtemps et non traité, ne semblent pas s'altérer (21). L'information sur l'impact de la thérapie sur la qualité du sperme et la fertilité est limitée et les études transversales donnent des résultats controversés (12, 18, 22). La seule étude longitudinale, qui évalue cet impact, montre seulement une réduction significative de la motilité spermatique. Il est connu que surtout certains antirétroviraux produisent une déplétion mitochondriale qui serait responsable de cette réduction de la motilité (21). Une étude française très récente a démontré une réduction du nombre de copies d'ADN mitochondrial des spermatozoïdes après usage de certains antirétroviraux (23).

Dans l'étude multicentrique européenne CREAThe, aucun cas de séroconversion VIH ni d'infection de la femme avait été rapporté à la suite d'un cycle d'AMP postlavage de sperme (0/967 femmes) (18). Le problème se pose dans les cas d'oligozoospermie sévère ou azoospermie. Deux équipes proposent des stratégies de prise en charge dans ces cas précis (24, 25).

Lavage du sperme versus rapports programmés chez les couples sérodiscordants pour le VIH

Un débat est en cours sur le besoin ou non de laver le sperme dans tous les cas pour prévenir la transmission du VIH à la femme. Le risque de transmission sexuelle des patients traités avec charge virale négative n'est pas connu mais il doit être faible. Les autorités sanitaires françaises et espagnoles recommandent aux patients concernés le recours systématique à l'AMP. En Suisse, un comité d'experts ne recommande plus l'usage du préservatif chez les hommes sous traitement antirétroviraux et avec suppression maintenue de la charge

virale mesurée dans le sang périphérique (20). Au Royaume-Uni, les experts recommandent l'usage de rapports sexuels non protégés dans le cas de couples, sélectionnés par leur statut immuno-infectieux, et désirant un enfant (26). Finalement, en Espagne, un groupe d'AMP de Madrid préconise aussi la conception naturelle dans ces cas-là (27). Les conditions de la prise en charge varient selon les pays et les différents protocoles. Pour les autorités sanitaires espagnoles, le message du recours aux rapports non protégés, dans certains cas, risque de modifier le message de l'utilisation systématique du préservatif. En France, le décret publié le 10 mai 2001 autorise la prise en charge de couples séropositifs dans des conditions particulières, par ailleurs coûteuses et chronophages, expliquant pour partie que peu de centres d'AMP la pratique. L'Espagne a édicté des recommandations provenant du ministère de la Santé et des sociétés scientifiques mais n'a pas légiféré (28).

Fertilité chez la femme infectée

VHC et VHB

Une étude rétrospective en FIV sur une série limitée de 13 couples sérodiscordants pour le VHB ou le VHC, comparée à 27 sujets contrôles (29), avait observé que les couples, avec l'un des conjoints infecté, avaient un taux cumulé de grossesses pendant la période de rapports sexuels nettement inférieurs aux contrôles. Englert a rapporté que les femmes infectées par le VHC ont une réponse ovarienne et un nombre d'embryons moindre que les femmes non infectées par ce virus, mais les taux de grossesse et d'implantation étaient similaires (30). Selon une étude asiatique récente sur un plus grand nombre de couples vivants dans une zone hyperendémique, les taux de grossesses et de naissances étaient supérieurs à ceux du groupe contrôle, ce d'autant plus lorsque les femmes étaient le partenaire séropositif pour le VHB (31). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Zhao (32). Dans notre expérience, et dans celles de la majorité des groupes, les taux de grossesse ne sont pas influencés par l'infection par le VHB.

L'existence d'un vaccin efficace fait que, du point de vue éthique, il n'existe aucune difficulté pour réaliser l'AMP chez les patients porteurs chroniques du VHB. La FIV classique a été considérée comme technique plus sûre que l'ICSI. En effet, certaines équipes contre-indiquent l'ICSI dans le cas d'hommes VHB positifs pour le risque théorique d'intégration de l'ADN du VHB dans le fœtus, ce qui n'est pas le cas de notre équipe. Un point

de controverse est que l'infection par le VHB a été retrouvée chez des enfants de mères non infectées (7, 33) soulevant l'hypothèse d'une transmission père-enfant. Un cas de transmission du père à l'enfant a d'ailleurs été confirmé par *direct sequencing* (34). Ces données doivent être encore confirmées avec plus d'études sur le VHB dans le génome des gamètes et embryons. Cela pourrait servir à établir des recommandations claires sur ce point précis, de façon à éviter ou non l'ICSI chez les couples VHB sérodiscordants et infertiles, dont l'homme est atteint.

VIH

Les couples où la femme est infectée par le VIH peuvent concevoir de façon naturelle. Ils doivent néanmoins être suivis et traités de façon adéquate. Si l'homme est non infecté, il est conseillé pour éviter la contamination de l'homme que le couple ait des rapports protégés et ensuite que la femme vide le sperme contenu dans le préservatif directement dans le vagin (auto-insémination).

Plusieurs études suggèrent que la femme infectée par le VIH a une fertilité réduite (35-37) et la présence d'une insuffisance ovarienne sévère a été décrite (38, 39). Notre expérience rapporte également un taux très élevé d'occlusions tubaires dans une cohorte de 130 femmes VIH positives avec désir d'enfant, probablement d'origine infectieuse dans le contexte du VIH (40).

Si la grossesse n'est pas obtenue de façon spontanée, le recours à l'AMP doit être envisagé.

Trois études de cohorte en FIV chez les femmes VIH positives appariées avec des femmes négatives pour le VIH, suggèrent que le taux de grossesse est nettement inférieur pour les femmes infectées (41-43). Notre étude montre que les femmes infectées ont un hypogonadisme subclinique médié par l'immunosuppression. Nous avons aussi décrit que les ovocytes des femmes infectées présentent une déplétion mitochondriale de 32 % par rapport à ceux des femmes non infectées (44), plus marquée chez les femmes n'ayant pas bénéficié d'une grossesse. Ce mécanisme expliquerait cette hypofertilité causée par les thérapies antirétrovirales. En effet, nous avons également décrit que cette réduction des taux de grossesses n'était pas observée chez les femmes VIH positives, receveuses d'ovocytes (42), ce qui renforce l'hypothèse de la résistance ovarienne puisque, dans cette population, les ovocytes sont naïfs du contact avec le VIH ou les molécules antirétrovirales.

Risque de transmission virale par virus congelé (sperme, ovocytes et embryons)

L'un des grands problèmes qui se posent en AMP est le risque de contamination virale d'une patiente à travers un embryon contaminé. Cela peut se produire directement par le sperme ou par l'ovocyte des patients infectés ou bien de façon croisée par un problème de manipulation dans le laboratoire ou par la contamination croisée entre gamètes ou embryons cryopréservés. Ces risques de transmission « nosocomiale », pendant les procédures d'AMP, ont récemment été décrits en détail (14). Dans le monde animal où les procédures sont beaucoup plus nombreuses, très peu de cas de transmission ont été rapportés probablement grâce aux précautions mises en place.

Le risque clinique de contamination croisée a largement été considéré à la suite de la découverte d'un cas de transmission du VHB par greffe de moelle osseuse cryopréservée en azote liquide (45). Ce risque inquiète beaucoup les autorités sanitaires.

Aucun cas de transmission virale n'a été décrit en don d'ovocytes, ni frais ni congelés, ni en don d'embryons. Mais le risque théorique de transmission par virus congelés justifie les mesures de laboratoire. Du point de vue théorique, le sperme, les ovocytes et les embryons peuvent être contaminés/infectés par de nombreux micro-organismes pendant la cryopréservation.

Les agents infectieux peuvent survivre dans l'azote liquide. Certains composants du milieu de culture et les cryoprotecteurs peuvent être stabilisants pour les micro-organismes. Les paillettes et/ou cryotubes de spermes et/ou embryons ne sont parfois pas étanches (risque de rupture ou *leakage*) et les agents infectieux peuvent circuler dans ce milieu. Les systèmes de congélation (paillettes, cryotubes, etc.) doivent être évalués et leur risque de rupture ou fuite doit être le plus réduit possible. Jusqu'à présent, la majorité des gamètes et/ou embryons potentiellement contaminés par un virus ont été cryopréservés par congélation lente dans des dispositifs fermés. Cependant, la congélation par vitrification, réputée plus efficace en système ouvert, expose les cellules directement à l'azote liquide. Cela risque de les contaminer par des agents infectieux potentiellement présents dans l'azote liquide. La vitrification par les systèmes fermés réduirait ce risque théorique, mais la performance de ces systèmes quant à la survie/viabilité des gamètes et/ou embryons traités est inférieure. Ceci reste encore à résoudre.

Il faut éviter de congeler du sperme total et les gamètes/embryons, provenant des patients infectés, doivent être stockés dans des containers d'azote liquide distincts pour chaque type d'infection. Une alterna-

tive à l'azote liquide, avec moins de risque de contamination, est l'azote gazeux. Les résultats de survie des gamètes/embryons potentiellement infectés par des virus après décongélation est similaire (14) mais ce genre de stockage n'est pas sans poser certaines questions, comme par exemple la stabilité de la température lors de stockage à long terme. Enfin, les containers d'azote doivent être décontaminés avec un désinfectant efficace de manière régulière, même si cela est une procédure très lourde. Les laboratoires d'AMP doivent avoir leurs guides de bonnes pratiques basées sur les lois et les guides d'associations professionnelles comme l'*European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE). Ces guides doivent inclure l'ensemble des recommandations et procédures associées à la prévention de la transmission d'agents infectieux aux autres patients et au personnel de laboratoire.

Dépistage des infections virales

Toutes les circonstances, déjà décrites, et la gravité de ces infections rendent indispensable le dépistage systématique de tous les patients infertiles (hommes et femmes) avant toute prise en charge en AMP.

La présence d'une infection chronique ne contre-indique pas la réalisation d'actes d'AMP, mais demande (i) que les équipes médicales aient l'expertise nécessaire et (ii) que le laboratoire ait mis en place des circuits de manipulation et congélation des échantillons. La durée de la validité des tests doit être établie de façon générale par les autorités sanitaires ou par les centres. Cela est en cours de débat actuellement en Europe. En cas de couple sérodiscordant, pour n'importe quelle infection, la politique de dépistage doit être différente et aussi préétablie. L'interprétation de certains résultats peut être complexe et peut nécessiter une consultation spécifique du microbiologiste ou du spécialiste en médecine interne, surtout avant de communiquer au patient un résultat, source d'un grand impact émotionnel.

Les donneurs de gamètes doivent être évalués et les patients porteurs d'une infection doivent être exclus des programmes. Le fait que des transmissions de VIH par IUI aient été rapportées implique qu'il soit conseillé de répéter les tests chez le partenaire séronégatif au bout de six mois avant l'utilisation des spermatozoïdes congelés (quarantaine). L'existence de tests plus performants rendrait envisageable un raccourcissement de la durée de la quarantaine, mais les autorités sanitaires doivent légiférer dans ces circonstances.

Dans le cadre du don d'ovocytes, il est accepté que la quarantaine ne soit pas observée. Le don n'est

que de quelques cellules qui ne sont pas infectées et aucun cas de transmission virale dans cette situation n'a été rapporté. Grâce à la performance de la vitrification ovocytaire et au potentiel des banques d'ovocytes, cette situation pourrait changer dans un futur proche, par le risque lié aux systèmes ouverts de vitrification, en contact avec l'azote.

Enfin, dans certains cas, il existe une infection « occulte » du VHB qui est définie par la persistance du l'ADN du VHB dans le foie ou le sang, sans la présence de l'antigène de surface (1). Selon une étude sur donneurs de sang, 1 sur 42 000 donneurs en Espagne était porteur « occulte » du VHB (46). Il est envisageable que, dans le futur, les donneurs et ensuite les patients devront être testés pour la présence d'ADN du VHB par PCR.

Conclusion

Les infections virales doivent être systématiquement dépistées chez les couples pris en charge en AMP, afin de réduire le risque de contamination concernant potentiellement le partenaire séronégatif. Un circuit viral dédié doit être clairement identifié. La cryoconservation des gamètes et/ou embryons doit se faire dans des conditions, là aussi sécurisée. Ces infections peuvent avoir un impact sur la reproduction surtout chez la femme séropositive pour le VIH. Si l'homme est infecté, les mesures d'élimination du virus du sperme sont aujourd'hui très efficaces.

Références

1. Fung J, Lai C, Yuen M (2009) Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clin Microbiol Infect* 15: 964-70
2. Bacq Y (2008) Hepatitis B and pregnancy. *Gastroenterol Clin Biol* 32: S12-9
3. Steyaert SR, Leroux-Roels GG, Dhont M (2000) Infections in IVF: review and guidelines. *Hum Reprod Update* 6: 432-41
4. Indolfi G, Resti M (2009) Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 81: 836-43
5. Coovadia H (2009) Current issues in prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* 4: 319-24
6. Sogaard O, Lohse N, Gerstoft J *et al.* (2009) Mortality after hospitalization for pneumonia among individuals with HIV, 1995-2008: a Danish cohort study. *PLoS One* 4: e7022
7. Qian W, Tan Y, Chen Y *et al.* (2005) Rapid quantification of semen hepatitis B virus DNA by real-time polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 11: 5385-9
8. Wyld R, Robertson J, Brett R *et al.* (1997) Absence of hepatitis C virus transmission but frequent transmission of HIV-1 from sexual contact with doubly-infected individuals. *J Infect* 35: 163-6
9. Pasquier C, Bujan L, Daudin M *et al.* (2003) Intermittent detection of hepatitis C virus (HCV) in semen from men

- with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HCV. *J Med Virol* 69: 344-9
10. Halfon P, Giorgetti C, Bourlière M *et al.* (2006) Medically assisted procreation and transmission of hepatitis C virus: absence of HCV RNA in purified sperm fraction in HIV co-infected patients. *AIDS* 20: 241-6
 11. Bourlet T, Lornage J, Maertens A *et al.* (2009) Prospective evaluation of the threat related to the use of seminal fractions from hepatitis C virus-infected men in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 24: 530-5
 12. Garrido N, Meseguer M, Remohí J *et al.* (2005) Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV) -seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod* 20: 1028-34
 13. Moretti E, Federico M, Giannerini V, Collodel G (2008) Sperm ultrastructure and meiotic segregation in a group of patients with chronic hepatitis B and C. *Andrologia* 40: 173-8
 14. Bielanski A, Vajta G (2009) Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 24: 2457-67
 15. Broder S, Sims C, Rothman C (2007) Frequency of postinsemination infections as reported by donor semen recipients. *Fertil Steril* 88: 711-3
 16. Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M *et al.* (1992) Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 340: 1317-9
 17. Quayle A, Xu C, Mayer K, Anderson D (1997) T-lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa are a significant source of immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 176: 960-8
 18. Bujan L, Hollander L, Coudert M *et al.* (2007) Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThe network. *AIDS* 21: 1909-14
 19. Politch J, Xu C, Tucker L, Anderson D (2004) Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil Steril* 81: 440-7
 20. Tandler-Schneider A, Sonnenberg-Schwan U, Gíngelmaier A *et al.* (2008). Diagnostics and treatment of HIV-affected couples who wish to have children. *Eur J Med Res* 13: 546-51
 21. Van Leeuwen E, Wit F, Repping S *et al.* (2008) Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS* 22: 637-42
 22. Nicopoulos JD, Almeida PA, Ramsay JW, Gilling-Smith C (2004) The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Hum Reprod* 19: 2289-97
 23. Pavili L, Daudin M, Moinard N *et al.* (2010) Decrease of mitochondrial DNA level in sperm from patients infected with human immunodeficiency virus-1 linked to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Fertil Steril* (in press)
 24. Bujan L, Daudin M, Moinard N *et al.* (2007) Azoospermic HIV-1 infected patients wishing to have children: proposed strategy to reduce HIV-1 transmission risk during sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection: Case Report. *Hum Reprod* 22: 2377-81
 25. Bostan A, Vannin AS, Emiliani S *et al.* (2008) Development and evaluation of single sperm washing for risk reduction in artificial reproductive technology (ART) for extreme oligospermic HIV positive patients. *Curr HIV Res* 6: 461-5
 26. Fakoya A, Lamba H, Mackie N *et al.* (2008) British HIV Association, BASHH and FSRH Guidelines for the management of the sexual and reproductive health of people living with HIV infection 2008. *HIV Med* 9: 681-701
 27. Barreiro P, Castilla JA, Labarga P, Soriano V (2007) Is natural conception a valid option for HIV-serodiscordant couples? *Hum Reprod* 22: 2353-8
 28. Recomendaciones de la SPNS/GeSIDA/SEGO/AEP (2007) para el seguimiento de la infección por el VIH con relación a la reproducción, el embarazo y la prevención de la transmisión vertical
 29. Pirwany I, Phillips S, Kelly S *et al.* (2004). Reproductive performance of couples discordant for hepatitis B and C following IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 21: 157-61
 30. Englert Y, Moens E, Vannin A *et al.* (2007) Impaired ovarian stimulation during in-vitro fertilization in women who are seropositive for hepatitis C virus and seronegative for human immunodeficiency virus. *Fertil Steril* 88: 607-11
 31. Lam P, Suen S, Lao T *et al.* (2010) Hepatitis B infection and outcomes of in-vitro fertilization and embryo transfer treatment. *Fertil Steril* 93: 480-5
 32. Zhao E, Chen S, Sun L *et al.* (2007) Influence of chronic HBV infection in the husband on the outcome of IVF-ET treatment. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27: 1827-9
 33. Huang J, Huang T, Qiu H *et al.* (2002) Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 4: 209-12
 34. Wang S, Peng G, Li M *et al.* (2003) Identification of hepatitis B virus vertical transmission from father to fetus by direct sequencing. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 106-13
 35. Zaba B, Gregson S (1998) Measuring the impact of HIV on fertility in Africa. *AIDS* 12: S41-S50
 36. DeSimone J, Pomerantz R, Babinchak T (2000) Inflammatory reactions in HIV-1 infected persons after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 133: 447-54
 37. Lo JC, Schambelan M (2001) Reproductive function in human immunodeficiency virus infection. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2338-43
 38. Clark RA, Mulligan K, Stamenovic E *et al.* (2001) Frequency of anovulation and early menopause among women enrolled in selected adult AIDS clinical trials group studies. *J Infect Dis* 184: 1325-7
 39. Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP *et al.* (2004) Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update* 10: 14962
 40. Coll O, Lopez M, Vidal R *et al.* (2007) Fertility assessment in noninfertile HIV-infected women and their partners. *Reprod Biomed Online* 14: 488-94
 41. Terriou P, Auquier P, Chabert-Orsini V *et al.* (2005) Outcome of ICSI in HIV-1 infected women. *Hum Reprod* 20: 2838-43
 42. Coll O, Suy A, Figueras F *et al.* (2006) Decreased pregnancy rate after in-vitro fertilization in HIV-infected women receiving HAART. *AIDS* 20: 121-3
 43. Martinet V, Manigart Y, Rozenberg S *et al.* (2006) Ovarian response to stimulation of HIV-positive patients during IVF treatment: a matched, controlled study. *Hum Reprod* 21: 1212-7
 44. López S, Coll O, Durban M *et al.* (2008) Mitochondrial DNA depletion in oocytes of HIV-infected antiretroviral-treated infertile women. *Antivir Ther* 13: 833-8
 45. Tedder R, Zuckerman M, Goldstone A *et al.* (1995). Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346: 137-40
 46. Reesink H, Engelfriet C, Henn G *et al.* (2008) Occult hepatitis B infection in blood donors. *Vox Sang* 94: 153-66

J.-M. Antoine

Grossesses issues de l'AMP

Évaluation initiale de l'évolutivité de la grossesse

Elle repose successivement sur :

- le taux d'estradiol plasmatique de la phase lutéale du cycle FIV/ICSI (1) ;
- le dosage initial d'hCG plasmatique treize jours après le transfert embryonnaire : un taux bas d'hCG témoigne d'une masse trophoblastique réduite et est associé à une fréquence élevée de grossesses non évolutives (2) ;
- l'importance de l'élévation de l'hCG plasmatique entre deux dosages espacés de 48 heures, qui est également prédictive du taux d'accouchement dans tous les groupes d'âges, pour des élévations comprises entre 0 % et 100 % (3).

L'échographie précoce 5 semaines après insémination ou transfert embryonnaire précise les nombres de sacs et d'embryons visibles, leur localisation intra- et/ou extra-utérine, leur activité cardiaque, l'existence éventuelle de signes d'hyperstimulation ovarienne. À un stade plus tardif, une mesure de la longueur craniocaudale insuffisante pour le terme est également prédictive d'un risque augmenté de grossesse non évolutive (2).

La fréquence des fausses-couches est évaluée en moyenne à 29 % sur 148 494 grossesses AMP (4), allant de 22 % à 63 % en fonction de l'âge de la femme et du type d'AMP. Elle est liée à la fois :

- à des facteurs féminins : âge avancé qui augmente le taux d'aneuploïdies embryonnaires (5, 6), altération de la qualité ovocytaire (7), indice de masse corporelle (IMC) trop élevé ou trop faible (8) ;
- à des facteurs masculins, comme un niveau élevé de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (9) ;
- aux caractéristiques de la stimulation ovarienne : protocole court, mais qui est souvent utilisé chez des femmes plus âgées avec qualité ovocytaire altérée (2), protocole GnRH antagoniste (10). À l'inverse, une stimulation ovarienne légère réduit le taux d'aneuploïdie (11).

- au nombre d'embryons implantés après FIV/ICSI : la proportion de FCS complètes passe de 18,5 % en cas de grossesse unique à 2,5 % en cas de gémellaire ($p < 0,001$) (12).

Le risque de grossesse extra-utérine a été chiffré à 2,1 % sur 94 118 grossesses AMP (13). Il varie également avec :

- la technique d'AMP : significativement plus élevé après ZIFT (3,6 %) et plus bas après don d'ovocytes (1,4 %) ou gestation pour autrui (0,9 %) ;
- la cause de l'infertilité : tubaire (OR 2,0 par rapport à l'infertilité masculine pure - IC 95 % 1,7-2,4), endométriosique (OR 1,3-IC 95 % 1,0-1,6) ;
- la parité : le risque est réduit chez les femmes ayant déjà eu un enfant vivant (OR 0,6-IC 95 % 0,5-0,7) ;
- et la limitation à deux ou moins d'embryons transférés (OR 0,7-IC 95 % 0,5-0,9).

Les grossesses hétérotopiques (associant une localisation intra- et extra-utérine) sont très exceptionnelles en dehors de l'AMP. Elles comportent le plus souvent une implantation tubaire isthmique, dont le diagnostic est habituellement retardé. Après traitement de la localisation tubaire, l'évolution est superposable à celle des grossesses intra-utérines isolées, à l'exception d'avortements plus fréquents (14). D'autres localisations posent de difficiles problèmes thérapeutiques pour préserver la grossesse intra-utérine associée, comme les grossesses interstitielles après salpingectomie (15), cervico-isthmiques (16) ou cervicales (17, 18) à risque hémorragique majeur.

Problèmes spécifiques du diagnostic anténatal dans les grossesses AMP

Ce contexte est caractérisé par :

- un âge maternel plus élevé que pour les grossesses spontanées, facteur direct d'augmentation du risque d'aneuploïdie fœtale ;

- un âge paternel plus élevé, dont l'influence est considérée comme plus faible ;
- une datation très précise : la détermination de l'âge gestationnel en semaines de grossesse ou d'aménorrhée (en ajoutant 14 jours à la date de la ponction ovocytaire), ou incluant la longueur craniale-caudale, donne des résultats pratiquement équivalents pour le dépistage au 1^{er} trimestre (19). En revanche, une variation de seulement deux jours dans le calcul du terme induit des modifications non négligeables du taux de prématurité ;
- un taux réduit de « pregnancy-associated plasma protein-A » (PAPP-A) qui serait lié à une implantation plus souvent défectueuse et qui augmente le risque de faux positifs dans le dépistage de la trisomie 21 (20). Cette constatation est retrouvée en FIV et ICSI mais pas après transfert d'embryons congelés (21) ;
- une épaisseur de la clarté nucale plus faible qu'en cas de grossesse non-AMP : il est recommandé d'établir des courbes de valeurs normales spécifiques pour l'AMP (21).

Évolution des grossesses AMP en fonction du nombre de fœtus

Les grossesses multizygotiques résultent d'un développement plurifolliculaire en insémination intra-utérine ou d'un transfert d'au moins deux embryons en FIV/ICSI. Au cours des AMP faites en Europe en 2004, leur proportion restait encore de 23 % des grossesses obtenues (22). Il est clairement établi que le risque de complications périnatales augmente avec le nombre de fœtus : prématurité, hypotrophie fœtale, morbidité et mortalité périnatale. L'âge gestationnel et le poids de naissance sont les principaux facteurs de risque de mortalité périnatale et de handicaps.

Les grossesses triples et au-delà ont été bien limitées par la réduction du nombre des embryons transférés. Elles posent la question d'une éventuelle réduction embryonnaire. La voie abdominale vers 12-13 semaines d'aménorrhée est associée à moins de fausses couches complètes que la voie vaginale (3,5 % contre 13,3 % ; $p = 0,004$) et permet une réduction plus sélective après morphologie précoce (23).

Les grossesses gémeillaires après AMP ont un pronostic plutôt meilleur que les gémeillaires spontanées (24), sans doute du fait d'un suivi renforcé.

Les grossesses multiples réduites spontanément (« *vanishing twin* ») résultent de la disparition d'un ou plusieurs embryons après constatation de plusieurs activités cardiaques.

La libération d'une quantité majorée d'hCG et de PAPP-A modifie le résultat des marqueurs sériques et inquiète inutilement. Du fait d'une demi-vie

de 21 jours, il convient de dater l'événement et de différer le prélèvement de six semaines, ce qui peut conduire exceptionnellement au-delà du délai maximum de 17 semaines. Une autre solution consiste à doser l'hCG et l'estriol, puisque la loi française exige deux marqueurs plasmatiques.

Par rapport aux grossesses doubles ou uniques d'emblée, les risques de prématurité et de petit poids de naissance sont plus élevés pour les fœtus restants (25, 26). Ils sont attribués à une gêne fonctionnelle sur le site de l'implantation initialement multiple (27). Ces constatations suggèrent l'intérêt de les éviter dans le cadre de la prévention générale des grossesses multiples.

Les grossesses uniques après AMP sont également associées à des taux d'accouchements prématurés et de petits poids de naissance augmentés (28-31), expliqués principalement par des caractéristiques parentales (30). La très importante étude norvégienne sur 1 200 922 grossesses uniques spontanées et 2 546 grossesses uniques AMP montre dans le 2^e groupe un poids de naissance plus faible de 25 grammes, une durée de gestation plus courte de deux jours et une augmentation des risques de retard de croissance intra-utérin et de mortalité périnatale (31). Les grossesses uniques obtenues par les mêmes femmes de façon spontanée ou après AMP présentent des risques de petit poids de naissance et de prématurité non significativement différents. Le risque de mortalité périnatale devient même plus faible après AMP, suggérant que ces risques sont attribuables essentiellement aux facteurs d'infertilité et non à l'AMP. D'autres travaux ont suggéré que le pronostic obstétrical n'est pas modifié en cas d'infertilité inexplicée (32), mais qu'il existe plus de petits poids de naissance chez les enfants de femmes avec ovaires polykystiques (33), plus d'accouchements prématurés et de retards de croissance intra-utérins chez les femmes avec endométriose ovarienne (34). L'hypothèse est un endomètre anormal avec perturbations de la décidualisation, de l'angiogenèse et de la placentation. Cet effet délétère sur l'évolution des grossesses n'est pas retrouvé dans les autres formes d'endométriose. Une recherche chez l'animal a permis d'observer, en cas de grossesses AMP, un métabolisme et une *clearance* placentaire des stéroïdes plus élevés, cause supposée d'une incidence plus élevée de petits poids de naissance (35).

Grossesses après techniques particulières d'AMP

Après congélation d'embryons, plusieurs études montrent une aussi bonne, voire meilleure, évolution en termes d'accouchements prématurés et de petit poids de naissance chez les enfants nés après congélation d'embryons par rapport à ceux résultant d'embryons

frais (36, 37). L'étude australienne indique un poids de naissance plus élevé et un taux d'accouchement prématuré plus bas qu'après GIFT, FIV et ICSI avec transfert d'embryons frais (38). Ces données suggèrent que les techniques biologiques de FIV/ICSI ne sont pas en cause, mais que des modifications liées à l'hyperstimulation ovarienne (absente en cas de transfert d'embryons congelés) pourraient affecter la réceptivité endométriale, l'implantation ou les stades initiaux de la grossesse. Il n'existe pourtant pas de liens entre les paramètres de la stimulation ovarienne et le poids de naissance en FIV (39). S'agirait-il d'un poids excessif après congélation embryonnaire, à rapprocher des travaux de Dulouist (40) montrant chez les souris obtenues après congélation embryonnaire un poids supérieur à l'âge adulte ?

Après vitrification d'ovocytes, avec ou sans maturation *in vitro* ou *in vivo*, des données préliminaires ne semblent pas non plus montrer d'effets péjoratifs sur l'évolution de la grossesse (41, 42).

Après don d'ovocytes, c'est l'âge de la donneuse qui doit être pris en compte en diagnostic anténatal. S'il est inconnu, il est nécessaire de faire plusieurs calculs de simulation sur différents âges supposés. Certains ne retrouvent pas d'augmentation du risque obstétrical chez les receveuses d'ovocytes âgées (43). Pour d'autres, les receveuses ont un risque plus élevé d'hypertension artérielle gravidique qu'en FIV classique, ce risque étant maximal (42 %) chez les receveuses de moins de 35 ans (44). La grossesse doit même être considérée à très haut risque obstétrical et maternel en cas de syndrome de Turner, terrain particulier de malformations cardiaques et d'hypertension artérielle (45, 46) : fausses couches en rapport avec l'hypoplasie utérine, disproportions fœto-pelviennes conduisant à une majorité de césariennes, surtout HTA sévère, pré-éclampsie et dissection aortique avec risque de mortalité maternelle non négligeable. Un bilan préconceptionnel complet, le transfert d'un seul embryon et une surveillance cardiovasculaire spécifique en particulier au 3^e trimestre et en post-partum immédiat sont formellement recommandés (47).

Après accueil d'embryons, les résultats sont apparemment comparables à ceux de la FIV classique (48).

Après maturation in vitro des ovocytes, il est observé une augmentation du risque de fausses couches par rapport à la FIV/ICSI, lié aux cas d'ovaire polykystiques pris en charge plutôt qu'à la technique elle-même (49), mais pas de risque additionnel pour la suite de la grossesse par rapport à la FIV/ICSI (50).

de l'âge maternel et des facteurs d'infertilité pour les grossesses uniques.

Plusieurs mesures préventives sont nécessaires pour les réduire :

- campagnes d'information incitant les femmes à concevoir à un âge jeune ;
- limitation de l'intensité des stimulations ovariennes au juste nécessaire ;
- développement des transferts d'embryon unique.

Références

1. Ganesh A, Goswami S, Chattopadhyay R *et al.* (2009) Luteal phase estradiol level: a potential predictive marker for successful pregnancy in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 91: 1018-22
2. Porat S, Savchev S, Bdolah Y *et al.* (2007) Early serum beta-human chorionic gonadotropin in pregnancies after in-vitro fertilization: contribution of treatment variables and prediction of long-term pregnancy outcome. *Fertil Steril* 88: 82-9
3. Shamonki MI, Frattarelli JL, Bergh PA, Scott RT (2009) Logarithmic curves depicting initial level and rise of serum beta human chorionic gonadotropin and live delivery outcomes with in-vitro fertilization: an analysis of 6,021 pregnancies. *Fertil Steril* 91: 1760-4
4. Farr SL, Schieve LA, Jamieson DJ (2007) Pregnancy loss among pregnancies conceived through assisted reproductive technology, United States, 1999-2002. *Am J Epidemiol* 165: 1380-8
5. Thum MY, Abdalla HI, Taylor D (2008) Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in-vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 90: 315-21
6. Kushnir VA, Frattarelli JL (2009) Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI. *J Assist Reprod Genet* 26: 93-7
7. Weghofer A, Barad D, Li J, Gleicher N (2007) Aneuploidy rates in embryos from women with prematurely declining ovarian function: a pilot study. *Fertil Steril* 88: 90-4
8. Veleva Z, Tiitinen A, Vilska S *et al.* (2008) High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Hum Reprod* 23: 878-84
9. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23: 2663-8
10. Bahceci M, Ulug U, Sismanoglu A *et al.* (2009) Early pregnancy loss rates were different among singleton gestations conceived by ICSI using GnRH agonist and antagonist. *J Assist Reprod Genet* 20 26: 227-9
11. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ *et al.* (2007) Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 22: 980-8
12. Lambers MJ, Mager E, Goutbeek J *et al.* (2007) Factors determining early pregnancy loss in singleton and multiple implantations. *Hum Reprod* 22: 275-9
13. Clayton HB, Schieve LA, Peterson HB *et al.* (2006) Ectopic pregnancy risk with assisted reproductive technology procedures. *Obstet Gynecol* 107: 595-604
14. Clayton HB, Schieve LA, Peterson HB *et al.* (2007) A comparison of heterotopic and intrauterine-only pregnancy outcomes after assisted reproductive technologies in the United States from 1999 to 2002. *Fertil Steril* 87: 303-9
15. Blazar AS, Frishman GN, Winkler N (2007) Heterotopic pregnancy after bilateral salpingectomy resulting in

Conclusion

Les principaux risques résultent soit des techniques d'AMP pour les grossesses multiples, soit

- near-term delivery of a healthy infant. *Fertil Steril* 88: 1676
16. Hsieh BC, Seow KM, Hwang JL *et al.* (2008) Conservative treatment of cervico-isthmic heterotopic pregnancy by fine needle aspiration for selective embryo reduction. *Reprod Biomed Online* 17: 803-5
 17. Fruscalzo A, Mai M, Löbbeke K *et al.* (2008) A combined intrauterine and cervical pregnancy diagnosed in the 13th gestational week: which type of management is more feasible and successful? *Fertil Steril* 89: 456
 18. Shah AA, Grotegut CA, Likes CE 3rd *et al.* (2009) Heterotopic cervical pregnancy treated with transvaginal ultrasound-guided aspiration resulting in cervical site varices within the myometrium. *Fertil Steril* 91: 934
 19. Gjerris AC, Loft A, Pinborg A *et al.* (2008) First-trimester screening in pregnancies conceived by assisted reproductive technology: significance of gestational dating by oocyte retrieval or sonographic measurement of crown-rump length. *Ultrasound Obstet Gynecol* 32: 612-7
 20. Amor DJ, Xu JX, Halliday JL *et al.* (2009) Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod* 24: 1330-8
 21. Gjerris AC, Loft A, Pinborg A *et al.* (2009) First-trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI. *Ultrasound Obstet Gynecol* 33: 8-17
 22. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP. European IVF-monitoring (EIM) Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2008) Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 23: 756-71
 23. Timor-Tritsch IE, Bashiri A, Monteagudo A *et al.* (2004) Two hundred ninety consecutive cases of multifetal pregnancy reduction: comparison of the transabdominal versus the transvaginal approach. *Am J Obstet Gynecol* 191: 2085-9
 24. Boulet SL, Schieve LA, Nannini A *et al.* (2008) Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study. *Hum Reprod* 23: 1941-8
 25. Pinborg A, Lidegaard O, Freiesleben NC, Andersen AN (2005) Vanishing twins: consequences of vanishing twins in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod* 20: 2821-29
 26. Pinborg A, Lidegaard O, Freiesleben NC, Andersen AN (2007) Vanishing twins: a predictor of small-for-gestational age in IVF singletons. *Hum Reprod* 22: 2707-14
 27. Van Oppenraaij RH, Jauniaux E, Christiansen OB *et al.* (2009) Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: a review. *Hum Reprod Update* 15: 409-421
 28. Kallen B, Finnstrom O, Nygren KG *et al.* (2005) In-vitro fertilisation in Sweden: obstetric characteristics, maternal morbidity and mortality. *BJOG* 112: 1529-35
 29. De Geyter C, De Geyter M, Steimann S *et al.* (2006) Comparative birth weights of singletons born after assisted reproduction and natural conception in previously infertile women. *Hum Reprod* 21: 705-15
 30. Nygren KG, Finnström O, Källén B, Olausson PO (2007) Population-based Swedish studies of outcomes after in vitro fertilisation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 86: 774-82
 31. Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A *et al.* (2008) Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 372: 737-43
 32. Isaksson R, Gissler M, Tiitinen A (2002) Obstetric outcome among women with unexplained infertility after IVF: a matched case-control study. *Hum Reprod* 17: 1755-61
 33. Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Maliqueo M *et al.* (2005) Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 20: 2122-6
 34. Fernando S, Breheny S, Jaques AM *et al.* (2009) Preterm birth, ovarian endometriomata, and assisted reproduction technologies. *Fertil Steril* 91: 325-30
 35. Collier AC, Miyagi SJ, Yamauchi Y, Ward MA (2009) Assisted Reproduction Technologies Impair Placental Steroid Metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116: 21-8
 36. Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E *et al.* (2008) Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. *Hum Reprod* 23: 2227-38
 37. Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C *et al.* (2009) Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 24: 2158-72
 38. Shih W, Rushford DD, Bourne H *et al.* (2008) Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod* 23: 1644-53
 39. Griesinger G, Kolibianakis EM, Diedrich K, Ludwig M (2008) Ovarian stimulation for IVF has no quantitative association with birthweight: a registry study. *Hum Reprod* 23: 49-54
 40. Duloust E, Toyama K, Busnel MC *et al.* (1995) Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 589-593
 41. Chian RC, Huang JY, Tan SL *et al.* (2008) Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 16: 608-10
 42. Chian RC, Huang JY, Gilbert L *et al.* (2009) Obstetric outcomes following vitrification of in-vitro and in-vivo matured oocytes. *Fertil Steril* 91: 2391-8
 43. Krieg SA, Henne MB, Westphal LM (2008) Obstetric outcomes in donor oocyte pregnancies compared with advanced maternal age in in-vitro fertilization pregnancies. *Fertil Steril* 90: 65-70
 44. Keegan DA, Krey LC, Chang HC, Noyes N (2007) Increased risk of pregnancy-induced hypertension in young recipients of donated oocytes. *Fertil Steril* 87: 776-81
 45. Ohl J (2008) Don d'ovocytes et syndrome de Turner. *Gynecol Obstet Fertil* 36: 888-90
 46. Fénichel P, Letur H (2008) Procréation et syndrome de Turner : quelles recommandations avant, pendant et après la grossesse ? *Gynecol Obstet Fertil* 36: 891-7
 47. Keenan J, Finger R, Check JH *et al.* (2008) Favorable pregnancy, delivery, and implantation rates experienced in embryo donation programs in the United States. *Fertil Steril* 90: 1077-80
 48. Buckett WM, Chian RC, Dean NL *et al.* (2008) Pregnancy loss in pregnancies conceived after in-vitro oocyte maturation, conventional in-vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 90: 546-50
 49. Buckett WM, Chian RC, Holzer H *et al.* (2007) Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in-vitro maturation, in-vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 110: 885-91

M. Bonduelle

Enfants issus de l'AMP

Introduction des nouveaux traitements de la fertilité

Depuis la naissance de Louise Brown en 1978, la fécondation *in vitro* (FIV) est devenue un traitement largement utilisé partout dans le monde.

Bien que de grandes craintes aient été émises lors de l'introduction de la FIV, aucune évaluation formelle et systématique des conséquences de cette technologie de pointe n'a été mise en place et relativement peu d'études sur les enfants ont été entreprises. Progressivement, la FIV a été acceptée comme une technique sûre, principalement sur base des informations recueillies dans des registres de données rétrospectives. Lorsque la technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) a été introduite par le groupe belge dirigé par le Professeur Van Steirteghem, elle a été d'emblée considérée comme présentant certains risques (1). L'ICSI est en effet une technique plus invasive que la FIV classique, puisqu'un spermatozoïde est injecté à travers la membrane ovocytaire et qu'une fécondation peut être obtenue à partir d'un spermatozoïde qui ne serait, dans les circonstances habituelles, pas apte ou pas suffisamment mûr pour obtenir une fécondation. Initialement, l'indication majeure de l'ICSI était la stérilité masculine sévère. De nos jours cependant, les indications se sont élargies et comprennent des échecs répétés de FIV, des taux de fécondation bas et bien d'autres.

Rapidement après son introduction, l'ICSI a été utilisée partout dans le monde, et différentes initiatives sont nées en vue de rassembler des données concernant les enfants nés suite à son utilisation. De plus en plus d'attention a été accordée aux effets secondaires possibles chez les enfants nés après ICSI ainsi qu'après FIV et des études contrôlées prospectives sur le devenir des enfants ont été initiées (2-4). À ce jour, plus de 3 500 000 enfants sont nés de par le monde après utilisation des techniques de procréation médicalement assistée

(PMA) (5) et 1-3 % des enfants nés dans les pays développés ont été conçus par PMA (6, 7).

En parallèle avec la FIV et l'ICSI, d'autres techniques nouvelles sont devenues pratiques courantes comme la cryopréservation d'embryons, appliquée avec succès pour la première fois en 1983 par Trounson (8) et, plus récemment, la technique de vitrification (refroidissement ultrarapide). D'autres procédures plus invasives, comme le diagnostic préimplantatoire génétique (DPI), ont permis l'identification et l'exclusion d'embryons génétiquement anormaux, mais elles impliquent une manipulation significative de l'embryon (9).

D'autre part, les indications des différentes techniques de PMA se sont élargies et sont en évolution constante. Alors que l'ICSI avait été introduite dans le cadre de la stérilité masculine sévère, elle est maintenant devenue une technique standard dans de nombreux centres, même s'il n'a pas été prouvé qu'elle était toujours une meilleure alternative à la FIV classique. Dans la mesure où le transfert d'embryons unique est devenu le « golden standard », chaque centre devrait disposer d'un programme de cryopréservation optimal, probablement remplacé progressivement par un programme de vitrification, dans la mesure où il apparaît que cette dernière approche permet une meilleure survie des embryons. Récemment, ont également été initiés des programmes de vitrification des ovocytes, dans le cadre de la préservation de la fertilité en cas de traitement anticancéreux, ou permettant même le stockage des ovocytes et donc de différer l'âge de la reproduction, pour des raisons sociales.

Interrogations en FIV et en ICSI : le risque génétique et épi-génétique

Lors de l'introduction de l'IVF, un certain nombre d'inquiétudes sont apparues et les données animales suggéraient un risque possible dû aux techniques de culture *in vitro*. Les problèmes concernés étaient :

un environnement hormonal modifié, la perte du mécanisme de sélection à l'égard d'un spermatozoïde morphologiquement anormal, et des mutations ponctuelles dues à diverses expositions de nature chimique au cours de la procédure *in vitro*. Dès 1993, il était clair, suite aux données obtenues en recherche animale, que la culture des embryons préimplantatoires pouvait affecter le développement fœtal et l'expression de l'empreinte génétique (10).

Lors de l'introduction de l'ICSI, deux types de risques furent mentionnés par différents auteurs : les risques dépendants de la procédure d'ICSI et les facteurs de risques indépendants. Concernant les facteurs de risques ICSI-indépendants, il n'y a aucun doute que les spermatozoïdes utilisés en ICSI ont des taux plus élevés d'anomalies (chromosomiques ou monogéniques) qui, à leur tour, peuvent avoir un effet adverse sur le développement embryonnaire, par exemple des taux élevés d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes et un risque accru de transmettre une maladie génétique préexistante, ou de transmettre des anomalies génétiques en relation avec le problème de fertilité. Une inquiétude majeure était aussi le contournement du processus de sélection naturelle puisque l'ICSI permet de surmonter différentes étapes nécessaires au processus de fécondation normale. Cependant, d'autres chercheurs sont persuadés que même dans les conceptions naturelles, il n'y a pas de sélection naturelle du spermatozoïde (11).

La micro-injection d'un spermatozoïde porteur d'une anomalie chromosomique est probablement la cause majeure d'une incidence plus élevée d'anomalies chromosomiques chez les fœtus. Le risque ICSI-dépendant, en relation avec la procédure elle-même, qui implique la pénétration de la zone pellucide et du cytoplasme ovocytaire, pourrait impliquer une série de problèmes comme une lésion de la structure interne de l'ovocyte conduisant à une aneuploïdisation et à un risque accru d'anomalies chromosomiques. On pourrait également craindre l'injection de facteurs de nature biochimique ou étrangère, ou de DNA exogène associé au spermatozoïde.

En vue de détecter un risque accru associé au mécanisme susmentionné, un examen systématique des enfants devrait être mise en place, à la recherche des anomalies congénitales, des syndromes malformatifs, des anomalies du caryotype et des problèmes d'infertilité future éventuelle. L'évaluation des possibles mécanismes génétiques ou épi-génétiques, de l'état de santé à long terme, de l'incidence du cancer pendant l'enfance, du développement mental et du comportement.

Le problème des grossesses multiples

Il ne fait aucun doute que le facteur ayant l'impact le plus important sur le déroulement de la gros-

sesse, l'accouchement, le suivi néonatal et le développement ultérieur est le fait que la grossesse soit unique ou multiple. Ceci est vrai, que la grossesse ait été obtenue spontanément ou après traitement de fertilité. Le nombre de fœtus et la zygosité sont les prédicteurs de risque les plus importants, et ce risque d'effet néfaste au niveau néonatal augmente de manière proportionnelle au nombre de fœtus. Alors que dans les conceptions spontanées, le risque de grossesse multiple est approximativement de 1/100 grossesses, il est d'à peu près de 1 sur 4 en FIV en Europe (12) et ce taux est même plus élevé dans des pays comme les États-Unis (13). Les grossesses multiples sont accompagnées d'un risque augmenté de paralysie cérébrale, de difficultés d'apprentissage, de langage et de déficits neuro-comportementaux. C'est dans ce contexte que des règlements ont été introduits dans de nombreux pays, limitant le nombre d'embryons transférés et visant à la promotion du transfert d'embryons unique (*single embryo transfer*, SET) (14).

Risques concernant le déroulement de la grossesse et le devenir périnatal

Le déroulement des grossesses et l'état de santé des enfants sont les deux plus importants paramètres de succès de la PMA. Après l'introduction de la FIV, il est apparu rapidement que plus d'enfants naissaient prématurément et avec un faible poids de naissance. Alors que ces problèmes paraissaient initialement être en relation avec l'incidence accrue des grossesses multiples, il est apparu qu'ils étaient également plus fréquents dans les grossesses FIV uniques. Un nombre d'études contrôlées comparant les enfants uniques après FIV à ceux de la population générale a clairement montré une incidence accrue de prématurité, un poids de naissance plus faible et une incidence accrue de retard de croissance. Ces données ont été collectées dans trois méta-analyses (15-17) et ces rapports ont clairement montré que les enfants uniques nés après PMA (FIV, ICSI ou *gamete intra-fallopian transfer*, GIFT) avaient un risque doublé de naître avant terme et un risque augmenté de présenter un poids faible ou très faible (RR 1,70-1,77 et RR 2,70-3,00, respectivement) et de présenter plus fréquemment un retard de croissance (RR 1,40-1,60) (tableau I). Un risque direct entre l'infécondité des parents exprimée comme « le temps à obtenir une grossesse » a été démontré par de multiples observations : le risque d'accouchement prématuré augmente significativement (de 5,4 à 7,1 %) lorsque le temps à concevoir était d'au moins 4 ans, comparé à moins de 12 mois (18) ou si le temps à concevoir était supérieur à 12 mois, sans qu'un traitement de fertilité ait été utilisé (RR 1,6 95 % CI 1,0-2,7) (19) ; une

corrélation importante a également été notée entre un poids de naissance bas (moins de 2,5 kg) et un intervalle de temps à concevoir d'au moins 12 mois à plus de 5 ans (RR 1,9 95 % CI 1,3-2,8) (18). Les méta-analyses ont également démontré un risque accru de mort périnatale, de mort néonatale et d'admission dans une unité de soins intensifs néonataux pour les enfants uniques nés après PMA en comparaison avec ceux conçus spontanément (tableau I). L'intervalle de temps à concevoir paraît ici également jouer un rôle important (20). Une histoire d'infertilité, définie comme « toute mention dans le dossier médical d'une conception différée », ou d'une investigation pour « conception différée », est associée avec un risque accru de mort périnatale, quel que soit le type de traitement appliqué (RR 2-9 95 % CI 1,8-4,5) (20).

Enregistrement des anomalies congénitales

Les malformations congénitales surviennent au travers de trois mécanismes majeurs : génétique, responsable pour 15-25 %, environnemental pour environ 10 % (incluant les infections maternelles, les problèmes utéro-placentaires et l'exposition

maternelle à des drogues et à d'autres toxines) et des maladies multifactorielles (effets combinés de facteurs génétiques et environnementaux) responsables pour 20-25 %. Parmi les maladies génétiques, une majorité est en relation avec des anomalies chromosomiques (10-15 %), tandis qu'une minorité est en relation avec des défauts d'un seul gène (2-10 %). D'autres mécanismes, comme des problèmes d'empreinte, sont une cause mineure de syndromes comprenant des anomalies congénitales multiples comme le syndrome de Beckwith-Wiedemann.

L'observation des anomalies congénitales majeures n'est pas une tâche simple. Des taux différents de malformations ont été rapportés chez les enfants PMA. Ces taux de malformations ont été comparés à ceux des enfants nés après conception naturelle, pour lesquels les données sont colligées dans un registre. Pour un certain nombre de raisons cependant, il n'est pas possible de comparer ces banques de données (21). Dans les paragraphes suivants, nous tenterons d'analyser les problèmes rencontrés lors de l'interprétation des différentes études.

Différents types de facteurs de risques

Lorsque les enfants nés après PMA sont comparés à des enfants de la population générale ou d'un groupe contrôle sélectionné à partir de la population générale, différents types de facteurs de risques peuvent être présents dans les deux populations. Parmi ces facteurs de risques, des variables démographiques (comme l'âge maternel, le nombre d'années d'infertilité, la parité, l'exposition à des agents environnementaux, le tabagisme et la consommation d'alcool, la classe sociale) et l'état de santé général peuvent être différents. Le background génétique peut également être différent dans les deux populations et peut être exprimé par le nombre de fausses couches, précoces ou tardives, le nombre de fœtus ou d'enfants malformés, les complications de la grossesse et des accouchements prématurés. Les maladies génétiques ou les malformations chez les parents ou parmi leurs proches peuvent également être variables (22).

De plus, les traitements de PMA eux-mêmes peuvent influencer l'issue des grossesses. La stimulation ovarienne contrôlée elle-même (sans autre traitement de fertilité) a été incriminée pour être responsable d'une légère augmentation du taux de malformations (23).

Pièges dans l'enregistrement des anomalies congénitales

Des biais d'observation peuvent survenir lorsque les enfants PMA, qui séjournent plus souvent dans des unités néonatales, sont examinés de manière plus exhaustive et par des médecins mieux formés. Une

Tableau I – Devenir périnatal des enfants uniques nés après PMA *versus* les enfants nés après grossesse spontanée.

	Jackson <i>et al.</i> (16)	McGovern <i>et al.</i> (17)	Helmerhorst <i>et al.</i> (15)
Nombre d'études	15	27	17
	Odds Ratio (IC 95 %)	Risk Ratio (IC 95 %)	
Mortalité périnatale	2,19 (1,61-2,98)		1,68 (1,11-2,55)
Enfants nés très prématurément			3,27 (2,03-5,28)
Enfants nés prématurément	1,95 (1,73-2,20)	1,98 (1,77-2,22)	2,04 (1,80-2,32)
Faibles poids de naissance	1,77 (1,40-2,22)		1,70 (1,50-1,92)
Très faibles poids de naissance	2,70 (2,31-3,14)		3,00 (2,07-4,36)
Dysmaturité	1,60 (1,25-2,04)		1,40 (1,15-1,71)

Mortalité périnatale : né vivant et décès dans la première semaine de vie.
Enfants nés prématurément : < 37 semaines – Très prématurément : < 32 semaines.

Faibles poids de naissance : < 2 500 g – Très faibles poids de naissance : < 1 500 g.

Dysmaturité : poids de naissance < percentile 10 pour l'âge gestationnel.

surestimation des taux d'anomalies peut se produire de cette manière. Différentes définitions et différents systèmes de classification peuvent être utilisés pour classer une malformation comme étant de type majeur ou de type mineur (ou non considérée comme une malformation) et ceci même si des systèmes de codage standardisés sont utilisés, comme la classification internationale des maladies (International Classification of Diseases ICD). Des directives additionnelles ou des définitions nécessaires pour classer les malformations en majeur ou mineur peuvent être différentes d'une étude à l'autre. Les malformations mineures peuvent être prises en considération ou pas. Lorsque les résultats de la PMA sont comparés à ceux de la population générale, il est préférable de séparer les anomalies détectées au niveau prénatal (chez les enfants mort-nés ou après interruption de grossesse pour anomalies fœtales), des malformations décelées à la naissance, sans quoi un biais de détection peut être présent. La durée de la période de suivi au cours de laquelle les malformations sont observées influencera le taux de malformations, dans la mesure où approximativement 30 % des anomalies congénitales jusqu'à l'âge d'un an sont enregistrés au-delà du premier mois de vie. La période de temps au cours de laquelle le groupe d'étude et le groupe contrôle sont examinés devrait être identique de manière à limiter le nombre de changements mineurs dus à des variables temporelles. La taille de l'échantillon doit être adéquate pour permettre des conclusions significatives. La proportion d'enfants perdus pour le suivi devrait rester minimale pour éviter de biaiser les taux d'anomalies observés. Les groupes contrôles doivent être comparables et sélectionnés en fonction de caractéristiques similaires pour un nombre de paramètres démographiques et sanitaires maternels.

Évaluation des études majeures publiées

La plupart des études examinant la prévalence des malformations congénitales présentent de sérieuses limitations méthodologiques. La méta-analyse de Hansen a identifié 25 articles sur les malformations congénitales qui rencontraient des critères de qualité suffisants concernant l'intention, la méthode, les définitions d'anomalies et un ajustement pour les facteurs de confusion (24). Seuls sept de ces articles rencontraient les critères supplémentaires concernant la taille de l'échantillon, que la même méthode de diagnostic des anomalies ait été utilisée pour le groupe exposé et le groupe non exposé, que l'observation soit aveugle, que l'intensité de l'observation soit similaire entre les groupes, que les données soient assorties pour des facteurs potentiels de confusion dans l'analyse. La plupart de ces sept articles avait un échantillon

large et les déficits de naissance avaient été analysés de manière aveugle pour ce qui concernait la méthode de conception. Les résultats de la méta-analyse pour les 25 et pour les sept études montraient un accroissement statistiquement significatif de 30-40 % d'anomalies associées avec la PMA en comparaison avec les conceptions spontanées. Dans le groupe sélectionné, un RR de 2,01 (95 % CI 1,49-2,69) était calculé alors que dans le groupe total un RR de 1,32 (95 % CI 1,20-1,45) était calculé (tableau II). Après ajustement pour l'âge maternel, la parité, le sexe de l'enfant, le RR était de 1.29 (95 % CI 1,19-1,39) (dans 19 études sélectionnées). Lorsque seule la FIV était prise en considération, le RR était de 1,28 (95 % CI 1,14-1,43) dans cinq études sélectionnées. La méta-analyse réalisée par Rimm sur tous les types d'enfants PMA parvint à des conclusions très similaires : RR 1,29 (95 % CI 1,01-1,67) dans 19 études (25). Une autre méta-analyse réalisée par Lie a comparé l'ICSI et la FIV et n'a pas trouvé de différence significative : RR 1,12 (CI 0,97-1,28) (26). Zhu, dans une étude de dossiers hospitaliers d'enfants conçus naturellement et d'enfants conçus après traitement de fertilité, a montré que l'augmentation du taux de malformation était principalement due au terrain sous-jacent d'infertilité du couple (27). Pour les malformations majeures en général, une corrélation avec l'intervalle de temps à concevoir ou l'infertilité a été décrite. De manière générale, les couples présentant un problème de subfertilité devraient être informés que le risque de malformations majeures est multiplié par environ 1,3. Ceci signifie qu'une malformation majeure sera observée pour 15 grossesses après conception spontanée et pour 12 grossesses après ICSI. Ces données devraient être utilisées pour informer les couples avant le début d'un traitement de fertilité (28). De plus, le risque apparaît similaire après FIV ou ICSI. Les données limitées disponibles concernant les formes moins invasives de PMA comme la stimulation ovarienne (avec ou sans insémination) indiquent que le risque de malformations majeures est légèrement augmenté (et n'est pas augmenté significativement après ajustement pour le sexe et les gestations multiples) (23).

Tableau II – Résultats globaux pour les malformations après PMA versus conception spontanée (Rimm *et al.*, Hansen *et al.*) et après ICSI versus IVF (Lie *et al.*).

	Rimm <i>et al.</i> (25)	Hansen <i>et al.</i> (24)	Lie <i>et al.</i> (26)
Nombre d'études	19	15	22
	Odds Ratio (IC 95 %)		Risk Ratio (IC 95 %)
Malformations majeures	1,29 (1,01–1,67)	1,32 (1,20–1,45)	1,12 (0,97–1,28)

Malformations dans les différents systèmes d'organes

Il n'est pas clair, au vu des données disponibles, de savoir quelles anomalies particulières ou groupes d'anomalies (par système d'organe) sont présentes en nombre excessif, après PMA. Des différences en fréquence de malformation par système d'organe ont été rapportées par différents auteurs tant en FIV qu'en ICSI. Aucun de ces rapports n'était consistant, en dehors du fait que si une différence était observée, elle était toujours en défaveur du groupe PMA par rapport au groupe contrôle. Une augmentation des malformations uro-génitales a été rapportée de manière répétitive par certains auteurs en ICSI ou en FIV, en comparaison avec la population générale (27, 29, 30). La comparaison de toutes les malformations uro-génitales après ICSI, comparée à la FIV par Bonduelle *et al.*, conduisait à la conclusion qu'aucune différence ne pouvait être rapportée sur 2 840 naissances vivantes après ICSI et 2 955 nouveau-nés après FIV (31). Une information sur le statut uro-génital des parents manque dans toutes ces études et ce background génétique parental pourrait être le facteur clef responsable pour cette augmentation relativement faible des malformations uro-génitales.

Pour les autres systèmes d'organes, la différence avec la population générale reste incertaine. Dans une méta-analyse de Lie, aucune différence n'a été observée pour les malformations cardio-vasculaires, musculo-squelettiques, l'hypospadias, les anomalies du tube neural ou les fentes palatines (26). Cependant, une étude récente de haute qualité montre un risque accru pour des malformations congénitales (OR 1,3 ; 95 % CI 1,1-1,6) mais lié à une augmentation pour des anomalies spécifiques (uro-génitales et musculo-squelettiques) chez les garçons (23).

Anomalies chromosomiques

Différentes études ont rapporté une augmentation légère des anomalies chromosomiques parmi les couples présentant une infertilité, en particulier chez les hommes présentant un facteur de stérilité masculine sévère (32). Un caryotype anormal a été retrouvé chez 13,7 % des hommes azoospermiques et chez 4,6 % des hommes oligospermiques (33). Tous les hommes présentant une oligozoospermie (et les deux partenaires en cas d'infertilité secondaire) devraient donc bénéficier d'un conseil génétique et d'un caryotype avant d'entamer une FIV ou une ICSI (34). En cas d'anomalies chromosomiques chez l'un des deux parents, un diagnostic anténatal ou un diagnostic préimplantaire devraient être discutés, dans la mesure où des anomalies chromosomiques balancées ou des mosaïsmes pourraient conduire à un taux plus élevé de fausses couches ou à un fœtus présentant un caryo-

type anormal. Comme attendu, dans une série consécutive de 1 586 diagnostics prénataux, 1,4 % d'anomalies héritées ont été observés, le plus souvent du père (2). D'autres données de la littérature montrent des résultats similaires sur des nombres plus limités d'échantillons prénataux (tableau III). En dehors de ces anomalies chromosomiques constitutionnelles, l'infertilité masculine a également été associée avec un nombre accru d'anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes, conduisant à un nombre accru d'anomalies chromosomiques parmi les enfants nés après ICSI. En effet, dans une série de 1 586 tests prénataux, un nombre statistiquement plus élevé d'anomalies chromosomiques (1,6 %) a été observé (en partie dues à une augmentation de deux à trois fois des anomalies des chromosomes sexuels, en comparaison avec la population générale et en partie dues aux anomalies structurales et numériques) (2).

Il est évident que chez les patients présentant une oligospermie sévère ou une azoospermie, dans le cadre d'une insuffisance testiculaire sévère, un taux d'aneuploïdie chromosomique plus élevé est observé dans le sperme. Dans l'étude de Bonduelle, le taux d'anomalies prénatales était plus élevé (2,1 %) lorsque le spermatozoïde provenait d'hommes présentant une concentration spermatique de moins de 20 m/mL en comparaison avec l'utilisation de sperme plus concentré (1,6 %) (2). Plusieurs études rapportent également une association entre les aberrations morphologiques ou une mobilité anormale et les aneuploïdies chromosomiques des spermatozoïdes. Cependant, cette différence ne se reflétait pas dans un plus haut pourcentage d'anomalies congénitales chez les enfants nés de pères présentant des anomalies du sperme plus graves, ni dans une différence lorsque les spermatozoïdes autres qu'éjaculés étaient utilisés (comme après aspiration épидидymaire ou après biopsie testiculaire (3, 35). Tous ces résultats doivent cependant encore être considérés avec prudence, dans la mesure où le nombre des enfants nés dans ces différents sous-groupes reste encore trop faible.

Tableau III – Anomalies chromosomiques dans les fœtus conçus par ICSI.

	Bonduelle <i>et al.</i> (2)	Jozwiak <i>et al.</i> (71)
Nombre de fœtus testés	1 586	1 136
Nombre d'anomalies caryotypiques	47	17
<i>De novo</i> : autosomes	15	7
<i>De novo</i> : chromosomes sexuels	10	7
Héritées	22	3
% de caryotypes anormaux (IC 95 %)	2,96 (2,19-3,92)	1,50 (0,87-2,39)

Désordres de l'empreinte ou épi-génétiques

L'empreinte génétique est un processus épi-génétique dans lequel l'expression génique allèle-spécifique est dépendante de l'héritage parental. Bien que les gènes avec empreinte soient minoritaires (80 gènes d'empreinte sont connus), beaucoup jouent un rôle dans le développement embryonnaire et la croissance fœtale.

Les gènes d'empreintes sont fonctionnellement haploïdes et pourraient donc être plus vulnérables et induire des maladies dès lors qu'ils sont soumis à des mutations ou à des épi-mutations, si celles-ci se produisent au cours de l'exposition précoce des gamètes ou de l'embryon à des conditions artificielles. De plus, le processus d'empreinte lui-même pourrait être modifié par la culture *in vitro*, conduisant à des gènes à empreinte anormale. Des études animales ont impliqué les procédures de PMA comme cause spécifique de modification épi-génétique (36). Un phénotype bien connu – « le syndrome du gros veau » – a été décrit chez les bovins après FIV. Ce syndrome a également été décrit chez le mouton, et associé à une méthylation fœtale réduite et une expression réduite de IGFR2. Diverses autres études animales ont montré de manière suffisamment évidente que la PMA pouvait avoir un effet direct sur l'empreinte génétique. Il a également été montré que les milieux de cultures embryonnaires avaient un effet sur le status d'empreinte de certains gènes (37). Une étude sur les embryons de souris a montré des effets de l'ovulation (et de la superovulation), du processus de fécondation (*in vivo* versus *in vitro*) et de la culture embryonnaire : la FIV chez la souris entraîne une incidence plus élevée d'empreinte aberrante des gènes *IGF2/H19* et que les différentes étapes de la FIV peuvent contribuer à des anomalies dans le mécanisme d'empreinte.

La recherche humaine a montré que la stimulation hormonale altérait le status d'empreinte de certains gènes comme le *H19* (augmentation de méthylation dans les ovocytes immatures superovulés) (38). Dans le sperme humain, une étude sur le mécanisme de méthylation *H19* a suggéré une empreinte génétique anormale (au niveau du sperme) et une hypospermatogenèse (39). Il n'y a cependant pas d'évidence que l'utilisation d'un spermatozoïde immature pourrait entraîner des déficits d'empreinte puisque l'empreinte chez l'homme est complète à un stade précoce du développement des spermatogonies. Une manipulation embryonnaire, même précoce, comportant la collecte de blastocystes générés *in vitro*, était associée avec une perte de méthylation au niveau du locus maternel KvDMR1 (40).

Suite à un rapport de Cox en 2002 suggérant un lien entre le syndrome d'Angelman et la PMA, des craintes se sont élevées quant à une prévalence augmentée de syndrome lié à l'empreinte généti-

que chez les enfants PMA (41). Chez l'humain, des mutations ou des épi-mutations de gènes d'empreinte ou dans des centres de contrôle de l'empreinte sont associées avec des désordres, comme le syndrome d'Angelman ou de Beckwith-Wiedemann (BWS), Prader-Willi, Silver Russell, le diabète néonatal transitoire et autres.

BWS est un syndrome avec une croissance d'organes anormale, des anomalies abdominales et un risque accru de tumeurs embryonnaires. Gosden *et al.* ont estimé un risque relatif accru de 4,2 (95 % CI 1,9-7,8) pour BWS en PMA, se basant sur trois études cas-contrôles d'enfants avec BWS (42). Le risque absolu, reste cependant peu élevé : basé sur un risque dans la population de 1/14 500, ce risque serait d'environ 1/4 000.

Différentes études indiquent un risque plus élevé pour le syndrome d'Angelman (AS). Celui-ci est un syndrome rare (1/15 000), avec retard mental sévère, défauts de langage et symptômes neurologiques. La cause moléculaire est une déficience dans l'expression d'un gène maternel : le *UBE3A*, localisé dans un groupe à empreinte sur le chromosome 15q. Une perte d'expression de gène maternel peut résulter de différents mécanismes comme une délétion, une mutation, une disomie uniparentale paternelle ou un défaut d'empreinte des allèles maternels. Ce dernier mécanisme est le facteur étiologique dans moins de 5 % des cas AS. La première publication de Cox en 2002 rapporta deux cas avec ce défaut d'empreinte et une hypométhylation significative du chromosome 15q (41). Ces enfants étaient nés après ICSI pour facteur masculin sévère. Un second rapport par Orstavik en 2003 concernait un enfant PMA né d'un père présentant un sperme normal, excluant le fait que le désordre d'empreinte était lié uniquement au facteur masculin (43). Nous disposons à ce jour de sept cas rapportés de AS après ICSI ou FIV et cinq d'entre eux présentent un défaut d'empreinte post-zygotique anormale comme facteur étiologique.

Dans l'étude de Ludwig, le risque relatif pour un défaut d'empreinte dans AS est de 6,25 (95 % CI 1,68–16,00) et est similaire chez les couples infertiles non traités et chez les couples traités par ICSI ou FIV (44).

Les registres mondiaux ont montré qu'un pourcentage plus élevé d'enfants AS étaient nés de parents présentant des problèmes de fertilité (sans usage de la FIV), mais mettent également en évidence le rôle de la stimulation hormonale ou de la subfertilité dans l'augmentation de ce risque.

La fréquence relativement peu élevée des désordres de l'empreinte, couplée à la petite taille de l'échantillon et au fait que les études soient de type cas-contrôles, rend l'interprétation difficile. Un biais ne peut certainement pas être exclu comme

cause de l'excès de syndrome BWS et d'Angelman observé.

De plus larges études en Angleterre et en Irlande (45, 46), au Danemark (47) et aux Pays-Bas (48) n'ont pas démontré d'augmentation des désordres de l'empreinte parmi les enfants nés après PMA.

Cependant, et de manière consistante, un taux beaucoup plus élevé qu'attendu, une anomalie épigénétique a été découverte dans le BWS et dans le AS, lorsque le mécanisme moléculaire était dénoué. Sur la base de toutes ces données, il existe une évidence suffisante pour suggérer que certains aspects des procédures de PMA pourraient accroître la fréquence des anomalies épi-génétiques conduisant à des syndromes d'anomalies congénitales. Dans la mesure où les désordres de l'empreinte sont rares, un échantillon large et des études prospectives sont nécessaires pour détecter des augmentations mineures. Les couples infertiles devraient être avertis que ces événements rares semblent être plus fréquents que chez les couples fertiles. Un screening systématique pour BWS en PMA n'est pas justifié dans la mesure où l'incidence de 1/4 000 est trop faible pour le justifier (49).

D'autre part, il pourrait également y avoir un risque plus élevé d'autres modifications épi-génétiques non seulement au niveau des gènes d'empreinte, mais distribués sur l'entièreté du génome. L'alimentation maternelle et peut-être également d'autres facteurs maternels (comme l'infertilité) peuvent modifier la descendance, probablement au travers de modifications épi-génétiques (50). Ces types de risques constituent un nouveau domaine de recherche sur le déclenchement tardif de pathologies comme le cancer et les affections cardio-métaboliques et devraient être prises en considération dans les études de suivi à long terme des enfants nés suite à une subfertilité ou après utilisation de la PMA.

Suivi à long terme

Il existe à l'heure actuelle une évidence substantielle d'effets néfastes sur le développement prénatal et l'issue périnatale. Par ailleurs, la période prénatale est une des plus vulnérables périodes de la vie. Au cours de cette période critique, l'embryon en développement ou le fœtus présentent une susceptibilité aux conditions intrinsèques et extrinsèques. En PMA, la sensibilité à des influences environnementales peut conduire à un développement fœtal altéré, avec des conséquences prénatales et postnatales. De la même manière, la recherche animale a démontré que la FIV et le système de culture peuvent altérer le développement normal. Les adaptations du conceptus aux conditions anor-

males au cours de l'une des fenêtres critiques du développement prénatal peuvent avoir des effets permanents à long terme sur la structure, la physiologie et le métabolisme d'un individu (51).

Pour toutes ces raisons, les conséquences sanitaires à long terme des événements périconceptuels et prénataux devraient être étudiées avec attention. Les études actuelles de suivi concernant la croissance postnatale et la morbidité infantile sont peu nombreuses, présentent des résultats conflictuels, et d'autres domaines du développement à long terme comme le risque de cancer et le risque cardio-métabolique viennent à peine d'être pris en considération.

Croissance

Une naissance prématurée et un faible poids de naissance sont connus pour être associés à une morbidité infantile et adulte accrues ; peu d'études bien conduites se sont adressées à la croissance postnatale et au développement physique des enfants nés après FIV ou ICSI.

En général, des différences dans les types de groupe contrôle, et des biais de sélection possibles, dues à des taux de participation différents ont altéré les conclusions finales.

Dans la plupart des études, la croissance générale des enfants nés après FIV n'est pas différente, pour le poids, la taille et la circonférence crânienne. Une étude prospective européenne n'a pas mis en évidence de différences jusqu'à l'âge de 5 ans chez les enfants ICSI ou FIV nés au-delà de 32 semaines de gestation (30), ni de la croissance et de l'IMC jusqu'à l'âge de 8 ans pour les enfants nés après ICSI (52). Contrairement à ces données, une large étude finlandaise a trouvé de petites différences chez les enfants FIV, la croissance étant toujours un peu retardée jusqu'à l'âge de 3 ans (53). Cette étude suggérerait que les événements périnataux anormaux affectaient la croissance au cours de la première année de vie. De subtiles différences concernant la taille attendue et les taux d'« insuline like growth factor-I (IGF-I) » ont été trouvées entre les enfants nés après AMP et les contrôles, probablement cliniquement non significatives (54). Globalement, ces observations indiquent avec certitude qu'un follow-up systématique de la croissance et de la puberté des enfants nés après PMA est indiqué.

Santé physique et maladies de l'enfance

Différentes études ont investigué la santé des enfants en période de croissance, nés après différents types de PMA. L'état de santé général était rassurant dans la plupart des études, sans

incidence accrue de maladies chroniques jusqu’à l’âge de 5 ans (30). Dans une étude européenne multicentrique sur environ 540 enfants uniques après ICSI, nés après 32 semaines de gestation, comparés à un groupe similaire d’enfants FIV et un groupe d’enfants conçus naturellement, plus de maladies infantiles et plus de traitements médicaux ont été rapportés (30). Cette étude européenne et différentes études de registres scandinaves ont également rapporté des nombres plus élevés d’admissions hospitalières chez les enfants uniques nés après FIV, jusqu’à l’âge de 6 ans (pour des raisons comme l’asthme et les infections) (RR 1,4) (55) et chez les enfants FIV (RR 2,09) jusqu’à l’âge de 11 ans (53). Dans cette étude, le diagnostic de sortie indiquant un dommage cérébral (retard mental, épilepsie, paralysie cérébrale et troubles du comportement) semblait expliqué complètement par les naissances prématurées. De plus, d’autres diagnostics de sortie semblaient surreprésentés. Ceci peut refléter jusqu’à un certain point une attention et une angoisse plus élevées chez les parents, mais il n’est pas exclu que davantage d’allergies ou d’infections mineures se produisent chez les enfants PMA, reflétant peut-être un risque accru de morbidité infantile liée à la plus grande fréquence de complications périnatales. D’un autre côté, la plupart des études indiquent que la surmorbidity sévère est à mettre en relation avec des événements néonataux adverses plutôt qu’avec le traitement PMA lui-même. En général, la santé des enfants issus de grossesses multiples après PMA était comparable avec celles des enfants issus de grossesses multiples spontanées (57).

Risque de cancer

Il est connu que les fumeurs présentent un niveau plus élevé de lésions oxydatives dans leurs spermatozoïdes, ce qui représente un risque potentiel plus élevé de cancer de l’enfance dans leur descendance (58). Il est donc raisonnable de spéculer que l’uti-

lisation d’un spermatozoïde comportant un ADN altéré pourrait prédisposer la descendance à un risque de maladies sérieuses plus tard dans l’existence. Seul un nombre limité d’études de suivi a évalué le problème de l’apparition de cancer infantile parmi les enfants conçus après PMA. Certaines de ces études ont un échantillonnage trop limité pour pouvoir évaluer le risque de cancer et les données ont été générées à partir de registres nationaux du cancer. Le taux d’incidences standardisées variait entre 0,88 (55) et 1,14 (59), mais aucunes de ces données n’atteignaient la signification (tableau IV). Bien que la plupart des études suggèrent qu’il n’y a pas de risque plus élevé de cancer de l’enfance, la plupart des enfants PMA n’ont pas atteint l’âge adulte et une surveillance prolongée des individus conçus après PMA est justifiée.

Développement neurologique

Il existe des raisons supposées que la PMA soit associée à un risque accru du point de vue neuro-développemental (ce terme couvre le développement neuro-moteur, cognitif, le langage, la parole et le comportement). Premièrement, il a été bien démontré que le devenir périnatal des enfants uniques après PMA est moins bon que celui des enfants conçus naturellement. Ceci pourrait conduire à une morbidité neuro-développementale plus élevée. Deuxièmement, la sensibilité du cerveau à un stade précoce du développement, à un environnement altéré, pourrait mener à des conséquences à long terme sur le développement. De nombreuses études ont été conduites concernant les différents aspects du développement neurologique des enfants uniques après PMA mais il n’est toujours pas clair qu’il y ait un risque résiduel pour les différents paramètres étudiés. Globalement, si un enfant unique conçu après PMA est né à terme avec un poids de naissance dans les limites de la normale et suivant une grossesse nor-

Tableau IV – Risque de cancer chez les enfants nés après PMA.

	Brinton <i>et al.</i> (59)	Bruinsma <i>et al.</i> (72)	Doyle <i>et al.</i> (73)	Ericson <i>et al.</i> (55)	Klip <i>et al.</i> (74)
Nombre d’enfants nés après PMA	51 063	5 249	2 507	9 056	9 479
Nombre d’enfants avec cancer	51	6	2	11	16
RR (95 % CI)				0,88 (0,44–1,58)	0,8 (0,3–2,3)
SIR (95 % CI)	1,14 (0,8–1,5)	1,39 (0,62–3,09)	0,57 (0,07–2,06)		1,0 (0,6–1,7)

RR : risque relatif ; SIR (*standardized incidence ratio*) : incidence standardisée.

male, il n'y a pas de risque accru de complications du développement neurologique (30, 60). En se concentrant sur un nombre d'études bien menées (9 basées sur des registres et 14 études contrôlées), dans une revue systématique, les études basées sur les registres suggèrent que la FIV et l'ICSI en soi n'accroissent pas le risque d'anomalies cognitives sévères (retard mental ou handicap neuro-moteur comme la paralysie cérébrale) (61). L'association d'une paralysie cérébrale avec la PMA est retrouvée dans un certain nombre d'études de registre, mais lorsque d'importants biais comme la pluralité et l'accouchement prématuré étaient pris en considération, le risque accru disparaissait habituellement. Pinborg a suggéré que le risque accru de paralysie cérébrale retrouvée dans certains registres pourrait être en relation avec le transfert de deux embryons et aussi avec la mort intra-utérine rapide d'un *vanishing twin* (62).

Le retard mental a été étudié dans différentes études basées sur des registres et n'a pas montré de différence. Le développement neuro-moteur a été étudié dans différentes études contrôles utilisant le Bayley Scales of Infant Development (BSID-II) ou le Griffith's mental development scales ; la plupart des études n'ont pas montré de différence et deux études ont rapporté des taux d'handicap mental similaire chez les enfants PMA ou ceux conçus naturellement.

Les aptitudes cognitives ont également été considérées dans plusieurs études utilisant un certain nombre de tests standardisés (BSID-II), Griffith's mental development scales, WISC-R). La plupart des études rapportent des développements comparables en ICSI et FIV en comparaison avec les enfants nés naturellement, et ce jusqu'à l'âge de 5 ans en FIV (63) et 10 ans en ICSI (64). En général, les tests qui ont été utilisés sont des instruments d'évaluation clinique, et il se peut qu'ils soient moins fiables pour l'évaluation du développement neuro-moteur et cognitif de manière détaillée. Par ailleurs, beaucoup d'études se concentrent sur les années précoces alors que les désordres mineurs du développement sont souvent diagnostiqués plus tard.

Le comportement a été étudié par des études d'observation et par des questionnaires standards à remplir par les parents. De manière générale, ces études n'ont pas montré de désordres du comportement chez les enfants nés après FIV ou ICSI en comparaison avec leurs contrôles naturels (65, 66). De possibles associations avec des syndromes autistiques ont été rapportées de temps à autre et demandent confirmation dans des études plus larges (67).

De nombreuses études ont pour conclusion que ni la FIV ni l'ICSI en soi n'accroissent le risque de développement anormal, mais que les risques

augmentés observés sont surtout dus à l'association de la PMA, à d'autres facteurs de risques comme la naissance prématurée et une histoire d'infertilité.

Un certain nombre d'études ont spécifiquement pris en considération l'ICSI en comparaison avec la FIV et avec les enfants conçus naturellement. De manière générale, ces études ont montré un développement neuro-moteur, cognitif, du langage, de la parole et du comportement similaires en comparaison avec la FIV ou la conception naturelle (63, 66-70).

Conclusions

L'issue pour les enfants nés après l'AMP sera principalement prédite par le nombre de fœtus et peut-être même par le nombre d'embryons transférés dans l'utérus. Il n'est donc pas de sujet qui ne mérite plus d'attention que le fait de minimiser la probabilité de grossesses multiples. Jusqu'à ce jour, la moitié des enfants nés après PMA sont issus de grossesses multiples, avec tous leurs risques périnataux et à long terme bien établis. Le fardeau d'un risque plus élevé de problèmes néonataux chez les enfants uniques demeure cependant bien établi grâce aux méta-analyses démontrant un risque accru de prématurité et de mort périnatale. Lorsque les enfants uniques sont nés à terme, il ne semble pas y avoir de conséquences significatives sur le développement neurologique.

La plupart des études récentes concernant la FIV et l'ICSI indiquent qu'il y a un risque accru de 30 à 40 % de risques de malformations congénitales dans la population PMA en comparaison avec le groupe contrôle de la population générale. Ce risque semble en relation avec le background parental, plus spécifiquement au travers de facteurs comme un âge maternel plus élevé, une plus faible parité, une période longue d'infertilité, une pathologie parentale préexistante ou une affection génétique, etc. Il est également évident que ces facteurs déterminent les différences retrouvées dans la littérature entre ICSI, FIV et enfants conçus naturellement, plus que ne le font les procédures de PMA par elles-mêmes.

Les parents devraient être avertis qu'un effet possible des techniques de PMA ne peut être exclu, mais que cet effet est de loin inférieur aux facteurs parentaux sous-jacents. Si un risque de malformations majeures (en suivant une certaine définition et une certaine méthodologie) peut être estimé à 2,5 % chez les nouveau-nés dans la population générale, alors un risque de 3,5 % doit être annoncé chez les enfants ICSI ou FIV.

De plus, il est possible qu'il existe un très petit risque de maladies rares en relation avec des problèmes

d'empreinte ou des anomalies épi-génétiques, qui doit continuer à être étudié. Le risque absolu est faible, mais le mécanisme sous-jacent n'est pas clair. Ici également, l'infertilité parentale sous-jacente ainsi que l'environnement hormonal et les conditions de culture pourraient jouer un rôle. Un conseil parental approprié et la recherche de facteurs de risques individuels peuvent aider à modifier le risque individuel pour chaque couple. Plus de recherches est également nécessaire pour évaluer l'importance des différents facteurs en cause. Une surveillance systématique des syndromes et maladies ayant un phénotype défini en relation avec l'empreinte génétique et les phénomènes épi-génétiques pourrait clarifier la suspicion que des anomalies génétiques jouent un rôle plus important en PMA que dans la population générale. Des études biologiques sont indispensables pour comprendre la pathogenèse de ces événements et si des précautions peuvent être prises pour prévenir leur survenue.

Remerciements

Nous remercions vivement le Professeur Michel Camus pour la traduction du texte, le Docteur Sonja Desmyttere pour son aide à la réalisation des tableaux et Vera Van Beneden pour son aide au niveau de la collecte des références.

Nos remerciements vont également à Madame Ann Nijs pour la dactylographie du manuscrit.

Références

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340: 17-8
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H *et al.* (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17: 2600-14
- Ludwig M, Diedrich K (2002) Follow-up of children born after assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 5: 317-22
- Katalinic A, Rösch C, Ludwig M (2004) Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril* 81: 1604-16
- International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG *et al.* (2009) World Collaborative Report on Assisted Reproductive Technology, 2002. *Hum Reprod* 24: 2310-20
- Klemetti R, Gissler M, Hemminki E (2002) Comparison of perinatal health of children born from IVF in Finland in the early and late 1990s. *Hum Reprod* 17: 2192-8
- Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M, Centers for Disease Control and Prevention (2008) Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2005. *MMWR Surveill Sull* 57: 1-23
- Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707-09
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K *et al.* (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344: 768-70
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG *et al.* (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27: 153-4
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC *et al.* (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66: 1061-7
- Nyboe Andersen A., Gianaroli L, Nygren KG (2004) Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 19: 490-503
- Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, Tasca RJ (2007) Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol* 109: 967-77
- Ombelet W, De Sutter P, Van der Elst J, Martens G (2005) Multiple gestation and infertility treatment: registration and reaction - the Belgian project. *Hum Reprod Update* 11: 3-14
- Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ (2004) Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *Br Med J* 328: 261-5
- Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS (2004) Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 103: 551-63
- McGovern PG, Llorens AJ, Skurnick JH *et al.* (2004) Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization-embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertil Steril* 82: 1514-20
- Ghazi HA, Spielberger C, Källén B (1991) Delivery outcome after infertility/preterm delivery: a registry study. *Fertil Steril* 55: 726-32
- Henrikson TB, Baird DD, Olsen J *et al.* (1997) Time to pregnancy and preterm delivery. *Obstet Gynecol* 89: 594-599
- Draper ES, Kurinczuk J, Abrams KR, Clarke M (1999) Assessment of separate contributions to perinatal mortality of infertility history and treatment: a case-control analysis. *Lancet* 353: 1746-49
- Simpson JL (1996) Registration of congenital anomalies in ART populations: pitfalls. *Hum Reprod* 11(Suppl 4): 81-8
- Meschede D, Lemcke B, Behre HM *et al.* (2000) Non-reproductive heritable disorders in infertile couples and their first degree relatives. *Hum Reprod* 15: 1609-12
- Klemetti R, Gissler M, Sevon T *et al.* (2005) Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies. *Fertil Steril* 84: 1300-7
- Hansen M, Bower C, Milne E *et al.* (2005) Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects: a systematic review. *Hum Reprod* 20: 328-38
- Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP (2004) A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet* 21: 437-43
- Lie RT, Lyngstadaas A, Orstavik KH *et al.* (2005) Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 34: 696-701
- Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J (2006) Infertility, infertility treatment, and congenital malformations; Danish national birth cohort. *Br Med J* 333: 679
- Katalinic A, Rösch C, Ludwig M (2004) Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection

- (ICSI): a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril* 81: 1604-16
29. Erikson A, Källén (2001) Congenital malformations in infants born after IVF: a population based study. *Hum Reprod* 16: 504-9
 30. Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A *et al.* (2005) A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20: 413-9
 31. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V *et al.* (2002) Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 17: 671-94
 32. Schreurs A, Legius E, Meuleman C *et al.* (2000) Increased frequency of chromosomal anomalies in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 74: 94-96.
 33. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H *et al.* (1996) Cytogenetics in infertile men. *Hum Reprod* 11 (Suppl 4): 1-24
 34. Papanikolaou EG, Vernaev V, Kolibianakis E *et al.* (2005) Is chromosome analysis mandatory in the initial investigation of normoovulatory women seeking infertility treatment? *Hum Reprod* 20: 2899-903
 35. Wennerholm UB, Bonduelle M, Sutcliffe A *et al.* (2006) Paternal sperm concentration and growth and cognitive development in children born with a gestational age more than 32 weeks after assisted reproductive therapy. *Hum Reprod* 21: 1514-20
 36. Khosla S, Dean W, Brown D *et al.* (2001) Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 64: 918-26
 37. Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD *et al.* (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62: 1526-35
 38. Sato A, Otsu E, Negishi H *et al.* (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22: 26-35
 39. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A (2004) Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363: 1700-2
 40. Rivera RM, Stein P, Weaver JR *et al.* (2008) Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 17: 1-14
 41. Cox GF, Bürger J, Lip V *et al.* (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71: 162-4
 42. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M (2003) Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 361: 1975-7
 43. Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB *et al.* (2003) Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 72: 218-9
 44. Ludwig M, Katalinic A, Gross S *et al.* (2005) Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42: 289-91
 45. Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S *et al.* (2006) Assisted reproductive therapies and imprinting disorders: a preliminary British survey. *Hum Reprod* 21: 1009-11
 46. Bowdin S, Allen C, Kirby G *et al.* (2007) A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 22: 3237-40
 47. Lidegaard Ø, Pinborg A, Andersen AN (2006) Imprinting disorders after assisted reproductive technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18: 293-6
 48. Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J *et al.* (2007) Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 22: 2476-80
 49. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J (2009) Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 91: 305-15
 50. Fleming TP, Kwong WY, Porter R *et al.* (2004) The embryo and its future. *Biol Reprod* 71: 1046-54
 51. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP *et al.* (2008) Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 90: 1662-73
 52. Belva F, Henriët S, Liebaers I *et al.* (2007) Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born >or =32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group. *Hum Reprod* 22: 506-15
 53. Koivurova S, Hartikainen AL, Sovio U *et al.* (2003) Growth, psychomotor development and morbidity up to 3 years of age in children born after IVF. *Hum Reprod* 18: 2328-36
 54. Kai CM, Main KM, Andersen AN *et al.* (2006) Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth in children born after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4352-60
 55. Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, Källén B (2002) Hospital care utilization of infants born after IVF. *Hum Reprod* 17: 929-32
 56. Källén B, Finnström O, Nygren KG, Olausson PO (2005) In vitro fertilization in Sweden: child morbidity including cancer risk. *Fertil Steril* 84: 605-10
 57. Klemetti R, Sevo'n T, Gissler M, Hemminki E (2006) Health of children born as a result of in vitro fertilization. *Pediatrics* 118: 1819-27
 58. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK *et al.* (2002) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 78: 491-9
 59. Brinton LA, Kruger KS, Thomsen BL *et al.* (2004) Childhood tumor risk after treatment with ovulation-stimulating drugs. *Fertil Steril* 81: 1083-91
 60. Sutcliffe AG, Ludwig M (2007) Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 28: 351-9
 61. Middelburg KJ, Heineman MJ, Bos AF, Hadders-Algra M (2008) Neuromotor, cognitive, language and behavioural outcome in children born following IVF or ICSI-a systematic review. *Hum Reprod Update* 14: 219-31
 62. Pinborg A, Lidegaard O, la Cour Freiesleben N, Andersen AN (2005) Consequences of vanishing twins in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod* 20: 2821-9
 63. Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J *et al.* (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. *Pediatrics* 115: 283-9
 64. Leunens L, Celestin-Westreich S, Bonduelle M *et al.* (2008) Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children. *Hum Reprod* 23: 105-11
 65. Golombok S, Brewaeys A, Giavazzi MT *et al.* (2002) The European study of assisted reproduction families: the transition to adolescence. *Hum Reprod* 17: 830-40
 66. Barnes J, Sutcliffe AG, Kristoffersen I *et al.* (2004) The influence of assisted reproduction on family functioning and children's socio-emotional development: results from a European study. *Hum Reprod* 19: 1480-7
 67. Hvidtjørn D, Grove J, Schendel DE *et al.* (2006) Cerebral palsy among children born after in vitro fertilization: the role of preterm delivery-a population-based, cohort study. *Pediatrics* 118: 475-82
 68. Pinborg A, Loft A, Schmidt L *et al.* (2004) Neurological sequelae in twins born after assisted conception: controlled national cohort study. *Br Med J* 329: 311

69. Leslie GI, Gibson FL, McMahon C *et al.* (2003) Children conceived using ICSI do not have an increased risk of delayed mental development at 5 years of age. *Hum Reprod* 18: 2067-72
70. Källén B, Finnström O, Nygren KG, Olausson PO (2005) In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods. *Fertil Steril* 84: 611-7
71. Jozwiak EA, Ulug U, Mesut A *et al.* (2004) Prenatal karyotypes of fetuses conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 82: 628-33
72. Bruinsma F, Venn A, Lancaster P *et al.* (2000) Incidence of cancer in children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 15: 604-7
73. Doyle P, Bunch KJ, Beral V, Draper GJ (1998) Cancer incidence in children conceived with assisted reproduction technology. *Lancet* 352: 452-3
74. Klip H, Burger CW, de Kraker J, van Leeuwen FE; OMEGA-project group (2001) Risk of cancer in the offspring of women who underwent ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod* 16: 2451-8

M. Boyer, L. Meddeb,
V. Pauly et P. Boyer

Suivi des enfants de l'AMP : expérience d'un centre français

Introduction

Environ 15 000 enfants naissent chaque année en France au terme d'une grossesse obtenue par assistance médicale à la procréation (AMP) avec fécondation au laboratoire soit près de 2 % des naissances. Ces données sont extrapolées du rapport de l'Agence de la biomédecine 2006. On tend aujourd'hui à oublier ce miracle de la biologie pour spéculer sur les risques de la technique. Cet éclairage sur les risques reproductifs exogènes est apparu au début du ^{xx} siècle avec la mise en évidence des trois premiers agents tératogènes : physique, avec les rayons X entre 1927 et 1930 ; infectieux avec la rubéole en 1941 et enfin chimique, avec le thalidomide en 1962. Les inquiétudes sont donc par là même fondées sur l'expérience acquise aux dépens de catastrophes épidémiologiques. La génération des soignants qui ont participé à l'explosion des techniques d'AMP a été particulièrement marquée par ces connaissances et les praticiens se sont rapidement intéressés au devenir des grossesses puis à celui des enfants nés, dans un contexte où la méthodologie du suivi des grossesses était déjà reconnue par plusieurs équipes à travers le monde, impliquées dans la surveillance d'exposition exogènes variées. En revanche, le suivi à long terme en pédiatrie est un sujet en plein essor pour lequel nous ne disposons que de très peu d'outils validés. Le service de médecine et biologie de la reproduction de l'hôpital Saint-Joseph à Marseille a débuté son activité fin 1994 parallèlement à la naissance de la technique de micro-injection du spermatozoïde en intraovocytaire (ICSI). La cohorte des enfants a été d'emblée nourrie par les deux principales techniques de fécondation *in vitro* parallèlement FIV classique et FIV ICSI. Cependant, si l'intérêt d'un suivi s'est fait jour rapidement, il a fallu promouvoir cette idée et sa réalisation pratique n'a pu être mise en place qu'en 2004.

Méthodologie

L'influence de la tératovigilance s'est faite largement sentir dans la construction du modèle de

suivi (1). L'objectif principal est de rassembler des données longitudinales de façon exhaustive sur l'ensemble de la cohorte dans le but d'identifier l'apparition d'un cluster de cas identiques permettant de déclencher une alerte éventuelle, et d'utiliser ces données pour des études ciblées. Le recueil des données se fait selon des procédures enregistrées, régulièrement évaluées et améliorées dans une démarche qualité. L'encadrement éthique se justifie par le développement de pratiques qui touchent à la filiation et aux bases anthropologiques. Ces pratiques ont un impact sur l'individu nouvellement procréé, sur la famille ainsi construite et plus largement sur la société dans laquelle cet individu va devoir se développer et exercer son rôle. Ce qui nous renvoie aux droits de l'enfant : le secret médical entourant sa conception et les conséquences éventuelles du maintien ou de sa révélation pour lui-même et sa descendance. La manière d'assurer un suivi spécifique à long terme des enfants nés par AMP sans les stigmatiser soulève une contradiction entre les exigences épidémiologiques et la liberté individuelle. Le recueil d'informations sur tous les individus d'une cohorte permet d'éviter les biais or le principe des libertés individuelles amène à ne faire porter les études que sur des volontaires. La Fondation Saint-Joseph tente de répondre aux recommandations la loi de bioéthique du 6 août 2004 en assurant une logistique mais aussi un encadrement éthique au travers de comités locaux et universitaires. Notre étude observationnelle met en relation des indicateurs de la stérilité des parents avec des indicateurs de développement sanitaire concernant leurs enfants. L'observation longitudinale de la grossesse et des toutes premières années de la vie est essentielle à l'identification des risques et facteurs de santé dont les effets peuvent être immédiats sur le développement de l'enfant, ou même prolongés jusqu'à l'âge adulte. Il est nécessaire que chaque dossier soit enrichi de renseignements pluridisciplinaires (médicaux, biologiques, sociologiques, administratifs) ; soit mis à jour, par exemple une pathologie néonatale peut être ponctuelle ou induire une pathologie chronique ; soit documenté par différentes sources afin de vérifier la cohérence des données et compléter les informations.

Les informations sont recueillies au travers de questionnaires l’un concernant la grossesse, l’accouchement et la période post natale immédiate de la maman et l’autre concernant chaque enfant avec différentes rubriques selon l’âge de l’enfant : état à la naissance ; déroulement des premiers jours au domicile ; événements médicaux, chirurgicaux, survenus depuis la naissance ainsi que les éventuels traitements (médicaments pris sur une longue période, rééducation orthophonique, kinésithérapie, orthoptiste, etc.), état actuel de l’enfant : poids taille scolarité, suivi médical, information du médecin traitant sur le mode de conception et une zone de commentaires libres. Ils sont envoyés aux familles à différents âges. Dans l’année qui suit la naissance, ils sont simplement accompagnés d’une demande des photocopies du carnet de santé. Lorsqu’il s’agit d’un enfant plus grand, le questionnaire est adapté en fonction des éléments déjà recueillis auparavant, et il est accompagné d’une lettre d’information avec un formulaire de consentement pour le recueil éventuel d’informations complémentaire auprès d’un professionnel de santé et à nouveau une demande des photocopies des pages complémentaires du carnet de santé. Ces questionnaires sont anonymes et cependant personnalisés avec certains éléments connus, sexe, date de naissance, etc. Après réception de la réponse par retour de courrier, tous les documents sont rassemblés pour chaque enfant et pour chaque famille. Ils sont instruits par le médecin qui s’assure de la concordance des informations recueillies dans les carnets de santé et les questionnaires et, si besoin, œuvre à les consolider par la recherche de comptes-rendus d’hospitalisation. Chaque dossier est codé avec l’aide

de la classification internationale des maladies et une saisie anonyme dans un tableur permet une incrémentation régulière des dossiers dans divers sous-groupes : techniques, pathologies... Seules les informations validées sur un document écrit sont prises en comptes. L’ensemble de la cohorte depuis le début de l’activité est inclus. La fin du suivi pour chaque enfant est marquée, soit par le refus des parents, soit par le décès de l’enfant. La qualité du suivi est mesurée par des indicateurs : taux de familles retrouvées, taux de réponse, taux de données manquantes pour les critères quantitatifs, mais aussi au plan qualitatif et éthique : taux de consentement, cohérence des données entre les diverses sources. Nous devons vérifier la validité de certains critères factuels comme le terme de naissance, le poids de naissance, etc. La façon dont ils sont documentés est donc systématiquement enregistrée. De même, la valeur méthodologique des arguments de gravité (hospitalisation, chirurgie) doit permettre de répondre à la démarche de vigilance (tableaux I et II). Au total, l’évolution de la cohorte peut être suivie par classe d’âge, témoignant à la fois du reflet de l’activité des ponctions et du suivi (fig. 1). Enfin, l’étude a fait l’objet d’un protocole soumis à l’Agence de la biomédecine en 2005, ce sont les résultats de cette phase du projet qui vous sont présentés.

Résultats

Jusqu’à la date de début de grossesse activité 2007 incluse, la cohorte représente 2 283 enfants nés vivants, tous les résultats des tentatives et toutes les évolutions de grossesses sont connus depuis le début de l’activité. Elle comprend près de 55 % d’enfants nés de grossesses issues d’une FIV classique et environ 45 % d’enfants nés par FIV avec micro-manipulation (tableau III). Nous présentons dans le tableau IV les naissances dans les sous-groupes techniques FIV classique et FIV ICSI. Nous remarquerons tout de suite qu’il y a eu plus de naissance après transfert de blastocystes en ICSI qu’en FIV classique. Cette différence est significative. L’explication la plus rationnelle est liée aux meilleurs taux de fécondation observés en ICSI permettant plus souvent une culture prolongée au-delà

Tableau I – Aspects quantitatifs du suivi.

Nombre total d'enfants	2 283 (100 %)
Courriers envoyés	1 915 (83,88 %)
Réponses	1 390 (72,58 %)
Arrêt du suivi pour refus	20 (1 %)
Dossiers documentés Carnet de santé et/ou Compte rendu	1 629 (71,35 %)

Tableau II – Qualité des données.

Données renseignées	Données renseignées (N)	Pourcentages confirmés par un document médical (%)
Terme de naissance	2 119	76,96
Poids de naissance	2 013	80,92
Chirurgie	1 280	78,57
Hospitalisation	1 382	71,35

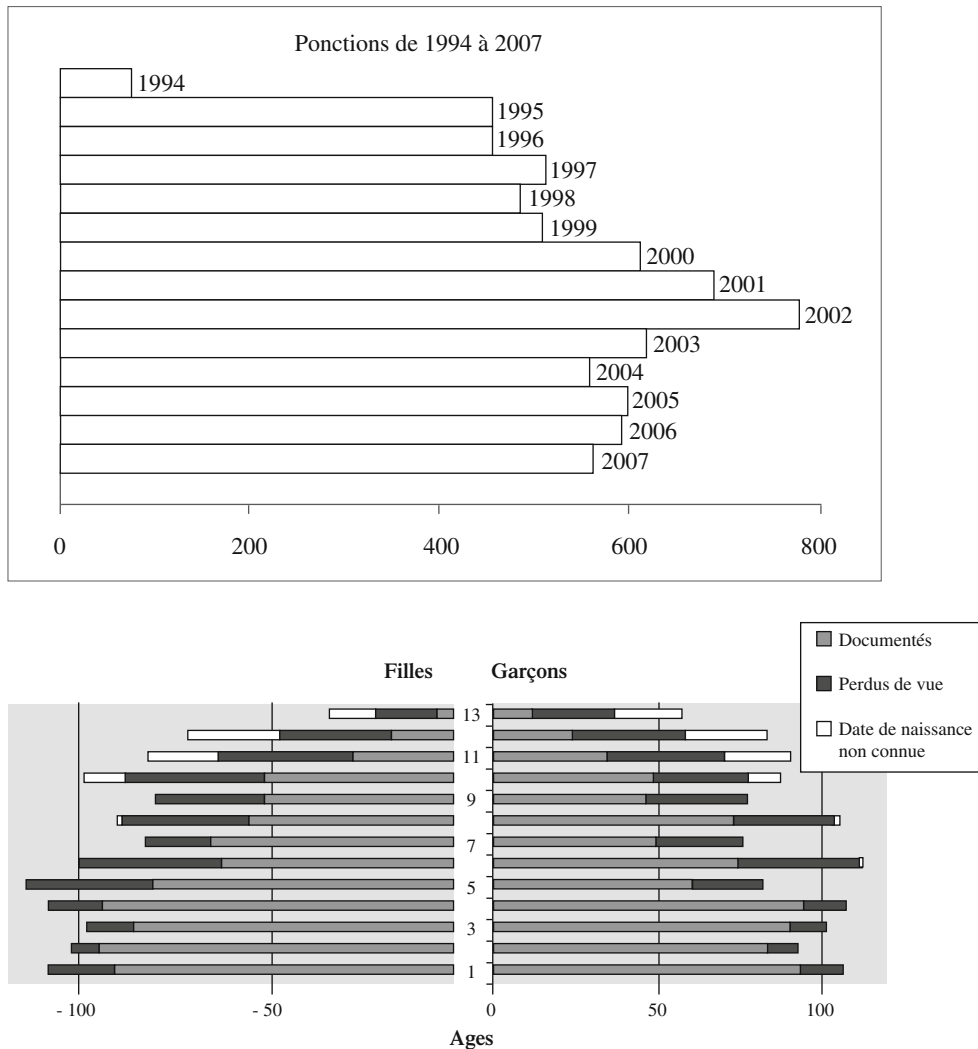


Fig. 1 – Activité de 1994 à 2007.

Tableau III – Répartition des ponctions, accouchements et naissances selon la technique.

Activité de novembre 1994 à décembre 2007	FIV classique	FIV ICSI	Total
Ponctions	4 646	2 860	7 506
Accouchement après transfert d'embryon(s) sur le cycle de ponction	883	728	1 834
Accouchements après transfert d'embryon(s) décongelé(s)	128	95	
Naissances après transfert d'embryon(s) sur le cycle de ponction	1 099	919	2 283
Naissances après transfert d'embryon(s) décongelé(s)	149	116	

de j2 jusqu'au stade blastocyste de la cohorte des embryons. Pour les transferts d'embryons congelés et décongelés, les effectifs n'ont pas permis de mettre une différence en évidence.

Le groupe documenté est représentatif de l'ensemble de la cohorte pour la répartition technique FIV et ICSI, la naissance d'un enfant unique ou de jumeaux (les 30 triplés ont été exclus), l'âge et le poids des parents, considérant pour ces deux derniers facteurs qu'ils sont affectés par des considérations socio-économiques et qu'ils exercent eux-mêmes des influences développementales sur la descendance. Nous avons pu observer que les mères des « ICSI » sont significativement plus jeunes que les mères des « FIV classiques », cette différence existe aussi entre mères de jumeaux et mères d'enfant singleton. Les mères les plus jeunes sont celles des jumeaux ICSI ($30,89 \pm 4,07$ ans), les mères les plus âgées sont celles des enfants singletons de FIV classiques ($33,12 \pm 4,28$ ans). Il n'y a pas de différence pour l'âge paternel entre les groupes jumeaux et singletons, en revanche les pères du groupe ICSI sont significativement plus âgés de

1 an (35,05 ± 6,33 ans). Nous avons vérifié si dans le temps l'âge des parents varie en particulier dans le groupe des singletons : l'âge de la mère en FIV classique augmente légèrement et la différence est significative entre les dix premières années d'activité et les quatre dernières, ce qui est en accord avec la tendance générale de l'âge maternel au moment de la conception. En revanche, l'âge du père n'est pas significativement différent entre ces deux mêmes groupes, alors qu'on aurait pu penser trouver un rajeunissement du père au fil du temps lié à l'effet de « rattrapage » du traitement des stérilités paternelles au début de l'ICSI.

Sur les 1 834 grossesses représentées par cette cohorte, nous avons pu recueillir les éléments du dossier obstétrical dans 72 % des cas (tableau V). Il n'y a pas de différence entre FIV classique et ICSI pour l'ensemble des pathologies ou chaque type pris séparément. En ce qui concerne les grossesses multiples, nous retrouvons une augmentation significative des menaces d'accouchement prématuré (MAP) et de la survenue d'hypertension artérielle (HTA) dans les grossesses multiples. En séparant les sous-groupes FIV classique singleton, ICSI singleton, FIV classique multiple et ICSI multiple, nous pouvons observer que l'hypertension artérielle est également augmentée dans le groupe des ICSI singletons par rapport aux FIV classique singleton, l'effet multiparité venant probablement masquer l'augmentation du risque si l'on compare les deux groupes FIV et ICSI sans tenir compte de la gémellarité. Les effectifs sont encore trop faibles pour rechercher un risque de diabète ou d'anomalie placentaire lié à un groupe ou un autre.

Le terme de naissance est connu dans plus de 92 % des cas. Il n'y a pas de différence entre FIV et ICSI concernant la prématurité (avant 37 semaines

d'aménorrhée [SA]) ni même la très grande prématurité (avant 32 SA). Il y a une différence entre le groupe des singletons et des jumeaux, mais après avoir isolé le groupe des singletons, nous n'avons toujours pas mis en évidence de différence entre FIV classique et ICSI. Le terme moyen de naissance est de 38,0 SA avec un écart-type de 2,6, celui des singletons est de 39,1 SA avec un écart-type de 2,4.

Le sex-ratio est normal dans la population FIV classique soit 51 % de garçons, et inversé dans tous les autres sous-groupes : ICSI 49 %, ICSI ou FIV classique avec culture prolongée 48 %, ICSI ou FIV classique avec transfert d'embryons congelé respectivement 49 et 48 %.

Le poids de naissance des enfants singletons est de 3 203 g (± 567) et celui des jumeaux est de 2 383 g (± 516), la différence est significative ($p < 0,01$). En revanche, parmi les enfants singletons il n'y a aucune différence significative entre les différentes techniques FIV classique *versus* FIV ICSI sans culture prolongée et sans étape de congélation (effectifs respectivement 462 et 350). Aucune différence n'est mise en évidence pour les cultures prolongée ou les transferts d'embryons décongelés dans les sous-groupes singletons FIV classique et FIV ICSI, mais les effectifs sont plus restreints : 110 et 166 singletons pour les cultures prolongées respectivement en FIV classique et FIV ICSI, 62 et 40 pour les transferts d'embryons décongelés.

Quel que soit l'âge du suivi, trois paramètres ont été enregistrés et évalués dans les différents groupes de population, il s'agit de la survenue d'une hospitalisation, d'un acte chirurgical, d'une prise en charge en rééducation. Les différentes pathologies rapportées ont été codées à l'aide de la Codification internationale des maladies (CIM10)

Tableau IV – Naissances uniques après transfert à différents stades de développement ou congélation.

Effectifs de naissance	Transfert embryon(s) j2 ou j3	Transfert de blastocyste(s)	Transfert embryon(s) j2 ou j3 décongelé	Transfert de blastocyste(s) décongelé(s)	Total
FIV classique	546	118	70	36	770
FIV ICSI	376	170	41	33	620

Tableau V – Pathologies obstétricales rapportées.

Pathologies obstétricales (Code O CIM 10)		MAP (%)	HTA et Toxémie (%)	Diabète (%)	Placenta (%)	Total pathologies/ Total grossesses (%)
FIV classique	Singletons	76 (9,87)	19 (2,47)	14 (1,82)	34 (4,41)	188/770 (24,41)
	Multiples	87 (36,55)	22 (9,24)	7 (2,94)	6 (2,52)	96/238 (40,34)
FIV ICSI	Singletons	49 (7,90)	32 (5,16)	12 (1,94)	29 (4,68)	178/620 (28,71)
	Multiples	86 (42,36)	21 (10,34)	4 (1,97)	5 (2,46)	91/203 (44,83)

permettant d'identifier toutes les atteintes congénitales d'origine embryologique ou fœtale sous le code Q. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre le groupe des FIV classiques et celui des FIV ICSI pour aucun de ces trois paramètres. En revanche, une différence a été observée entre le groupe des jumeaux et celui des singletons pour l'existence d'une hospitalisation néonatale ou de la prise en charge en rééducation. Nous avons vérifié si ce paramètre gémellarité ne venait pas encore une fois dissimuler une différence entre les techniques, nous avons donc regardé dans le groupe des singletons isolés en séparant les sous-groupes transfert j2 ou j3 et transfert de blastocystes, puisque ces groupes nous l'avons vu ne sont pas représentés de la même manière dans les deux techniques, classique et ICSI (tableau IV). Il y a plus de pathologies néonatales et d'actes chirurgicaux chez les enfants singletons nés après FIV classique comparés à ceux nés des FIV ICSI avec transfert à j2 ou j3 et sans étape de congélation dans notre cohorte : 18 % de prise en charge chirurgicale *versus* 12 et 48 % de prise en charge médicale *versus* 31,5 %. En revanche, il a été impossible avec les effectifs actuels d'identifier si un type de pathologie ou de chirurgie était plus spécifiquement rapporté avec les FIV classique qu'avec les FIV ICSI.

Il n'y a pas de différence observée pour les autres critères, notamment l'hospitalisation néonatale et la rééducation.

Enfin, l'aspect qualitatif des malformations rapportées n'a pas permis d'identifier un cluster spécifique. Les atteintes génétiques enregistrées ont toutes fait l'objet d'une enquête familiale, une seule atteinte *de novo* est décrite, il n'y a aucun cas de désordre de l'empreinte génétique. La pathologie génétique la plus fréquente chez l'homme, la mucoviscidose, est également celle qui a été retrouvée à trois reprises dans la cohorte, échappant ainsi au screening préconception effectué chez ces couples, soit parce qu'il s'agissait d'une mutation familiale rare non recherchée dans le bilan standard, soit parce qu'il n'y avait pas de stérilité paternelle avec recours à l'ICSI. En ce qui concerne les atteintes urologiques souvent rapportées dans la littérature (2, 3), la différence n'est pas significative entre FIV classique et FIV ICSI dans notre population de singletons, mais les effectifs sont très réduits (15 uropathies masculines et 5 féminines en FIV classique, 13 masculines et 7 féminines en ICSI).

Grâce aux données longitudinales du carnet de santé, nous avons choisi d'explorer la croissance des enfants de la population. Un groupe de 228 carnets de santé pouvant être utilisé pour évaluer les courbes de poids, taille et indice de masse corporelle (IMC) de chaque enfant jusqu'à l'âge de

6 ans a été retenu, parmi eux les trois cas de grands prématurés, inférieurs à 32 SA, ont été exclus d'une part parce que l'effectif est trop faible pour définir les caractéristiques propres à ce groupe, d'autre part les données morphométriques de la première année de vie de ces enfants sont souvent recueillies dans des conditions différentes de celles des autres enfants. La représentativité du groupe finalement retenu a été vérifiée par rapport à l'ensemble de la cohorte pour un certain nombre de critères : statut pondéral des parents, âge des parents, technique, gémellarité, terme de naissance et poids de naissance (tableau VI). Toutes les mesures enregistrées de poids et tailles au cours des 6 premières années chez les garçons et les filles sont réunies en nuages de point (fig. 2 à 5). Les percentiles en fonction de l'âge ont été estimés à partir d'une méthode de traitement transversal des données longitudinales (4). Le nuage de point des valeurs calculées de l'IMC à partir de chaque valeur du poids et de la taille enregistrée de manière simultanée pour chaque enfant est superposé aux courbes de référence de la population française (5) (fig. 6).

Nous avons vérifié l'homogénéité de la répartition singletons et jumeaux entre les deux populations FIV et ICSI pour pouvoir effectuer une comparaison entre ces deux groupes en conservant l'ensemble de l'effectif, sans avoir à étudier les singletons et jumeaux séparément. Les données sont présentées pour les classes d'âge 2, 4 et 6 ans comme celles définies pour la population de référence (5) (tableaux VII, VIII et IX). Nous avons également regardé si les jumeaux rattrapaient leur retard de croissance global observé à la naissance, aux mêmes tranches d'âge 2,4 et 6 ans, en les comparant au singletons, après avoir réuni cette fois les effectifs des deux techniques FIV classique et FIV ICSI (tableaux X et XI).

Discussion

Les résultats démontrent qu'une logistique permanente de suivi au sein même d'une équipe permet un recueil très satisfaisant de données valides. Les difficultés rencontrées tiennent davantage aux spécificités d'un suivi en pédiatrie qu'à la participation des familles. En effet, celui-ci tient nécessairement compte de l'évolution du développement de l'enfant. Il ne peut s'appuyer simplement sur des données à un instant qui ne reflètent pas nécessairement le retentissement sur le développement futur. C'est la raison pour laquelle nous nous efforçons de recueillir des données cliniques longitudinales spécifiques à cet âge de la vie, telles les données

Tableau VI – Caractéristiques principales du groupe des 228 carnets de santé.

L'ensemble de la cohorte des enfants de plus de 6 ans n = 1 053			Cohorte incluse dans l'étude de croissance n = 228		Groupe exclu (non suffisamment documenté) n = 825		
Groupes	Effectif	Pourcentage	Effectif	Pourcentage	Effectif	Pourcentage	Test de χ^2
<i>Sexe</i>							
Garçons	530	50,30 %	110	48,20 %	420	50,90 %	$p = 0,09$
Filles	509	48,30 %	118	51,80 %	391	47,70 %	
Inconnus	14	1,30 %	0	0 %	14	1,70 %	
<i>Technique</i>							
FIV classique	653	62 %	138	60,50 %	515	62,40 %	$p = 0,644$
FIV ICSI	400	38 %	90	39,50 %	310	37,60 %	
<i>Gémellarité</i>							
Singletons	612	58,10 %	137	60,10 %	350	57,60 %	$p = 0,544$
Jumeaux	441	41,90 %	91	39,90 %	475	42,40 %	
<i>Grade de prématurité</i>							
Non prématurés ≥ 37 SA	603	65,61 %	151	66,22 %	452	59,39 %	$p = 0,067$
Prématurés < 37 SA	256	27,85 %	74	32,45 %	182	23,91 %	
Grands prématurés < 32 SA	30	3,26 %	3	1,31 %	27	3,54 %	
Inconnus	164		0		164		
<i>Percentile du poids de naissance</i>							
]0-10[	189	24,3 %	47	20,6 %	142	25,8 %	$p = 0,491$
]10-90]	573	73,6 %	176	77,2 %	397	72,1 %	
]95-97[	6	0,8 %	2	0,9 %	4	0,7 %	
]97 et plus[	11	1,4 %	3	1,3 %	8	1,5 %	
Données manquantes	274		0		274		
<i>Statut pondéral de la mère* (323 données valides)</i>							
Insuffisance pondérale	21	7 %	7	5,40 %	14	8,40 %	$p = 0,627$
Statut pondéral harmonieux	231	70,80 %	103	71,30 %	128	70,30 %	
Surpoids	58	18,70 %	26	18,60 %	32	18,70 %	
Obésité	13	3,50 %	8	4,70 %	5	2,60 %	
Données manquantes	513		40		473		
<i>Statut pondéral du père* (287 données valides)</i>							
Insuffisance pondérale	2	0,70 %	1	0,80 %	1	0,60 %	$p = 0,790$
Statut pondéral harmonieux	143	49,80 %	61	47,70 %	82	51,60 %	
Surpoids	110	38,20 %	50	38,30 %	60	38,10 %	
Obésité	32	11,30 %	17	13,30 %	15	9,70 %	
Données manquantes	547		54		493		
<i>Âge des parents</i>							
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type	Test Anova
Âge moyen de la mère*	32,21	4,229	32,1	4,008	32,25	4,291	0,677
Âge moyen du père*	34,81	5,742	34,74	5,395	34,84	5,838	0,838

*Variables analysées avec des données pondérées sur la gémellarité : 836 parents pour 1 053 naissances

*Variables analysées avec des données pondérées sur la gémellarité : 836 parents pour 1 053 naissances

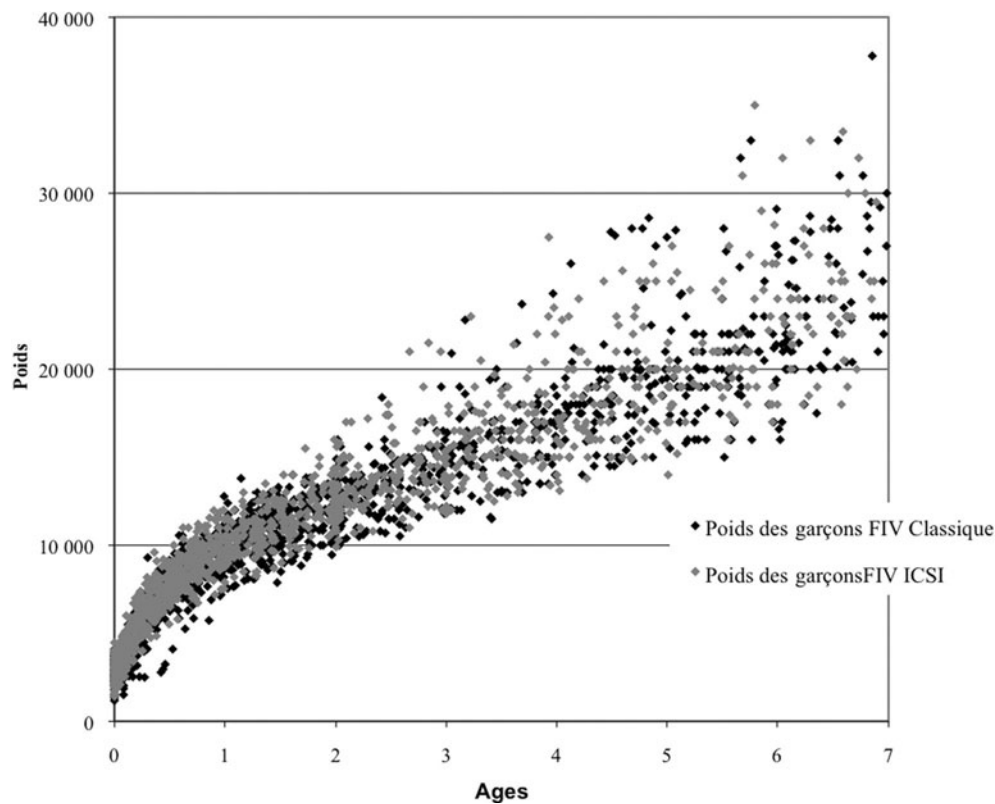


Fig. 2 – Poids des garçons de 0 à 6 ans.

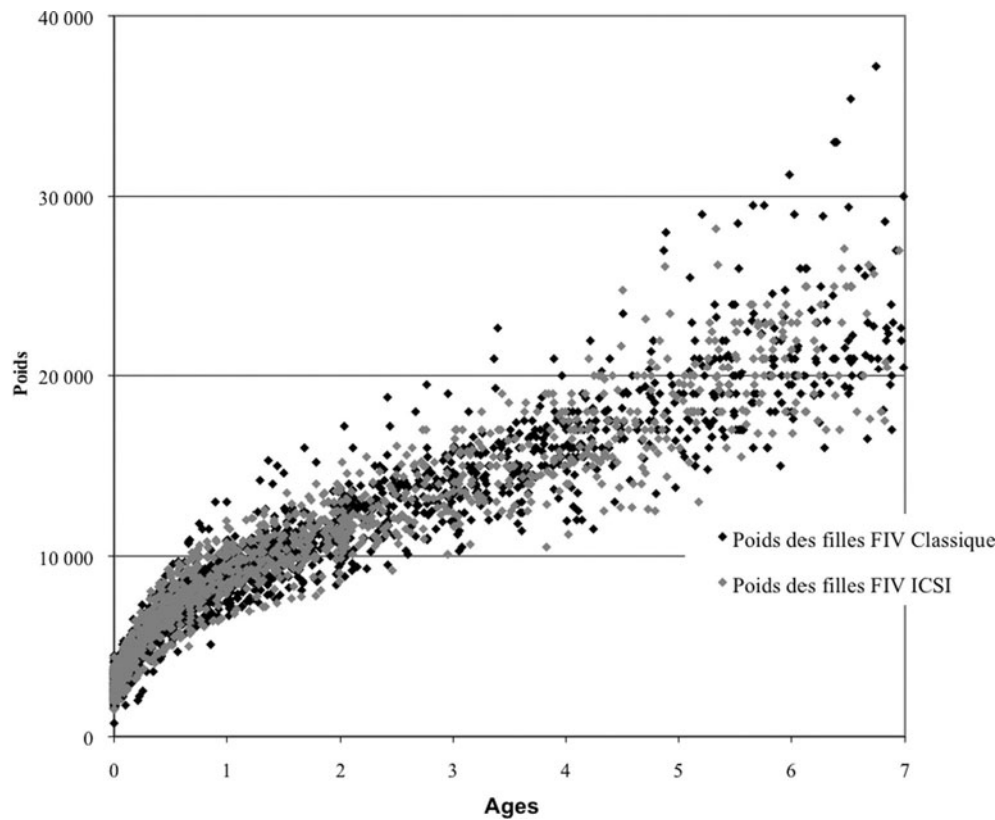


Fig. 3 – Poids des filles de 0 à 6 ans.

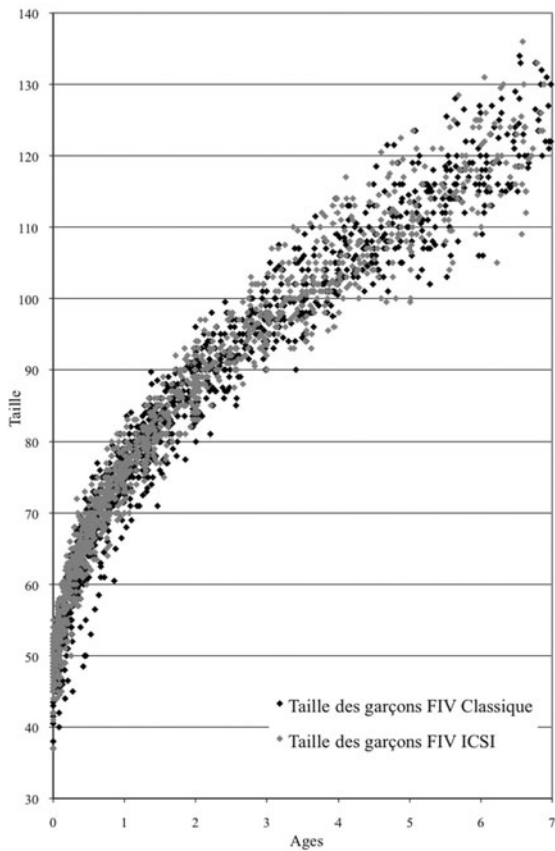


Fig. 4 – Taille des garçons de 0 à 6 ans.

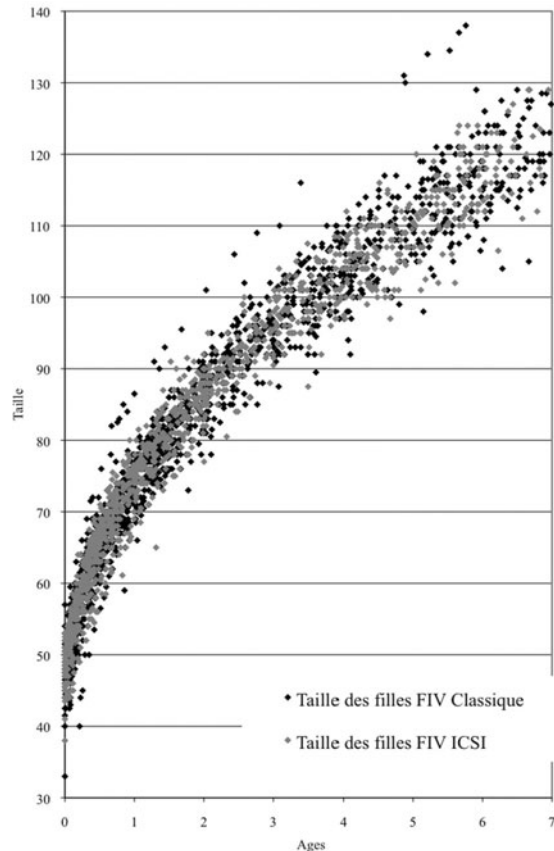


Fig. 5 – Taille des filles de 0 à 6 ans.

de croissance staturo-pondérale. En pratique, les critères d'évaluation en pédiatrie font actuellement l'objet de questions et de recherches en particulier pour l'évaluation à long terme (6). Ce type de travail au-delà de l'intérêt qu'il suscite pour la spécialité peut également répondre à certains objectifs plus généraux sur le suivi des enfants à long terme.

Les données de notre cohorte ne soulèvent pas de controverse si l'on se réfère aux données internationales publiées sur le sujet (2, 3, 7). La population de jumeaux est à l'évidence celle qui a été la plus marquée par une prise en charge médicale au début de la vie puisqu'on décrit des pourcentages significativement plus élevés d'accouchements prématurés, d'hospitalisations néonatales et de prise en charge en rééducation. Cependant, les données de croissance que nous avons pu recueillir pour ces enfants sont tout à fait rassurantes. Les jumeaux ont rattrapé le poids des enfants singletons dès l'âge de 2 ans et la taille à 6 ans (tableaux X et XI).

La méthodologie adoptée ne permet pas d'être très pointu sur l'évaluation du développement psychomoteur, seuls quelques éléments sont pour le moment retracés au travers des types de rééducations enregistrés (orthophonie, rééducation psychomotrice) ou du niveau scolaire (scolarisation spécifique, redoublement). Les quelques enfants qui font l'objet d'un suivi spécialisé ont retenu particulièrement notre attention et nous avons, pour ces enfants, recherché les données du bilan étiologique afin de ne pas méconnaître une pathologie génétique sous-jacente.

La comparaison des données poids et taille entre les groupes FIV ICSI et FIV classique dans les deux sexes ne permet pas de différencier ces enfants, au moins jusqu'à l'âge de 6 ans où les effectifs de la cohorte des 228 enfants retenus pour cette évaluation sont suffisants et en tout cas comparables à ceux qui ont permis le calcul des valeurs de références (fig. 2 et 5). Plus généralement, la croissance de l'ensemble de la cohorte des garçons et des filles est harmonieuse (fig. 6 et 7).

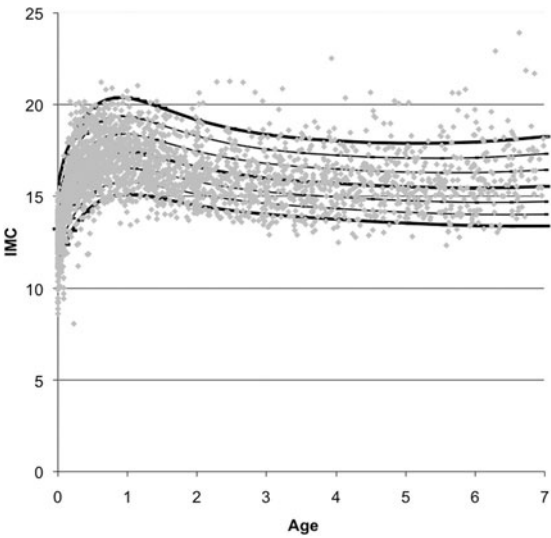


Fig. 6 – IMC des garçons, superposés aux percentiles de la population générale.

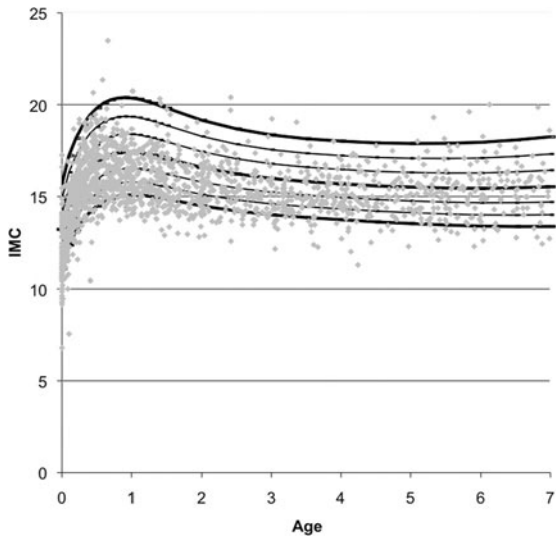


Fig. 7 – IMC des filles, superposés aux percentiles de la population générale.

Tableau VII – Comparaison des poids moyens dans trois classes d'âge.

Poids moyen chez les garçons en grammes				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV classique versus FIV ICSI
2 ans				$\Delta = 281$
Moyenne	12 400	13 045	13 326	IC = (-465) – (1027)
Écart-type	1 300	1 775	1 596	$p = 0,45$
Effectif	118	48	36	NS
4 ans				$\Delta = 57$
Moyenne	16 700	17 941	17 884	IC = (-1 205) – (1 319)
Écart-type	1 900	2 518	2 204	$p = 0,93$
Effectif	97	30	27	NS
6 ans				$\Delta = 704$
Moyenne	21 100	22 911	23 615	IC = (-1 445) – (2 853)
Écart-type	3 100	3 768	3 399	$p = 0,51$
Effectif	75	27	20	NS
Poids moyen chez les filles en grammes				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV classique versus FIV ICSI
2 ans				$\Delta = 274$
Moyenne	11 800	12 185	11 911	IC = (-450) – (998)
Écart-type	1 400	1 683	1 239	$p = 0,45$
Effectif	90	50	28	NS
4 ans				$\Delta = 223$
Moyenne	16 100	16 556	16 333	IC = (-729) – (1 175)
Écart-type	2 200	2 142	1 751	$p = 0,64$
Effectif	68	41	30	NS
6 ans				$\Delta = 456$
Moyenne	19 800	21 290	20 834	IC = (-1 648) – (2 560)
Écart-type	3 000	3 797	2 787	$p = 0,66$
Effectif	51	32	17	NS

*(5) Deheeger M, Rolland-Cachera MF (2004).

Tableau VIII – Comparaison des tailles moyennes dans trois classes d’âge.

Taille moyenne chez les garçons en cm				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV classique versus FIV ICSI
2 ans				
Moyenne	86,7	89,98	89,83	$\Delta = 0,15$ $IC = (-1,69) - (1,99)$
Écart-type	2,7	4,79	3,25	$p = 0,87$
Effectif	118	48	36	NS
4 ans				
Moyenne	102,9	106,78	106,24	$\Delta = 0,54$ $IC = (-1,98) - (2,66)$
Écart-type	3,6	3,8	4,18	$p = 0,61$
Effectif	97	30	27	NS
6 ans				
Moyenne	116,1	118,86	121,55	$\Delta = 2,69$ $IC = (-0,16) - (5,54)$
Écart-type	4	4,65	5	$p = 0,06$
Effectif	75	27	20	NS
Taille moyenne chez les filles en cm				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV classique versus FIV ICSI
2 ans				
Moyenne	85,6	88,1	88,36	$\Delta = 0,26$ $IC = (-1,6) - (2,12)$
Écart-type	3,2	4,34	3,12	$p = 0,78$
Effectif	90	50	28	NS
4 ans				
Moyenne	102,2	104,8	104,6	$\Delta = 0,20$ $IC = (-1,82) - (2,22)$
Écart-type	4,3	4,72	3,39	$p = 0,84$
Effectif	68	41	30	NS
6 ans				
Moyenne	114	118,16	117,15	$\Delta = 1,01$ $IC = (-2,85) - (4,87)$
Écart-type	5,4	7,51	3,27	$p = 0,60$
Effectif	51	32	17	NS

*(5) Deheeger M, Rolland-Cachera MF (2004).

Conclusions

Malgré ce, les résultats ne nous permettent pas pour le moment d’identifier si oui ou non ces enfants peuvent faire à plus long terme l’objet de risques métaboliques ou idiosyncratiques particuliers, nous poursuivons donc notre effort de collecte. Nous réfléchissons au quotidien à la façon

d’adapter les outils du recueil pour des enfants plus grands et aux moyens de collecter des éléments sur le ressenti de l’état de santé auprès des enfants eux-mêmes. Nous remercions les institutionnels qui soutiennent notre projet, la Fondation Saint-Joseph, l’Agence de la biomédecine et le département de Santé publique de l’Université Aix Marseille II.

Tableau IX – Comparaison des IMC moyens dans trois classes d'âge.

IMC moyen chez les garçons en kg/m ²				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV versus ICSI
2 ans				$\Delta = 0,44$ IC = (-0,22) – (1,10) $p = 0,19$ NS
Moyenne	16,5	16,06	16,5	
Écart-type	1,2	1,38	1,67	
Effectif	118	48	36	
4 ans				$\Delta = 0,14$ IC = (-0,59) – (0,87) $p = 0,70$ NS
Moyenne	15,7	15,67	15,81	
Écart-type	1,2	1,39	1,37	
Effectif	97	30	27	
6 ans				$\Delta = 0,17$ IC = (-1) – (1,34) $p = 0,77$ NS
Moyenne	15,6	16,14	15,97	
Écart-type	1,5	1,96	1,98	
Effectif	75	27	20	
IMC moyen chez les filles en kg/m ²				
	Population de référence *	FIV classique	FIV ICSI	Test de Student FIV versus ICSI
2 ans				$\Delta = 0,40$ IC = (-0,24) – (1,04) $p = 0,21$ NS
Moyenne	16,4	15,65	15,25	
Écart-type	1,3	1,37	1,34	
Effectif	90	50	28	
4 ans				$\Delta = 0,11$ IC = (-0,46) – (0,68) $p = 0,69$ NS
Moyenne	15,5	15,02	14,91	
Écart-type	1,2	1,17	1,2	
Effectif	68	41	30	
6 ans				$\Delta = 0,04$ IC = (-0,99) – (1,07) $p = 0,93$ NS
Moyenne	15,1	15,19	15,15	
Écart-type	1,2	1,74	1,64	
Effectif	51	32	17	

*(5) Deheeger M, Rolland-Cachera MF (2004).

Tableau X – Poids moyens (g) chez les singletons et jumeaux dans trois classes d'âge sur l'ensemble de la cohorte (filles, garçons et techniques confondus).

	Singletons	Jumeaux	Test de Student
2 ans			$\Delta = 698$ IC = -156–1 240 $p = 0,01$
Moyenne	12 896	12 198	
Écart-type	1 732	1 569	
Effectif	104	58	
4 ans			$\Delta = 607$ IC = -1,95–1 409 $p = 0,13$
Moyenne	17 355	16 748	
Écart-type	2 403	2 009	
Effectif	76	52	
6 ans			$\Delta = 1366$ IC = -101–2 833 $p = 0,067$
Moyenne	22 790	21 424	
Écart-type	3 785	3 407	
Effectif	51	45	

Tableau XI – Tailles moyennes (cm) chez les singletons et jumeaux dans trois classes d'âge sur l'ensemble de la cohorte (filles, garçons et techniques confondus).

	Singletons	Jumeaux	Test de Student
2 ans			$\Delta = 2,35$ IC = 1,06–3,64 $p = 0,00044$
Moyenne	89,88	87,58	
Écart-type	18,88	10,8	
Effectif	105	58	
4 ans			$\Delta = 1,79$ IC = 0,33–3,25 $p = 0,016$
Moyenne	106,17	104,45	
Écart-type	18,33	14,63	
Effectif	77	52	
6 ans			$\Delta = 2,94$ IC = 0,66–5,22 $p = 0,012$
Moyenne	120,26	117,32	
Écart-type	35,24	27,36	
Effectif	51	45	

Références

1. Eléfant E, Boyer M, Boyer P *et al.* (1992) Teratogenic Agent Information Centre: fifteen years of counseling and pregnancy follow-up. *Teratology* 46: 35-44
2. Bonduelle M., Wennerholm UB, Loft A *et al.* (2005) A multi-centre cohort study of physical health of 5-years-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20: 413-9
3. Haute autorité de santé, Service Évaluation des actes professionnels, Service Évaluation médicoéconomique et santé publique (2006) Évaluation de la fécondation in vitro avec micromanipulation (Indication, coût efficacité, risque pour la descendance). Saint-Denis
4. Cole TJ (1990) The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr* 44: 45-60
5. Deheeger M, Rolland-Cachera MF (2004) Longitudinal study of anthropometric measurements in Parisian children aged ten months to 18 years. *Arch Pediatr* 11: 1139-44
6. Sinha I, Jones L, Smyth RL *et al.* (2008) A systematic review of studies that aim to determine which outcomes to measure in clinical trial in children. *PLoS Med* 5: 569-78
7. Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M *et al.* (2007) Post-neonatal hospitalization and health care costs among IVF children: a 7-years follow-up study. *Hum Reprod* 22: 2136-41

S. Epelboin

Un utérus en prêt : pour qui, pourquoi et comment ?

Introduction

La définition de la gestation pour autrui (GPA) retenue par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) est l'implantation, dans l'utérus d'une femme désignée sous le nom de « mère porteuse » ou « gestatrice », d'un embryon issu de la fécondation *in vitro* d'un ovocyte d'une femme n'ayant pas d'utérus ou pas d'utérus fonctionnel (du fait d'une malformation congénitale ou d'une hystérectomie) par les spermatozoïdes de son conjoint (1), mais avec des ovaires fonctionnels. Cette définition comprend implicitement le fait de porter et mettre au monde pour le compte d'un tiers (parents « d'intention ») l'enfant (ou les enfants) issu(s) de cette conception. Il s'agit dans cette définition de satisfaire au projet d'un couple.

Cette forme de maternité de substitution diffère biologiquement de la pratique développée en France dans les années 1990, où les « mères porteuses » étaient inséminées avec le sperme du mari de la femme souffrant d'infertilité d'origine utérine et se trouvaient donc être à la fois génitrices et gestatrices de l'enfant cédé (2).

Une troisième forme de maternité de substitution, revendiquée par des hommes célibataires ou des couples d'homosexuels hommes, fait appel à la fois à une donneuse d'ovocytes et à une femme gestatrice. Enfin, des situations peuvent se présenter où la mère gestatrice porte pour autrui un embryon fruit de la fécondation d'un ovocyte de donneuse par un sperme de donneur.

Le débat de la fin la première décennie de ce siècle est essentiellement centré sur la situation définie par le CNGOF ; il reflète cependant, non pas une délibération autour d'avancées médicales – les modalités de transfert d'embryons sont devenues routine dans l'ensemble des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) –, mais une réflexion sociale normative sur les limites à fixer à la satisfaction du désir d'enfant inassouvi,

pour lesquelles aucune attitude consensuelle ne se dégage au regard de la diversité des législations en vigueur.

Législations, état des lieux et débat bioéthique

La gestation pour autrui a été tout d'abord condamnée en France par la Cour de cassation en 1991, puis interdite lors du vote de la loi dite de bioéthique de 1994 (3), confirmant la jurisprudence. L'interdiction a été reconduite en 2004 (4). Selon les termes de l'article 16-7 du Code civil, « toute convention portant sur la procréation ou la gestation pour le compte d'autrui est nulle ». La loi prévoit par ailleurs des sanctions d'ordre pénal, au motif que la gestation pour autrui constitue une provocation à l'abandon d'enfant (article 227-12 du Code pénal). L'absence d'un réel débat de fond au sein de la société présidant à cette décision d'alors est certainement à l'origine de frustrations et de l'intensité et de la richesse du débat bioéthique précédent la relecture de la loi en 2009-2010. Des associations militant pour l'autorisation encadrée de la GPA se sont constituées, et mettent en avant (5) l'expérience de pays comme la Grande-Bretagne qui a autorisé cette pratique juridiquement définie (6), avec l'argument majeur de la lutte contre les pratiques clandestines qui se développent, notamment par Internet. (Les lois britanniques interdisent toute publicité ou entremise à fins commerciales, imposent un dédommagement des frais occasionnés et autorisent la femme qui porte l'enfant à se rétracter tant qu'elle ne l'a pas remis au couple commanditaire.)

Il existe une grande disparité entre les États quant à l'autorisation ou l'interdiction de cette pratique, et, dans le premier cas, quant à son encadrement légal. La GPA est strictement prohibée, comme en France, Allemagne, Italie, Espagne et Suisse. Elle est autorisée, outre en Grande-Bretagne, en

Espagne, Grèce, Belgique et aux Pays-Bas, en Biélorussie, République de Moldavie, Russie et Ukraine, en Israël et en Inde. Aux États-Unis et au Canada, les législations varient selon les États ou les provinces. Cette possibilité hors frontières conduit des couples français à s'engager dans des démarches de GPA à l'étranger, dans la logique de ce qu'il est convenu d'appeler le « tourisme procréatif » entre différents pays d'histoires souvent partagées, de cultures libérales et démocratiques, mais de législations et de tolérance morale différentes en ce domaine. Cependant, cette pratique s'est également répandue sans aucune législation cadrante dans de nombreux pays, dans un contexte où l'appât financier prend naturellement le pas chez des femmes démunies sur les sentiments prônés de générosité et solidarité entre femmes, et où les dérives commerciales mettent en lumière l'exploitation de ces femmes, tel dans l'exemple indien.

« Réactionnaire » est le terme parfois utilisé pour qualifier les attitudes ou intervenants qui mettent en question l'argumentaire en la faveur de la libéralisation de la GPA (8). Or, les éléments de la controverse sont multiples, médicaux, psychologiques, éthiques et juridiques. Se posent les questions fondamentales de la redéfinition de la filiation humaine, du danger d'instrumentalisation du corps des femmes (9), les risques physiques et psychiques qu'elles encourent, la négation des interrelations mère-enfant pendant la grossesse, tous thèmes qui alimentent le débat actuel en France.

Les arguments incontestablement généreux avancés en faveur de la légalisation de la GPA prennent en compte en priorité le mal d'enfants des couples dont la femme n'a pas d'utérus, reléguant au second plan, et l'intérêt de l'enfant, et ceux de la « mère porteuse ». Pourtant, les GPA mettent bien en cause l'ensemble de ces protagonistes et leur parentèle, mais les partis pris le sont curieusement rarement en fonction de l'ensemble des sujets concernés.

Une commission sénatoriale s'est déclarée en 2008 convaincue de la nécessité d'autoriser cette pratique de manière encadrée (7) (Annexe 1).

Tour à tour, en 2008-2009, différentes institutions nationales de poids moral incontestable ont engagé une réflexion et émis des avis, tels que l'OPECST (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques), l'Académie de Médecine (12) (Annexe 2), le Conseil d'État (Annexe 3), le Comité national d'éthique (Annexe 4), le Collège national des gynécologues et obstétriciens français (1).

Les éléments de leur réflexion et leurs conclusions sont résumés dans les encadrés joints. Nous analyserons successivement, sans évidemment prétendre à l'exhaustivité, les arguments qui reviennent le plus souvent au cœur du débat.

Le droit à l'enfant et à une médecine égale pour tout et tous ?

La souffrance des couples, quand l'utérus de la femme est absent ou inapte au développement d'une grossesse, est incontestable. Les bonnes intentions de ces couples vis-à-vis de l'enfant désiré, qui serait porté à maturité par une autre, sont indéniables. Mais la société se doit-elle de fournir une réponse médicale, qui mettrait en jeu la santé physique et psychique de la femme qui prête son corps, quand on ne peut par ailleurs répondre que par des présupposés aux interrogations légitimes sur le devenir des enfants issus d'un tel contexte ? Le plaidoyer pour le droit à l'enfant suggère une mission égalitaire de la médecine : puisqu'il y a des solutions pour les femmes qui n'ont pas d'ovaires (le don d'ovocytes), il serait injuste d'en refuser à celles qui n'ont pas d'utérus. Or, le don d'ovocytes requiert bien entendu de la femme donneuse qu'elle subisse un parcours médical difficile, des bilans sanguins et échographiques, un traitement hormonal pendant deux à trois semaines, une ponction ovarienne avec ou non anesthésie, risque une hyperstimulation ovarienne... Cependant, le processus ne relève pas des mêmes enjeux que ceux d'une mère porteuse, ne présente pas le même investissement de neuf mois de vie de femme enceinte, ni de retentissement démontré sur la santé ultérieure. La médecine ne peut être comptable d'une égalité de traitement dans des pathologies différentes, pas plus qu'elle ne promet une identité de succès de l'AMP dans tous les contextes d'infertilité.

De même, il est sous-entendu que les indications en seraient très limitées. Les chiffres disponibles font état de 60 à 100 naissances par an au Royaume-Uni, et d'un millier aux États-Unis (10) – aucun chiffre n'est par ailleurs publié quant au nombre de tentatives infructueuses pratiquées chez les candidates mères porteuses. Mais si la GPA était légalisée pour les femmes congénitalement privées d'utérus, porteuses de malformations utérines graves, ou ayant subi secondairement une hystérectomie, pour cancer ou à visée hémostatique (après une grossesse cervicale, une fausse couche ou un accouchement hémorragique), quel serait l'argumentaire pour refuser d'autres demandes difficiles à chiffrer, telles que des échecs répétés de transferts embryonnaires en fécondation *in vitro* ? Il serait inégalitaire de ne considérer comme acceptables que les cas extrêmes. Les limites médicales des indications seront bien difficiles à déterminer malgré la compétence des experts désignés : la souffrance de la stérilité est identique, qu'elle soit liée à une absence patente d'utérus, à une malformation, ou à une situation inexpliquée d'échecs d'implantation embryonnaire ou de fausses couches à répétition.

Au-delà, l'acceptation dans son principe de la GPA ouvre le débat sur certaines indications communément considérées comme des dérives, psychologiques (désir d'enfant contrarié par la crainte de subir les aléas de la grossesse) ou sociétales (femmes ayant atteint un âge ne leur permettant plus, sans risque, d'avoir une grossesse) qu'il faudra cependant prendre en compte. Avec l'autorisation du principe de gestation pour autrui, d'autres indications sociétales seront forcément mises en avant, telles que le souhait de parentalité d'hommes célibataires, ou de couples d'hommes homosexuels, en cours dans des pays voisins comme la Belgique, dans la mouvance parallèle du combat pour le droit à l'adoption des couples homosexuels. On ne peut pas simplement mettre ces indications à l'index en les traitant comme des dérives sans lien avec le projet plus classique de couples d'intention tels que définis ci-dessus, dès lors qu'elles sont considérées comme acceptables dans d'autres pays. Dans un article publié à l'été 2009 dans *Médecine Sciences*, S. de Mongolfier et A. Mirkovic évoquent la société *Circle Surrogacy* comme l'un des plus importants intermédiaires dans la pratique des maternités de substitution. Citant un taux de croissance des transactions gérées par cette société de 6 000 % en 12 ans, les auteurs révèlent que le pourcentage de clients homosexuels est passé de 10 % au début à 80 % actuellement, originaires de 29 pays (10). Il semble donc difficile que soient tracées des limites, quand des centres reconnus ont pignon sur net, tel que *Conceptual Options*, centre de maternité de substitution et don d'ovocytes à San Diego et Los Angeles : « Nous nous dédions à prendre soin des arrangements de maternité de substitution et don d'ovocytes. Notre réputation est connue à travers le pays et dans le monde entier pour être du plus haut standard dans le domaine de l'assistance à la reproduction. Nous offrons un choix complet de solutions adaptées à toute notre clientèle (mariée, célibataire ou homosexuelle) à travers le monde, en matière de don d'ovocytes et de maternité de substitution ».

L'argument de la lutte contre le tourisme procréatif

L'obligation pour les couples d'aller chercher ailleurs où la loi est inexistante ou moins restrictive est pointée, nous l'avons vu, comme une injustice, mais également comme un élément d'entretien et de cautionnement de pratiques dénoncées pour leur caractère commercial et incontrôlé, ce que réglerait une autorisation encadrée en France. Or, si l'évaluation actuelle des « besoins » en mères gestantes pour autrui tourne autour d'une centaine par an, elle n'envisage pas, nous l'avons évoqué,

l'ensemble des situations qui seraient toute aussi légitimes, bien que moins clairement désignées. La demande excédera donc probablement toujours l'offre et les couples iront encore chercher d'autres contrats sous d'autres climats. L'autorisation en France ne changera malheureusement rien aux pratiques dénoncées ailleurs. Elle ne pourra donc éluder ces situations, ainsi que le définit le rapport de l'OPECST : « Il est des couples que l'on souhaite aider, mais la loi doit poser des limites » (11).

Les enjeux de filiation

L'argument de la parenté « biologique »

L'avis de l'Académie de médecine sur la GPA (mars 2009) met en exergue « les complications et situations complexe » et la remise en cause du « statut légal, anthropologique et social de la maternité qui ne manque pas de susciter de légitimes réserves éthiques ».

Dans les années 1990, les maternités de substitution troublaient car la mère porteuse inséminée était également mère « biologique », à l'origine de l'ovule fécondé. La GPA concerne l'embryon du couple demandeur, obtenu en fécondation *in vitro* avec les gamètes du couple, puis replacé dans l'utérus de la mère porteuse. Cette différence dans l'origine génétique de l'embryon est mise en exergue par les associations, qui souhaitent la légalisation de la GPA et arguent du fait que la mère utérine mais non ovarienne ne serait plus en situation de se considérer mère à part entière et pourrait vivre une grossesse détachée du projet d'enfant. À l'appui de ceci est souvent cité le témoignage d'une mère porteuse américaine, qui a vécu successivement et différemment les deux situations (5). Cependant, nul ne peut présupposer que porter un enfant génétiquement d'autrui générerait une rétrocession plus facile après la grossesse.

L'expérience des maternités après don d'ovules indique combien les femmes ont le sentiment de façonner leur enfant pendant le temps de la grossesse qui minimise la part de l'ovule, de même que dans notre droit, comme dans de multiples cultures, la naissance détermine la filiation. L'anthropologie, la sociologie et la psychanalyse nous ont appris à considérer que la filiation d'un individu était un subtil mélange de l'inné (capital génétique) et de l'acquis (capital éducationnel). Les nouvelles techniques d'AMP permettent la partition de la fabrication d'un individu, la visualisation, donc la sacralisation des gamètes et des embryons, et introduisent de nouvelles subtilités (ou complications) dans le questionnement sur les origines. La généalogie

d’un enfant se fonde-t-elle par sa conception ou par sa naissance ? La proposition sénatoriale introduit la notion du « droit de repentir » dans les trois jours qui suivent l’accouchement de la mère porteuse, ce qui témoigne de l’ambiguïté de cette définition. L’argument de la prépondérance du lien gestationnel sur le lien génétique est utilisé depuis plusieurs décennies lors des consultations de couples, dont l’infertilité implique le recours au don de gamètes pour soutenir leur projet, et les conforter dans la perspective d’une parenté future sans équivoque. L’accueil d’embryons, autorisé dans la loi française depuis 1994 (3), et mis en œuvre depuis 2001, repose également sur une conception de la maternité opposée à celle de la gestation pour autrui. Un couple ayant bénéficié de la procréation assistée et qui souhaite mettre terme à son projet parental peut faire don de ses embryons surnuméraires congelés à un autre couple souffrant d’une double impossibilité de concevoir sans possibilité de recours aux autres techniques d’AMP. Cette technique permet également d’envisager un avenir pour les embryons surnuméraires congelés après AMP (d’où la dénomination d’accueil), autre que la destruction ou l’utilisation pour la recherche. Le don pour l’accueil d’embryons repose, à la différence de la GPA, sur une valorisation du temps de maternité utérine d’un enfant conçu à partir des gamètes d’autrui, ce qui motive les couples en ce qu’il représente une alternative essentielle à l’adoption (13). Dans l’accueil d’embryon, personne humaine potentielle venue d’ailleurs (un autre couple), le temps de la grossesse est celui où s’exprime le rôle nourricier de la mère, et se forge la paternité sociale vers l’appropriation de l’enfant, finalisée à la naissance qui détermine, comme nous l’avons vu, la filiation. Dans un sens opposé à celui des gestations pour autrui, cette grossesse se présente dans la continuité du destin initial de l’embryon projeté par les parents concepteurs, comme une véritable « maternité de substitution », ou une adoption *in utero*, qui s’initie comme contractuelle et devient titulaire. Fondamentalement, la gestation pour autrui se différencie, et du don d’ovule, et de l’accueil d’embryons, qui relativisent l’apport de l’héritage géné-

tique pour valoriser la parentalité gestationnelle (tableau I). Les arguments fondés sur la valorisation de la structuration du lien pendant la grossesse peuvent difficilement être inversés pour les besoins d’une autre cause.

Filiation et parenté : mise en perspective anthropologique

La mise en perspective anthropologique peut être un outil contributif, parmi d’autres, pour aborder différemment les questionnements fondamentaux que suscite la maternité pour autrui. Diverses questions sur le thème de la filiation et la généalogie émergent au fil du temps, telle celle rapportée en 2009 par un quotidien libanais exposant le cas d’« une chiite qui a porté un enfant pour un couple maronite : à la naissance de l’enfant se pose la question de sa religion... ? ». Ces questions trouvent cependant réponses dans d’autres systèmes de parenté, rencontrées de par le monde dans bien des sociétés, où les parents qui élèvent l’enfant ne sont pas toujours les géniteurs. « L’anthropologie de la parenté classique », s’interroge la psychanalyste et anthropologue G. Delaisi de Parceval, « peut-elle donner un éclairage quant aux aménagements de la parenté qui s’opèrent au cours de ces transactions ? » Elle rappelle (14) que « l’adoption comme le don d’enfants constituent une pratique très courante pour pallier la stérilité dans de nombreuses sociétés ». Elle cite en ce sens l’anthropologue F. Héritier (15) : « Tous les ersatz de la procréation naturelle que nous découvrons aujourd’hui ont – ou ont eu – peu ou prou des répondants institutionnels dans diverses sociétés historiques ou actuelles... Sans le recours à des artifices techniques qu’il était impossible de mettre en œuvre [...] le simple jeu de règles sociales et de représentations particulières de la personne a concouru ici ou là à l’invention de situations originales qui pallient de fait la stérilité individuelle. L’enfant n’y est pas toujours obligatoirement conçu dans le ventre de la « mère », et les parents peuvent être plus de deux. »

Tableau I – Filiations utérine, génétique et sociale en procréation assistée avec don et adoption.

	Maternité génétique	Maternité utérine	Maternité sociale	Paternité génétique	Paternité sociale
Don de sperme	+	+	+	–	+
Don d’ovules	–	+	+	+	+
Accueil d’embryons	–	+	+	–	+
Gestation pour autrui	+	–	+	+	+
Adoption	–	–	+	–	+

Envisageant la « circulation des enfants en milieu traditionnel » dans une perspective plus large que dans les cas de stérilité individuelle, l'anthropologue S. Lallemand (16) décrit les systèmes largement répandus de parentés dites « classificatoires », qui sont un ensemble de parents plus ou moins affiliés biologiquement à l'enfant, ou sont des parents d'appoint ou de complémentarité appartenant au groupe social des parents biologiques.

Dans un récent ouvrage, *Métamorphoses de la parenté* (17), l'anthropologue M. Godelier redéfinit la parenté en se référant aux différents stades de la « fabrication » de l'enfant, c'est-à-dire la fécondation, la gestation et parturition. « Alors que dans nos sociétés, la femme qui mettait au monde un enfant était perçue à la fois comme la génitrice et la mère de cet enfant, à partir du moment où l'on peut disjoindre artificiellement les trois moments naturellement indivisibles de la fabrication de celui-ci, la question se pose de savoir ce que sont, pour l'enfant né dans ces conditions, les diverses femmes qui ont l'une après l'autre contribué à sa naissance. »

L'auteur énumère les différentes fonctions qui forment le statut de parents dans toutes les sociétés, fonctions qui sont pour la plupart « divisibles, et partageables, et peuvent donc être redistribuées de façon très diverses ». Parmi ces multiples fonctions, il distingue celle de conception et d'engendrement, puis celle qui consiste à élever, nourrir, aider, protéger le jeune enfant et le mener ainsi jusqu'à l'adolescence. « Du fait de leur lien de parenté avec tel enfant, et selon la nature de ce lien, les parents peuvent ou doivent doter cet enfant dès sa naissance ou plus tard dans la vie, d'un nom, d'un statut social... Une autre fonction consiste pour les parents, qu'ils soient parents de naissance, parents d'adoption ou parents nourriciers, à exercer certains droits sur la personne de cet enfant. » M. Godelier met en garde contre le fait de restreindre le champ de la parentalité au désir d'enfant. « La parentalité (*parenthood*), dit-il, ne peut se réduire au « parenting », au désir et au fait de se comporter en parent. »

Quelques exemples (17) illustrent les variations dans la valorisation de ces diverses fonctions du champ de la parentalité, selon les modes de descendance et d'alliance, qui existent dans une société à une époque donnée. Chez les Baruya de Nouvelle-Guinée, société de système patrilineaire, le père est présenté à la fois comme le concepteur et le nourricier (par son sperme) et il est à la fois le géniteur et le père social de l'enfant. Le sperme de l'homme est censé nourrir le fœtus dans le ventre de la femme. La femme baruya peut donc à peine être considérée comme génitrice de son enfant puisque rien ne passe de son corps à celui de l'enfant, et que son corps sert de réceptacle à un corps engendré nourri par l'homme. Même le lait que la jeune mère don-

nera à son enfant provient d'une transformation du sperme paternel. La femme baruya est donc traditionnellement réduite à un rôle de « couveuse », finalement proche de celui de la mère gestatrice dans la GPA. Chez les Trobriandais du Pacifique, dans un système matrilineaire, c'est la mère qui conçoit l'enfant lorsqu'un esprit – enfant ancestral – pénètre son corps. Le père nourrit l'embryon de son sperme, il est père nourricier et social de cet enfant, mais n'en est pas le géniteur. « La mère donne son sang, sa chair, leur identité interne, et par le sang qu'il reçoit de sa mère, chaque enfant est rattaché au flot ininterrompu de sang qui coule de la femme. Le père, lui, donne à l'enfant, en quelque sorte, son identité externe, mais il le nourrit aussi, d'abord dans le ventre de sa mère » (17). Dans la société trobriandaise, le temps de la gestation est considéré comme primordial dans ce que sera l'enfant futur, dont la filiation sera celle de la mère qui l'a porté, dont le rôle est prépondérant.

Chez les Nzema du sud du Ghana, il est dit que l'esprit d'un défunt va se loger dans l'utérus d'une femme, souvent membre de son clan, se transforme en fœtus par l'effet des rapports sexuels entre son père et sa mère. La femme, avec son sang menstruel, va produire la chair et les os de l'enfant, l'homme, son sang. Le sperme de l'homme porte en lui une force vitale qui, si elle est « agréée » par celle du sang de la femme, va donner à l'enfant en gestation la capacité de se mouvoir, puis de respirer. Sans cet agrément décisif du sang de la femme, l'enfant n'est pas conçu.

Dans la société des Maenge de la Nouvelle-Bretagne, en Océanie, étudiée par M. Panoff (18), le sperme de l'homme est censé fabriquer le corps de l'enfant et lui donner le mouvement et le souffle. La femme, elle, ne partage pas de substance avec son enfant, mais elle contient celui-ci dans son utérus, et lui donne alors son « âme intérieure ». Panoff reprend une expression de l'ancien droit français, pour parler de « la parenté par la verge », opposée à « la parenté par le ventre ». La femme maenge n'est donc pas génitrice ni nourricière, mais cependant bien plus que couveuse, puisque responsable de l'animation de l'enfant.

Ces représentations paradoxales des rôles parentaux dans la fabrication des enfants au sein de sociétés exotiques suggèrent que chacun peut y trouver un modèle pour soutenir, soit la thèse que la mère porteuse du XXI^e siècle n'inaugure pas un rôle de simple couveuse, soit la thèse inverse du rôle fondamental de la gestatrice dans l'insufflation de la vie et de l'« âme » de l'enfant. Dans notre société, ce n'est qu'après des travaux scientifiques relativement récents, que s'est élargie la représentation de l'utérus « moule » ou « couveuse », et qu'a été valorisé son rôle fonctionnel dans les échanges materno-fœtaux que nous détaillerons plus loin

(chapitre « Intérêt de l'enfant »). Que retenir, par ailleurs, de ces modèles de rôle nourricier du sperme paternel prioritaire dans le façonnage de l'enfant, si ce n'est que dans le cas de la GPA, seuls les enfants de mère porteuse vivant en couple pourraient bénéficier de l'apport nutritif d'un second père, ce qui mettrait le nombre de parents « classificatoires » des deux sexes à égalité ?

Reste de la force de l'acte de mise au monde qui conférerait à la femme le titre indélébile de mère. Les travaux de l'ethnologue folkloriste F. Loux sur le recueil des proverbes de l'Ancienne France, notamment dans le domaine de la naissance et de la petite enfance, illustrent bien comment le bon sens populaire a relié les fonctions d'engendrer, d'élever, de préserver et nourrir les enfants (19) : « Qui t'a mis au monde, qu'il te débarbouille », « Qui fait l'enfant, doit le nourrir ». En 1994, la justification de l'interdiction de la GPA dans la loi a reposé sur la cohérence du système juridique français, dans lequel l'enfant ne peut avoir qu'une seule mère : celle-ci doit donc être la femme qui accouche. Et pourtant, la sociologue M. Iacub raconte dans son ouvrage *L'empire du ventre* une « autre histoire de la maternité », celle de femmes qui contractent avec d'autres pour pouvoir accéder à la maternité (20). Son travail consacré à « l'histoire secrète de la maternité, celle qui se joue dans les hiatus entre filiation et accouchement, toute cette aventure oubliée des jeux de vérité avec la maternité », rapporte de multiples cas de substitutions maternelles, notamment au *xix^e* siècle, lorsque la légitimité d'une filiation était contestée à l'occasion de conflits familiaux ou de partages d'héritage. Son analyse, quelque peu provocatrice, met en avant l'argument de la « paix des familles » comme alibi destiné à justifier « l'existence d'une règle particulière pour se doter d'une progéniture légitime ». Fervente partisane de la légalisation de la GPA, M. Iacub rappelle que, jusque dans les années 1970, le Code Napoléon assurait aux femmes la « liberté » de « devenir mère sans accoucher d'un enfant » en « couvrant » ces substitutions. Elle dénonce la « police du ventre », introduite par les lois de bioéthique mises en place au nom de l'indisponibilité du corps humain, et le monopole absolu que ces lois accordent à l'engendrement pour définir la maternité « biologique », quand les techniques d'AMP définissent deux « vérités maternelles, tout aussi corporelles l'une que l'autre », la vérité génétique et la vérité gestationnelle.

Cette mise en lumière d'autres définitions ou systèmes de parenté, de circulation d'enfants dans diverses sociétés, de substitutions de maternité, permet d'aborder différemment les aspects génétiques, biologiques et sociaux de la reproduction humaine, et peut qualifier les parents d'intention dans la GPA au même titre que des parents adoptifs. La concrétisation de la dissociation de la sexualité et de la procréation existe déjà dans nos

sociétés, introduite par la contraception, évidente dans l'AMP, et la fragmentation de la parenté, entre fait biologique et social, préside à l'AMP avec tiers donneur. Au demeurant, aucune culture, aucune époque, ne peut être un modèle référent pour qualifier la situation résiduelle de la mère porteuse après la naissance. Ce sont bien les préoccupations psychosociales et médicales à laquelle celle-ci et son environnement sont confrontés qui prennent le pas dans l'argumentaire.

Problématiques concernant la mère porteuse et son environnement

Les préoccupations psychosociales

Elles reposent sur l'évidence que la grossesse n'est pas seulement un événement individuel, ou de couple, mais implique le groupe familial et social. Les questions sont multiples. Comment, pour la femme porteuse, gérer les questions d'issue de la grossesse sans enfant, le regard d'autrui, les questions de ses proches, imaginer un avenir où la mémoire des autres ne lui permettra jamais de faire abstraction de ce temps de vie ? Que peut être le vécu de ses enfants ? En effet, la proposition sénatoriale est de calquer la réglementation sur celle régissant le don de gamètes et d'imposer que toute candidate mère porteuse soit déjà mère. Il n'y a aucune cohérence à penser que cela écarterait un quelconque risque. Avoir eu un enfant serait-il un gage de bonne santé gestationnelle ou se rassure-t-on de la crainte occulte que de futures maternités ne soient difficiles à mener pour cette femme ? Comment peut-on organiser et cautionner la perturbation que représenterait pour un enfant de voir sa mère enceinte (aban) donner son bébé, même toutes explications données ? À quel prix et pour quel bénéfice peut-on demander à un enfant de partager la générosité de sa mère ? Dans une tribune du journal *Le Monde*, C. Eliacheff et le professeur R. Frydman l'expriment ainsi (21) : « Ses propres enfants devront intégrer l'idée que l'enfant qu'elle porte n'est pas un frère ou une sœur, qu'il n'a pas été conçu avec leur père... La société peut-elle exposer de la sorte ces enfants au bon vouloir de leur mère ? » La femme elle-même, bien qu'informée, peut-elle anticiper ce que sera sa vie de couple pendant cette grossesse ; et ultérieurement son vécu d'une future grossesse pour elle-même et sa relation à l'enfant d'« après » ?

Peu de choses sont publiées sur ces sujets, laissant cours aux interrogations. Seules quelques expériences limitées dans le nombre, et donc entendues comme anecdotiques et contestables, d'obstétriciens qui ont eu l'occasion de suivre des mères porteuses

pendant leur grossesse et à leur décours, font état des difficultés rapportées par ces femmes dans leur vie de couple ou le projet d'une grossesse ultérieure désirée pour elles-mêmes. Ailleurs, et notamment dans l'expérience anglaise, les séries rassurantes sont limitées et les travaux portent essentiellement sur les familles d'accueil de l'enfant et non sur le suivi à long terme des mères porteuses.

Le risque médical

« Il ne peut être porté atteinte à l'intégrité du corps humain qu'en cas de nécessité médicale pour la personne ou à titre exceptionnel dans l'intérêt thérapeutique d'autrui. » (Article 16-3 du Code civil.) La GPA représente-t-elle une atteinte à l'intégrité du corps de la femme ? Les risques pour la femme porteuse sont bien souvent minimisés dans les débats. Récemment, deux femmes écrivains s'exprimaient dans les médias pour dénoncer des propos alarmistes (22) « La mère porteuse ne se lèse pas elle-même. Porter un enfant ne soustrait pas un organe, ne retranche rien au corps de celle qui le porte ». Sur le plan médical, cependant, la grossesse, bien que souvent de déroulement harmonieux, est encore un événement qui peut tuer ou invalider. Toute grossesse est à risques. Fausses couches, grossesse extra-utérine sont sources de souffrances et de risques hémorragiques ou de stérilité secondaire. Le diagnostic d'anomalie fœtale peut conduire à une interruption médicale de grossesse. Les complications potentielles de la fin de grossesse (diabète, hypertension, menace de prématurité...) sont génératrices d'hospitalisations, et d'empêchement professionnel itératif. Les complications de l'accouchement peuvent être celles d'une césarienne, ou celles d'une mise au monde difficile par voie naturelle. Une hémorragie de la délivrance peut menacer le pronostic vital. Tous ces risques sont majorés en cas de grossesse multiple. L'éventuelle modification de la loi devrait imposer en tout état de cause le transfert d'un embryon unique.

D'autres événements moins graves, mais non anodins, modifient durablement le corps et la vie des femmes, tels que problèmes urinaires, sexuels, veineux, séquelles douloureuses d'épisiotomie, vergetures, prise de poids, ptose des seins, dépression du post-partum.

La grossesse est en tout état de cause un moment de relative privation de liberté, liberté de mouvement, transformations hormonales physiques et psychiques, indispositions diverses liées au développement d'une vie en son corps, elle laisse des traces dans le cours du vieillissement corporel.

La prise de risque d'effets délétères de la grossesse ne peut s'envisager de manière identique dans le cadre d'un projet d'enfant au sein d'un couple, ou dans une

GPA, sans le bénéfice de la maternité. Cependant, tant qu'il s'agit de la prise de risques la concernant, on pourrait considérer qu'une femme bien informée est majeure et autonome pour prendre sa décision en connaissances de cause (et de conséquences). Les limites de ce consentement éclairé résident néanmoins dans le caractère aléatoire et non prédictible de la plupart des complications de la grossesse.

Rapports entre mère porteuse et couple demandeur

L'absence d'anonymat inhérent à la situation implique une forme de « mise sous tutelle » de la femme enceinte, sous le regard inquiet et possessif du couple qui lui a confié son embryon, et scrute ses comportements, ses prises de risques (tabac, alcool, sexualité, activités professionnelles). Pendant la grossesse, il existe un fort contraste entre l'intérêt porté à la santé du fœtus et à celle de la mère, qui n'intéresse que dans ses conséquences sur le bien-être de l'enfant. C'est de ce contraste qu'émerge l'objection morale vis-à-vis de ce qui est qualifié comme une chosification, une réification de la femme, une instrumentalisation de son corps, voire une deshumanisation, puisque l'ensemble des affects qui banalement l'assaillent se doivent d'être étouffés dans l'œuf. Les termes du contrat entre le couple demandeur et la mère porteuse ne sont pas abordés dans les propositions de modification de la loi. Dans certains pays qui pratiquent la GPA, ces termes sont fixés de façon détaillée dans un contrat officiel, les clauses de surveillance augmentant avec la rémunération proposée. La fiction s'est emparée de différentes affaires rendues publiques, ainsi le roman publié par J. Henry-Wahl, *Ne tuez pas la mère porteuse*, qui narre les conditions de la séquestration d'une jeune candidate à porter l'enfant d'une célèbre prédicatrice texane (23).

Moins fictif, l'avenir du couple concepteur peut également être déstabilisé en cas d'accident grave consécutif à la grossesse, gâchant la vie de la femme qui les a aidés à devenir parents.

Les problématiques psychosociales et médicales déterminées par la gestation pour autrui peuvent donc porter atteinte à la santé de la femme, telle que définie dans le préambule à la Constitution de l'OMS en 1948 : « La santé est un état de bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité » (24).

L'intérêt de l'enfant

Que dire de l'intérêt de l'enfant sans projections abusives ? La relation mère-enfant qui s'établit pendant la grossesse, étudiée par de nombreux psychologues

tels que C. Revault d'Allones (25) n'est plus niée par quiconque. Quoiqu'on pense de son importance, il est néanmoins difficile d'envisager que l'on puisse, avant même la conception embryonnaire, programmer la rupture de ce lien. Le temps de la grossesse est celui d'échanges, entretenus par la perception de mouvements de l'enfant *in utero*, l'imagerie échographique, le temps essentiel de la mise au monde. Évoquant le fœtus du troisième millénaire visité par l'échographie, ses images et leur sonorisation comme « matérialisation d'investissements narcissiques et pulsionnels parentaux [...] qui [...] constituent le nid psychique prénatal parental ». S. Missonnier (26) émet l'idée que « c'est le "souffle sacré" qui humanise le fœtus et constitue la trame organisatrice du berceau postnatal à venir ». Projeter la mise à l'écart des aspects affectifs de ces temps forts de la grossesse semble difficilement concevable sans conséquence, ni pour la mère, ni pour l'enfant. R. Frydman, dans *Naissance et liberté*, ouvrage co-écrit avec M. Canto-Sperber, évoque la problématique en ces termes : « Certes, il est bien des cas où la procréation naturelle n'est guère clémente à l'égard des enfants, mais lorsque la technique médicale intervient pour rendre possible la naissance d'un enfant, c'est bien la moindre des choses que d'exiger que l'enfant ne subisse pas un dommage. Sinon, l'un des premiers principes de l'éthique médicale – d'abord ne pas nuire – s'en trouverait violé » (27). Il peut y avoir, par ailleurs, des situations où il est délicat d'anticiper l'avenir de l'enfant, en cas d'anomalie de développement, de diagnostic de malformation, ou de naissance prématurée à risque de handicap résiduel. L'investissement ou le désinvestissement affectif ne peuvent, en tout état de cause, être assurés par un contrat.

Le contexte économique et moral : marchandisation du corps de la femme et de l'enfant ?

Il n'est pas inutile de revenir sur la notion de contrat dont il est question dans l'ensemble des textes. Dans le contrat, est fixée la rémunération – ou le dédommagement – de la mère porteuse. Dans la proposition d'encadrement strict proposé par la commission sénatoriale, encadrement qui impliquerait l'Agence de la biomédecine, à travers l'agrément d'associations à but non lucratif, qui mettraient en contact les différents protagonistes, la notion de contrat a pour but louable d'éviter toute dérive marchande. Il y est évoqué une compensation « raisonnable », afin que la convention porte sur un service rendu et non une vente d'enfant. En Grande-Bretagne, une indemnisation raisonnable est admise (entre 5 000 et 10 000 euros) ; aux États-Unis, la rémunération varie de 10 000 à

75 000 dollars (10). Ailleurs, c'est souvent la grande nébuleuse.

L'argument économique ne peut cependant être l'argument de poids dominant, qui ferait pencher en faveur de la légalisation de la GPA en France, au motif de l'injustice de la charge financière que doivent affronter les couples qui se rendent à l'étranger. Beaucoup s'accordent à songer qu'il est illusoire de penser éviter les dérives marchandes, les préoccupations économiques de femmes sans ressources dominant les cas de réelle générosité, certainement existante, dans les motivations des femmes candidates.

Bibliquement, c'est bien la servante Agar, première mère porteuse, qui a prêté son ventre à sa maîtresse Sarah, et non l'inverse.

Les termes des e-annonces à destination des couples concernés abondent d'ailleurs de termes juridiques – arrangement, investissement... – tels que : « Conceptual Options et le cabinet d'avocat de Theresa M. Erickson ont l'expérience et la réputation d'assister et de superviser avec succès les arrangements de donation d'ovocytes et/ou gestation pour autrui, réduisant les risques pesant sur votre plus précieux investissement ». C'est cette idée que la femme puisse monnayer son utérus, donc son corps et un temps de sa vie, qui suscite l'indignation morale. R. Frydman, (*op. cit.*) pose justement la problématique en ces termes : « Peut-on accepter que la grossesse, qui touche à l'une des relations les plus intimes qui soient (celle d'une mère avec l'enfant qu'elle porte), soit considérée comme un service et rémunérée ? » (27). L'objection morale à l'encontre de la GPA est donc portée par la transaction que représente le fait de céder son utérus, au-delà même de son aspect purement commercial. M. Canto-Sperber écrit qu'il est impossible de contester que le fait de prêter ou louer un utérus pendant neuf mois témoigne d'une réification et d'une instrumentalisation du corps humain, quelles que soient les raisons qui justifient, du côté des parents commanditaires, d'avoir recours à une mère porteuse (27). Une rémunération ou un dédommagement peuvent-ils contribuer à redonner une dignité en valorisant la générosité de l'acte ? Tous les avis récemment émis écartent la notion de rémunération, qui signe le profit commercial, en mettant en avant les risques de dérives déjà évoqués. La rémunération est moralement inacceptable, puisqu'elle validerait pour la femme le côté commercial de la cession de son corps et d'un temps de vie, et donnerait à l'enfant à naître un statut de marchandise. Le dédommagement serait plus à même de résoudre le problème moral, en valorisant la notion de service non rémunéré, mais sa définition est fort théorique, sa concrétisation, par l'évaluation d'une prise en charge d'un temps de vie, très aléatoire. Afin de s'affranchir des problèmes moraux soulevés

par l'argument économique, pourrait-on envisager la tolérance d'un don gratuit uniquement porté par la volonté consentante et informée d'une femme ? La réponse à cette question fait émerger d'autres interrogations sur les limites de la liberté individuelle de disposer de son corps. La loi française pose des limites à cette liberté, mais cette situation se rapprocherait de celle du don d'organes, lequel vise à pallier la pathologie d'un autre individu. La stérilité utérine d'une autre femme peut-elle néanmoins être considérée comme telle, quelle que soit la dimension de souffrance de sa situation ? La boucle se referme, puisque nous avons évoqué plus haut le retentissement sur la vie d'autres individus (groupe familial, enfants précédents, enfant à naître...), de la libre expression de la liberté individuelle de la mère porteuse, ainsi que le caractère incertain du consentement éclairé dans une situation de vie évolutive telle que la grossesse, à risques aléatoires. Les limites à l'expression de la liberté individuelle devraient plus reposer sur le poids de l'ensemble de ces éléments que sur une interdiction brute basée sur des valeurs purement morales.

Conclusion

L'impossibilité d'accéder à la maternité par l'accomplissement d'une grossesse souhaitée est indéniablement une grande souffrance. Le bonheur d'être mère ne peut cependant se résumer à la transmission de ses gènes quand l'utérus manque au rendez-vous. La maternité est un événement de vie trop intime et trop important dans le lien généalogique pour penser une quelconque transaction au nom de l'enjeu de l'enfant biologique. Il ne semble pas acceptable d'envisager de substituer la souffrance d'une femme par la mise en danger d'une autre. Il existe certainement un petit nombre de femmes d'autonomie de décision certaine, informées et compétentes, pour faire le choix de porter par générosité l'enfant d'une autre, pour lesquelles une interdiction de principe absolue peut à l'heure actuelle paraître absurde, mais le problème de savoir qui et comment va pouvoir en décider sans atteinte au principe de justice, d'égalité, de respect de l'enfant, reste entier. Pour la majorité des cas, la réglementation, même encadrée, ne pourra évacuer, ni l'atteinte à la dignité de la femme, ni le bouleversement de la vie de ses proches, de l'enfant, ni la problématique socio-économique qui émerge, avec ses dérives commerciales, presque partout où cette pratique est autorisée. L'adoption, parcours pourtant si complexe et difficile, semble bien rester une alternative de projet parental à moindre risque pour tous, ni de confusion généalogique pour l'enfant, ni de sujétion pour la mère porteuse.

Références

1. Comité d'éthique du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (22 juin 2009), la gestation pour autrui
2. Geller S (1990) Mères porteuses, oui ou non ? Frison-Roche
3. Loi n° 94-654 du 29 juillet 1994, relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal (JO, 30 juillet 1994)
4. Loi n° 2004-800 du 6 août 2004, relative à la bioéthique (JO du 7 août 2004)
5. Camborieux L (2008) Mères porteuses ou gestation pour autrui : de quoi parlons-nous ? La Revue du Praticien 119 : 20-21
6. Human fertilization and embryology act, amendment of surrogacy arrangements. Act 1985, 1990, (2008)
7. Contribution à la réflexion sur la maternité pour autrui, rapport d'information sous la direction de Michèle André, fait au nom de la Commission des lois et de la Commission des affaires sociales du Sénat, n° 421 (25 juin 2008)
8. Epelboin S (2008) Gestation pour autrui, attention, danger, rubrique "opinions". La Recherche, 112, n° 423
9. Agacinski S (2009) Corps en miettes, Paris, Flammarion
10. De Montgolfier S, Mirkovic A (2009), Maternité pour autrui : du désir d'enfant à l'enfant à tout prix. Médecine Sciences : 25: 419-22
11. Rapport de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques sur l'évaluation de l'application de la loi du 6 août 2004 relative à la bioéthique (20 novembre 2008)
12. Avis de l'Académie de médecine concernant la gestation pour autrui (11 mars 2009)
13. Epelboin S (2008) L'accueil d'embryons : aspects cliniques et mise en perspective anthropologique. Médecine de la Reproduction Gynécologie Endocrinologie 10-1. Montrouge, John Libbey
14. Delaisi de Parceval G (2007) La gestation pour autrui, un bricolage des représentations de la paternité et de la maternité euro-américaines, L'Homme, 183
15. Héritier F (1996) Masculin/féminin la pensée de la différence. Paris, Odile Jacob
16. Lallemand S (1993) La circulation des enfants en milieu traditionnel : prêt, don, échange. Paris, L'Harmattan
17. Godelier M (2004) Métamorphoses de la parenté, Paris, Fayard
18. Panoff M (1976) Patrilineal as ideology and practice in a matrilineal society. Ethnology vol 15, n° 2
19. Loux F, Richard P (1978) Sagesse du corps; la santé et les maladies dans les proverbes français. Paris, Maisonneuve et Larose
20. Iacub M (2004) L'empire du ventre. Pour une autre histoire de la maternité, Paris, Fayard, collection Histoire de la pensée, 359 p
21. Eliacheff C, Frydman R (juin 2008) Le Monde
22. Fleutiaux P, Garat AM (9 juin 2009) Libération
23. Henry-Wahl J (2008) Ne tuez pas la mère porteuse. Gutenberg
24. Préambule à la constitution de l'OMS, tel qu'adopté par la Conférence internationale sur la santé, New York, 19-22 juin 1946; signé le 22 juillet 1946 par les représentants de 61 États (Actes officiels de l'OMS, n° 2, p. 100), entré en vigueur le 7 avril 1948 (source : Luc Roegiers, Université catholique de Louvain, 2009)
25. Revault d'Allones C (1994) Être, faire, avoir un enfant. Paris, Payot
26. Missonnier S (2008) Le fœtus savant et la famille du III^e millénaire. In Familles bousculées, inventées, magnifiées, colloque GYPSY VII, Paris, Odile Jacob
27. Canto-Sperber M, Frydman R (2009) Naissance et liberté. La procréation. Quelles limites ? Paris, Plon, 267p

Annexe I – Commission du Sénat, sous la direction de M. André, (rapport du 25 juin 2008).

Le rapport préconise que la GPA pourrait être autorisée dans les conditions suivantes :

- la femme devra être dans l'impossibilité de mener une grossesse sans danger pour sa santé ou celle de l'enfant à naître ;
- les parents intentionnels (homme et femme en âge de procréer) devront être domiciliés en France, et mariés ou en mesure de justifier d'une vie commune d'au moins deux ans ;
- au moins un des deux membres du couple devra être le parent génétique de l'enfant ;
- la mère porteuse ne pourra être la mère génétique de l'enfant, et elle devra avoir eu au moins un enfant précédemment ;
- également domiciliée en France, elle ne pourra mener plus de deux GPA, et ne pourra porter un enfant pour le compte de sa fille ;
- la mère porteuse ne pourra bénéficier d'aucune rémunération, mais un dédommagement raisonnable sera prévu (pour les frais non couverts par la sécurité sociale, à la charge du couple demandeur, et dont le montant sera fixé par décision judiciaire) ;
- l'Agence de la biomédecine s'assurera de l'agrément du couple demandeur, de la mère porteuse et des praticiens et de l'autorisation du centre d'AMP effectuant l'acte ;
- le transfert embryonnaire sera subordonné à une décision judiciaire en fonction de tous les éléments et autorisations recueillis.

Annexe 2 – L’avis de l’Académie de Médecine (mars 2009).

Les arguments en faveur de la pratique de la GPA :

- la réalité des indications médicales ;
- la notion d’injustice des femmes souffrant de cette infertilité ;
- l’absence d’alternative thérapeutique ;
- les difficultés d’adopter ;
- le recours à cette pratique à l’étranger induisant une inégalité entre les couples ;
- la situation juridique des enfants nés par GPA à leur retour en France et les résultats satisfaisants observés dans les pays qui l’autorise ;

Les arguments en défaveur de l’autorisation de la GPA :

- l’interdiction de la commercialisation du corps humain ;

- l’éventuel asservissement de la femme gestante
- l’ébranlement de la valeur symbolique de la maternité
- les risque physiques et psychologiques pour la femme gestante, son couple et la fratrie, pour l’enfant et pour le couple d’accueil.

Les risques de dérives des indications et de dérives financières

Conclusion du rapport

Avis négatif

Recommandation : dans le cas où le législateur serait conduit à autoriser la GPA, celle-ci devrait être assortie d’une démarche d’évaluation des risques rigoureuse, objective, contradictoire et strictement encadrée.

Annexe 3 – Avis du Conseil d'État.

Contre l'autorisation de la gestation pour autrui pour des raisons éthiques, médicales et juridiques

Arguments développés

- Les conséquences médicales pour la mère porteuse
- Le risque d'exploitation de celle-ci

– La violation du principe d'indisponibilité du corps humain

Proposition de solutions pour améliorer la situation juridique et administrative des enfants nés dans le cadre d'une GPA réalisée à l'étranger : délégation-partage de l'autorité parentale pour la mère biologique.

Annexe 4 – Le Comité national d'éthique. Avis n °110, avril 2010.

Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé

I. Des arguments plaident en faveur d'une autorisation de la GPA :

- La solidarité
- La discrimination actuelle en fonction de la situation
- La limitation des pratiques clandestines en donnant à des couples un cadre autorisé La reconnaissance de l'opposition du principe de respect de la dignité de la personne humaine à celui de la liberté individuelle.

II. Objections éthiques à une légalisation de la gestation pour autrui

- II.1. Une loi n'empêchera pas les risques qu'elle vise à prévenir.
- II.2. La GPA ne peut être éthiquement acceptable du seul fait qu'elle s'inscrirait dans un cadre médical.

II.3. La mise en œuvre d'éventuelles règles juridiques relatives à la GPA pose des problèmes difficilement solubles au regard de la préservation de l'intérêt des personnes.

II.4. La GPA pourrait porter atteinte au principe de dignité de la personne humaine ou à l'image symbolique des femmes.

II.5. Des incertitudes pèsent sur l'avenir de l'enfant issu de la GPA.

II.6. La revendication de la législation de la GPA procède d'une conception contestable de l'égalité devant la loi.

Conclusion

(...) pour la grande majorité des membres du CCNE, l'ensemble des arguments favorables au maintien de la législation en vigueur l'emportent sur ceux qui sont favorables à la légalisation de ce procédé de PMA, même de manière strictement limitée et contrôlée.

Postface

La reproduction, un thème *princeps*

Les connaissances et les interrogations relatives à la reproduction occupent une place singulière et primordiale dans le champ du savoir. Dès 1907, Freud soulignait que la question « *d'où viennent les enfants ?* » se trouve inscrite au cœur de notre rapport à la pensée et de notre relation à l'existence. Elle constitue le premier grand problème auquel le petit humain est confronté dès son plus jeune âge. La façon suivant laquelle il investira cette question pourra avoir une influence considérable sur la relation qu'il entretiendra ultérieurement avec l'activité intellectuelle. Les investigations infantiles, menées de façon solitaire, imprimeront une marque durable sur notre curiosité envers les choses défendues, sur notre rapport au secret, sur la possibilité d'avoir confiance en la parole d'autrui, sur notre goût pour la recherche, sur l'emprise que nous tenterons d'avoir sur le monde par le raisonnement et l'imagination (1).

De fait, le thème de la reproduction a suscité partout et toujours une effervescence intellectuelle considérable. La documentation ethnographique témoigne de l'extraordinaire foisonnement de représentations qui entourent l'engendrement. Dans les sociétés traditionnelles, mythes et récits légendaires mettent en perspective de façon vertigineuse les grandes énigmes de la reproduction, de la différence des sexes de la fertilité et de la stérilité. Un exemple privilégié nous permettra d'illustrer l'extraordinaire inventivité dont a su faire preuve l'esprit humain en la matière : nous nous appuyons ici sur les belles et minutieuses observations réalisées par l'anthropologue Bernard Saladin d'Anglure auprès des Inuits du Nunavut canadien (2).

La plupart des groupes Inuits croient en la réincarnation. Ils pensent que lorsqu'un individu meurt, son esprit se réincarne dans un enfant qui naîtra prochainement au sein de la lignée familiale. Généralement, il est donné à cet enfant le nom de son ancêtre, et on considère qu'il y a une identité entre l'esprit de l'enfant et l'âme-nom (*atiq*) du défunt. Dans ces conditions, il se pose un problème délicat lorsque le sexe de l'enfant n'est pas le même que celui de l'ancêtre. Ce type de situation donne lieu à des élaborations fantasmatiques fascinantes. En effet, de nombreux Inuits « prétendent quasiment dans les mêmes termes garder le souvenir de leur vie intra-utérine et la décrivent avec un grand luxe de détails depuis leur conception jusqu'à leur accouchement » (3). Ainsi, une femme nommée Iqallijuq se disait la réincarnation de son grand-père maternel. Lorsqu'on lui demandait pourquoi elle était une femme alors qu'elle était censée être la réincarnation d'un homme, Iqallijuq racontait des souvenirs de l'existence qu'elle aurait menée dans l'utérus de sa mère. Voici l'histoire, telle que racontée par cette informatrice : un jour que sa mère s'était accroupie pour uriner, l'esprit de son grand-père récemment décédé (le sien donc) en profita pour s'introduire dans l'utérus de sa mère. Cet utérus était comme l'intérieur d'un petit iglou de neige¹. Chaque jour, un chien introduisait sa tête dans l'ouverture de l'utérus-iglou et y régurgitait de la nourriture pour alimenter le fœtus². Deux plates-formes bordaient l'intérieur de cet utérus-iglou : sur celle de gauche, se trouvaient disposées les armes réservées aux hommes (un harpon et un couteau de chasse) ; sur celle de droite, les instruments typiquement féminins (un couteau semi-lunaire et une lampe à huile). Lorsque l'iglou se mit à fondre et devint trop petit, Iqallijuq décida de sortir. Jusque-là, le fœtus était de sexe masculin, mais sa transformation s'opéra précisément à ce moment-là. D'abord, Iqallijuq se saisit des outils masculins. Cependant, il se souvint des innombrables dangers qu'il avait dû affronter au cours de sa vie antérieur de chasseur. Il se ravisa donc et décida de revivre dans un corps de femme. Reposant les outils masculins, il prit les ustensiles féminins. Son pénis se rétracta, son périnée se fendit et il naquit fille.

1. Le terme désignant l'utérus est *igliaq*. Les Inuit utilisent constamment la métaphore de l'utérus-iglou. La coutume veut qu'au réveil une femme enceinte sorte rapidement de l'iglou : ainsi le fœtus sortira plus vite au moment de l'accouchement.

2. Lors des déplacements hivernaux, les Inuits nourrissent les chiens chaque soir en leur laissant passer la tête, un par un, dans l'entrée de l'iglou.

Ce type de récit, très répandu chez les Inuits, constitue d'une sorte d'anticipation des possibilités en matière de choix du sexe qu'offre aujourd'hui une technique comme le diagnostic préimplantatoire. De fait, dans les sociétés occidentales modernes, sous l'impulsion de l'innovation biomédicale, la réalité a rejoint ce qui n'était jusqu'alors que de l'ordre de l'imaginaire. Le dernier demi-siècle fut celui d'une véritable révolution des conditions de la procréation (4). L'apparition des moyens contraceptifs modernes, la légalisation de l'avortement, la diffusion de l'analgésie péridurale, le développement de l'échographie, la mise au point de la fécondation *in vitro*, les dons de gamètes et les transferts d'embryons participent d'un mouvement qui a modifié très profondément les mœurs : dissociation entre sexualité et reproduction, modification des rapports femmes/hommes, reconfiguration des formes de la famille, etc. Surtout, l'AMP a provoqué l'émergence d'une situation totalement inédite : l'acte sexuel entre une femme et un homme n'est plus l'unique moyen de concevoir un être humain. Après être resté immuable durant des millénaires, ce que les parents font ensemble pour avoir un enfant s'est soudain modifié : « Il faut prendre acte de la nouvelle réalité introduite par la découverte de la fécondation *in vitro*. Dans toute l'histoire de l'humanité, fécondations et gestations n'ont jamais été séparées ni spatialement ni temporellement dans la réalité, seulement dans la fiction, artistique ou pathologique » (5). Tout ceci ne peut pas rester sans conséquence sur nos structures sociales et sur nos élaborations psychiques. Le nouvel entour technoscientifique de l'engendrement est voué à exercer une emprise croissante sur les rapports sociaux et sur les représentations que nous nous formons de nous-mêmes. L'AMP révolutionne non seulement l'organisation familiale mais aussi nos façons d'envisager l'existence. Des mutations simultanément scientifiques et sociales nous entraînent dans un univers reproductif insolite. Sous l'effet de la procréatique, notre vision du monde est en train de se modifier. Ce que nous considérons spontanément comme des limites naturelles se trouve remis en cause. Il s'agit d'une lame de fond qui concerne toutes les femmes et tous les hommes, car la procréation médicalement assistée bénéficie d'un retentissement considérable et fait vaciller nos certitudes.

Ces nouveautés suscitent beaucoup d'inquiétudes et de discours alarmistes. Le rapport à la médecine et à la science est devenu tellement ambivalent que rares sont ceux qui osent encore ancrer leur réflexion dans la notion de progrès. Certains auteurs vont même jusqu'à brandir la menace d'un nouvel eugénisme qualifié de « libéral » (6). Inévitablement, la réflexion sur les avancées dans les sciences de la vie se heurte à ce thème : « Le spectre de l'eugénisme reste suspendu au-dessus de la génétique tout entière » (7). Cependant, la peur n'arrête pas les recherches et les innovations sont inévitables. Seule comptera, en définitive, notre façon de nous y adapter, de savoir les accueillir, de parvenir à les encadrer de la façon la plus heureuse possible. Dans ces conditions, il est fondamental d'informer sur l'état réel des connaissances et des techniques, de faire le point des expériences déjà réalisées, de favoriser la compréhension des recherches en cours, d'anticiper les percées futures et d'en mesurer les enjeux. C'est ce que le présent ouvrage parvient à faire avec beaucoup de bonheur.

Sans négliger les difficultés, tout en prenant bien la mesure des enjeux sociaux, éthiques et psychiques qui entourent les innovations scientifiques et techniques, il est crucial de nous réconcilier avec les accomplissements réalisés et les promesses à venir. L'AMP a constitué une aventure extraordinaire qui a soulagé de nombreuses souffrances et apporté vie et bonheur à de multiples personnes. La vie humaine n'apparaît plus exactement aujourd'hui comme elle naissait hier. Ce mouvement est l'existence même, quoique des esprits chagrins s'en désolent. Nous n'en sommes sans doute qu'au tout début d'un processus qui va produire des réalités de plus en plus extraordinaires : la fabrication de néogamètes à partir de cellules souches, la transplantation d'utérus, le clonage ou l'ectogenèse, constituent un horizon saisissant. Que ces bouleversements soient pour demain ou pour après-demain n'y change rien : d'ores et déjà, ils mobilisent nos facultés d'adaptation et sollicitent notre réflexion. Face à cela, il convient certes d'être prudent. Mais il faut aussi rester audacieux et aborder l'avenir de façon constructive.

À l'heure actuelle, la législation française est restrictive. Elle ne l'est pas totalement bien entendu, il existe des pays où elle l'est plus encore. Mais, en France, la puissance publique a été très interventionniste. Au nom de grands principes éthiques, la loi a multiplié les interdictions. Ceci a pour conséquence qu'aujourd'hui le cadre général est celui de la prohibition. À cet égard, le fait que René Frydman puisse déclarer qu'il ne pourrait plus réaliser les prouesses du passé, en raison d'un « corset de réglementation actuelle qui de fait interdit toute modification et toute innovation, donc toute amélioration » (8), devrait grandement nous inquiéter. Le sociologue est nécessairement préoccupé par l'écart considérable qui s'est creusé entre la législation et les pratiques, fossé dont les mouvements reproductifs transfrontaliers constituent le signe le plus manifeste (9, 10). Les normes morales et juridiques qui encadrent l'AMP sont décalées par rapport aux aspirations et aux expériences effectives de franges importantes de la population. Cette distance entre la réglementation et les conduites est socialement dangereuse, car une telle situation affaiblit la portée de la loi en induisant et banalisant la désobéissance. Il convient d'aller vers un assouplissement. De

nouveaux enfants arrivent. Sans doute naîtront-ils autrement. Quels que soient nos sentiments concernant les modalités de leur venue au monde, il faudra les accueillir dans une atmosphère de confiance. Quoi qu'il en soit, vive la reproduction... et longue vie à ce magnifique ouvrage qui tente avec beaucoup de science et de passion d'en éclairer les multiples facettes.

Bertrand Pulman

Professeur de Sociologie à l'UFR Santé, Médecine, Biologie Humaine de l'Université Paris 13

Membre de l'IRIS Institut de recherche interdisciplinaire sur les enjeux sociaux

UMR 8156 CNRS – 997 Inserm – EHESS – UP13

Références

1. Freud S (1969) Les théories sexuelles infantiles (trad. fr.). In : La vie sexuelle. Paris, Presses Universitaires de France : 14-27
2. Saladin d'Anglure B (2006) Être et renaître inuit, homme, femme ou chamane. Paris, Gallimard
3. Lévi-Strauss C (2006) Préface. In : Être et renaître inuit, homme, femme ou chamane. Paris, Gallimard : 11
4. Pulman B (2010) Mille et une façons de faire les enfants. La révolution des méthodes de procréation. Paris, Calmann-Lévy
5. Mejia Quijano C, Germond M, Ansermet F (2006) Parentalité stérile et procréation médicalement assistée. Le dégel du devenir. Ramonville-Saint-Agne, Érès : 210
6. Habermas J (2002) L'Avenir de la nature humaine. Vers un eugénisme libéral ? Paris, Gallimard
7. Fukuyama F (2002) La Fin de l'homme. Les conséquences de la révolution biotechnique. Paris, La Table ronde : 133
8. Frydman R La vitrification d'ovocytes devrait conduire à assouplir la loi bioéthique. Le Monde, 20 mai 2010.
9. Inhorn M, Patrizio P (2009) Rethinking reproductive "tourism" as reproductive "exile". Fertil Steril 92: 904-6
10. Shenfield F, Pennings G, Ferraretti AP *et al.* (2010) Cross border reproductive care in six European countries. Hum Reprod 25: 1361-8