

# Fécondation in vitro et injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI)

H Dechaud  
E Grenaud  
N Aligier  
B Hedon

**Résumé.** – Depuis ses débuts timides dans un cercle restreint dans les années 1970, la fécondation in vitro a connu de réels progrès permettant, à ce jour, la naissance de près de 400 000 enfants dans le monde. Si ses principes de base n'ont pas fondamentalement changé, l'avènement de nouvelles classes médicamenteuses comme les produits recombinants représente les progrès les plus marquants de ces dernières années avec le développement de la technique d'injection intracytoplasmique du spermatozoïde.

Les prochains défis pour la médecine de la reproduction seront la maîtrise de l'implantation embryonnaire et la maturation in vitro des ovocytes. Les relever passe par l'acquisition et la maîtrise des connaissances fondamentales sur l'embryon, l'endomètre et l'ovocyte. Seules la complémentarité et la transversalité entre les connaissances des différents intervenants de la médecine de la reproduction permettront de relever ces futurs défis. Ces progrès permettront d'offrir de meilleures chances de grossesses tout en réduisant les risques de la fécondation in vitro, en particulier celui des grossesses multiples. Dans le respect de la loi et de l'éthique, n'oublions jamais que le seul résultat pour les couples infertiles traités par fécondation in vitro est la naissance d'un enfant en bonne santé.

© 2003 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** infertilité, stimulation de l'ovulation, injection intracytoplasmique du spermatozoïde, ponction folliculaire, fécondation in vitro, transfert d'embryons, congélation embryonnaire.

## Introduction

La fécondation in vitro réalise en dehors de l'organisme ce qui se fait normalement dans la trompe de la femme : captation de l'ovocyte mature par le pavillon tubaire, transport des spermatozoïdes jusqu'à l'endroit où doit avoir lieu la fécondation, en général l'ampoule tubaire (achèvement de leur capacitation), fécondation, transport de l'œuf jusqu'à la cavité utérine où doit avoir lieu son implantation, tout en assurant les conditions nécessaires aux premières segmentations embryonnaires.

Il est donc normal que la première application thérapeutique de la fécondation in vitro soit de pallier une insuffisance fonctionnelle des trompes de Fallope. D'ailleurs, la fécondation in vitro a été la première démonstration qu'il était possible d'avoir une grossesse même en l'absence de trompes. Plus récemment, l'évolution des techniques a permis à la fécondation in vitro de prendre en charge les infertilités masculines les plus sévères par le biais de l'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI).

## Indications de la fécondation in vitro

### INFERTILITÉ TUBAIRE

La fécondation in vitro court-circuite l'obstacle tubaire. Que les trompes soient absentes, obstruées, ou simplement insuffisantes sur le plan fonctionnel, la technique est la même. Les autres possibilités

thérapeutiques sont représentées par la chirurgie tubaire, qu'il s'agisse de chirurgie endoscopique pour tout ce qui est adhérences et lésions tubaires distales, ou qu'il s'agisse de microchirurgie lorsqu'une anastomose tubaire est nécessaire. Le choix entre ces diverses méthodes thérapeutiques est essentiellement fonction des résultats espérés. Si la réparation des lésions tubaires laisse espérer un résultat satisfaisant, il faut commencer par la chirurgie tubaire et réserver la fécondation in vitro comme deuxième atout thérapeutique. En revanche, si les trompes ont dû être enlevées (pour infection tubaire, grossesse extra-utérine...), ou si l'importance des lésions (plurifocalité) ou leur nature (tuberculose) exclut qu'un résultat fonctionnel satisfaisant puisse être obtenu par la chirurgie, la fécondation in vitro devient le seul choix possible.

D'autres éléments doivent aussi être pris en considération dans le choix thérapeutique. Il faut surtout se garder d'aucun dogme, et savoir offrir les différentes possibilités techniques aux patientes de façon que leurs chances globales de succès soient le résultat de toutes les possibilités thérapeutiques et non d'une seule technique.

Pour ce qui est des demandes de stérilisation (désir d'enfant après avoir eu une stérilisation tubaire), le choix préférentiel, tant pour des raisons techniques que psychologiques et souvent sociales, est celui de la microchirurgie.

### INFERTILITÉ MASCULINE

La fécondation in vitro est adaptée au traitement de certaines stérilités masculines puisque le nombre de spermatozoïdes nécessaire pour obtenir une fécondation est moindre qu'in vivo, et que le travail de sélection et de préparation des spermatozoïdes réalisé par les biologistes est susceptible d'augmenter les chances que le sperme puisse être fécondant. Cependant, ceci est limité par le fait que le nombre réduit de spermatozoïdes n'est en général pas la seule anomalie que présente le sperme. Cette diminution du

Éric Grenaud : Assistant hospitalo-universitaire, laboratoire de biologie de la reproduction.

Hervé Dechaud : Maître de conférences des Universités, praticien hospitalier.

Nathalie Aligier : Chef de clinique-assistant.

Bernard Hedon : Professeur des Universités, praticien hospitalier.

Service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction.

Centre hospitalier universitaire Arnaud De Villeneuve, faculté de médecine Montpellier - Nîmes, université Montpellier I, 371, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France.

nombre de spermatozoïdes n'est souvent qu'un signe supplémentaire de l'anomalie de la spermatogenèse, qui s'accompagne souvent aussi d'une diminution, voire d'une absence de fécondance des spermatozoïdes.

Aucun test ne permet de prévoir de façon certaine la fécondance d'un sperme. Cependant, pour de simples raisons techniques, un minimum de nombre et de mobilité des spermatozoïdes est nécessaire. Les biologistes apprécient la faisabilité d'une tentative en faisant un test de préparation du sperme, ce qui leur permet de juger du nombre de spermatozoïdes dont ils pourront disposer lors de la tentative. En cas de sperme jugé insuffisant, ce sont les biologistes qui décident du recours à la fécondation assistée, c'est-à-dire à l'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI).

### INFERTILITÉ INEXPLIQUÉE OU IDIOPATHIQUE

La fécondation in vitro est une des seules techniques, avec l'insémination intra-utérine, qui donne des résultats supérieurs aux chances de grossesse spontanée en cas de stérilité inexplicquée. Les taux de réussite de la fécondation in vitro dans les cas de stérilité inexplicquée démontrent que la fertilité inexplicablement réduite de ces couples peut être ramenée à un niveau comparable à celui des couples dont la stérilité est de cause connue, en particulier tubaire. Il est possible que la stimulation de l'ovulation joue un rôle de promotion de la fertilité en multipliant lors d'un cycle donné le nombre des ovocytes qui peuvent donner lieu à une fécondation. Plus vraisemblablement, c'est l'ensemble du processus qui crée des conditions optimales pour une fécondation et qui court-circuite peut-être l'obstacle fonctionnel là où il se trouve, bien qu'il demeure inconnu.

Cependant, cette utilité thérapeutique de la fécondation in vitro dans les stérilités inexplicquées ne doit pas faire perdre de vue qu'elle ne doit être envisagée que s'il s'agit vraiment d'une stérilité (absence de grossesse malgré un temps suffisamment long d'exposition à la grossesse, au moins 2 ans) inexplicquée (bilan diagnostique correctement réalisé, y compris coelioscopie et hystérocopie).

### INFERTILITÉ AVEC ENDOMÉTRIOSE

L'endométrie est peut-être la cause de certaines stérilités, mais le plus souvent son caractère minime ou modéré est insuffisant pour expliquer la stérilité. En pratique, soit l'endométrie s'accompagne de lésions mécaniques sévères inaccessibles à la chirurgie endoscopique, et l'indication du recours à la fécondation in vitro rejoint celui des stérilités tubaires, soit l'endométrie est mineure, et sa présence ne modifie pas les choix thérapeutiques qui seraient portés si la stérilité était totalement inexplicquée. Entre ces deux extrêmes, l'endométrie doit d'abord être traitée, médicalement ou chirurgicalement, voire par association des deux, avant d'avoir recours à la fécondation in vitro. Cela est particulièrement important s'il y a des endométriomes. En effet, ils peuvent augmenter de volume sous l'effet de la stimulation, gêner l'examen échographique des ovaires lors du monitoring, perturber la ponction par aspiration de leur contenu épais et diminuer le nombre d'ovocytes recueillis. Il faut cependant éviter les kystectomies itératives qui appauvrissent considérablement le potentiel ovarien. Lorsque la patiente a déjà été opérée, il faut se contenter de la simple ponction-aspiration, sous antibioprophylaxie, du contenu kystique avant stimulation, ou d'un traitement bloquant prolongé par agonistes de la *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH), ou encore il faut accepter de faire une tentative même si certains kystes demeurent échographiquement visibles [19].

### AUTRES INDICATIONS

La fécondation in vitro peut s'appliquer à toutes sortes de stérilités. Ainsi, un certain nombre de stérilités dites cervicales, ou immunologiques (présence d'anticorps antispermatozoïdes) ont pu bénéficier de la fécondation in vitro. Elle est aussi le préambule indispensable à la réalisation d'un diagnostic préimplantatoire.

### NON-INDICATIONS À LA FÉCONDATION IN VITRO

– Les stérilités utérines : si le défaut d'implantation embryonnaire est la cause de la stérilité, le fait d'apporter les embryons par voie transcervicale plutôt que de les laisser arriver par l'orifice tubaire ne modifie pas les données et n'augmente pas les chances de grossesse autrement que par l'effet du nombre des embryons qui sont transférés lors d'un cycle donné.

– Les stérilités par anomalie de l'ovulation : pour les corriger, il faut faire ovuler correctement la patiente grâce à une induction de l'ovulation. Or, pour réussir une fécondation in vitro, cette condition doit aussi impérativement être remplie.

### Bilan avant fécondation in vitro

Ce bilan a pour but de vérifier que la pratique d'une fécondation in vitro est justifiée et qu'il n'y a pas d'autre possibilité thérapeutique qu'il serait logique de faire intervenir auparavant ; de s'assurer qu'il n'y a pas d'obstacle technique contre-indiquant la pratique d'une fécondation in vitro et de contrôler un certain nombre de paramètres qu'il convient de faire intervenir afin de choisir la technique la plus adaptée et de faire les adaptations nécessaires au cas individuel de la patiente.

### ÉTUDE DE LA CAVITÉ UTÉRINE

Une anomalie trop importante de la cavité utérine serait une contre-indication à toute fécondation in vitro, surtout si cette anomalie peut à elle seule expliquer l'infertilité conjugale. En pratique, si l'infertilité est en rapport avec une cause masculine, la vérification échographique ou hystérogaphique ou hystérosonographique de la normalité de la cavité utérine est suffisante. En revanche, en cas d'infertilité tubaire, où l'infection s'est propagée vers les trompes via l'endomètre, ou en cas d'infertilité inexplicquée, la fréquence avec laquelle un aspect inflammatoire de l'endomètre est diagnostiqué à l'hystérocopie justifie que cet examen soit réalisé [20].

### ÉTUDE DES TROMPES DE FALLOPE

En général, l'état tubaire est connu car ce paramètre fait partie de ce qui doit être étudié lors du bilan de base de l'infertilité. L'exploration tubaire repose sur l'interrogatoire qui permet d'évaluer les risques d'une atteinte tubaire (maladies sexuellement transmissibles, antécédents chirurgicaux, algies pelviennes évocatrices), la sérologie *Chlamydia*, l'échographie pelvienne pour dépister les images d'hydrosalpinx et l'hystérosalpingographie qui est le moyen principal du dépistage des éventuelles anomalies tubaires. La coelioscopie est nécessaire dans tous les cas où l'hystérosalpingographie ne permet pas de conclure à la normalité des trompes.

### BILAN ENDOCRINIEN

Naturellement, la présence ou non d'une ovulation, et sa qualité, sont des paramètres déjà connus. Il est cependant nécessaire d'aller plus loin, car la pratique d'une fécondation in vitro nécessite une stimulation de l'ovulation. L'intensité de la réponse ovarienne à une injection d'une dose quotidienne de gonadotrophines est très variable d'une patiente à une autre. Les paramètres qui interviennent sont l'âge de la patiente, l'index de masse corporelle, le bilan endocrinien et l'échographie des ovaires. Les éléments en faveur d'une importante sensibilité ovarienne sont l'hyperandrogénie biologique (qu'elle porte sur la testostérone elle-même, ou, plus souvent, sur la delta-4-androstènedione, ou même le sulfate de dihydroandrostènedione [DHA]), la *luteinizing hormone* (LH) élevée (de façon tonique, sans élévation concomitante de la *follicle stimulating hormone* [FSH]), l'aspect ovarien comportant de multiples follicules en surface, à des degrés divers d'évolution. Cet aspect a d'autant plus de signification lorsqu'il s'associe à un stroma dense

caractérisant ce qu'il est convenu d'appeler « les ovaires micropolykystiques ». Les éléments en faveur d'une moindre sensibilité ovarienne sont réunis sous ce qui est appelé « la réserve ovarienne », concept issu de la diminution progressive du nombre de cellules germinales ovariennes qui a lieu jusqu'à épuisement complet du stock à l'âge de la ménopause. Ce phénomène accompagne la baisse de la fertilité liée à l'âge ainsi que l'augmentation de FSH qui témoigne de la plus grande résistance des ovaires au stimulus par les gonadotrophines ainsi que d'une plus grande difficulté pour produire des ovocytes convenablement maturés. Il existe plusieurs tests pour évaluer la réserve ovarienne afin d'apprécier les chances d'obtenir une grossesse et d'adapter la prescription de gonadotrophines aux besoins de la patiente :

- les taux de base de FSH, d'œstradiol et d'inhibine B au 3<sup>e</sup> jour du cycle. En particulier, le taux de FSH est bien corrélé avec la capacité de réponse ovarienne et peut être utilisé comme test de dépistage, à condition qu'il date de moins de 1 an. L'aspect échographique d'un ovaire petit et sans follicule peut lui aussi faire évoquer une insuffisance ovarienne ;
- les tests dynamiques qui utilisent le citrate de clomifène, la FSH exogène ou la GnRH ont pour but de mettre en évidence une sécrétion augmentée de FSH ou une sécrétion insuffisante d'œstradiol après stimulation. Ils ne sont utilisés que dans certains cas d'anomalie de l'ovulation, d'infécondité inexplicée, ou si la femme a plus de 35 ans.

#### BILAN MASCULIN

Le sperme va devoir subir une préparation biologique dont la technique doit être adaptée en fonction des qualités du sperme. C'est pourquoi il est important que le spermogramme et une tentative de préparation « à blanc » soient réalisés de façon récente. Cet examen peut aussi être l'occasion de faire une spermoculture à chaque fois qu'il peut y avoir un doute sur la présence éventuelle de germes pathogènes.

#### TEST DE TRANSFERT

Il consiste à mesurer la profondeur de la cavité utérine à l'aide du même type de cathéter que celui qui sera utilisé pour le transfert lui-même. Outre cette mesure, le test a pour intérêt de vérifier qu'il n'y a pas d'obstacle au passage du cathéter dans le col (ce qui rendrait le transfert impossible) et de diminuer le niveau de stress de la patiente en lui montrant qu'il s'agit d'un geste doux et indolore. En cas de difficulté à faire pénétrer le cathéter, il est nécessaire de préparer la tentative par un autre test réalisé sous anesthésie, complété par une hystérocopie afin de comprendre quel est l'obstacle qui s'oppose à la pénétration du cathéter dans l'endocol, et dans certains cas, réaliser une dilatation cervicale.

### Fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro* consiste à assurer l'union des gamètes hors du tractus génital féminin. À partir de ce principe, la fécondation *in vitro* se déroule en plusieurs étapes successives : le contrôle de la maturation folliculaire, le recueil des gamètes, la phase biologique de fécondation, le transfert des embryons et la phase lutéale.

#### CONTRÔLE DE LA MATURATION FOLLICULAIRE

L'objectif de cette première étape est d'assurer le recueil d'au moins un ovocyte fécondable, c'est-à-dire un ovocyte ayant terminé ses différentes phases de maturation cytoplasmique et nucléaire. Différentes méthodes sont utilisées pour préparer les ovaires au recueil ovocytaire : le cycle naturel, l'induction de l'ovulation par citrate de clomifène, les stimulations de l'ovulation par l'association citrate de clomifène/FSH ou l'administration de FSH en association ou non avec un agoniste de la GnRH.

#### ■ Cycle naturel

Le premier enfant né après un cycle de fécondation *in vitro* est le résultat du recueil d'un ovocyte au cours d'un cycle naturel<sup>[84]</sup>. Bien que cette méthode permette la sélection naturelle d'un ovocyte mature par les moyens de régulations endogènes, le transfert d'un seul embryon en réduit l'efficacité en termes de taux de grossesse. Lors d'un cycle naturel, le taux de succès du recueil de l'ovocyte est de 50 % et le taux de grossesse par cycle est d'environ 3 %<sup>[18]</sup>.

Par ailleurs, le recueil d'un ovocyte lors d'un cycle naturel requiert un monitoring de l'ovulation extrêmement précis afin de détecter le pic préovulatoire de LH et réaliser la ponction ovarienne avant la rupture folliculaire. Cette surveillance nécessite, dès le 8<sup>e</sup> jour du cycle, des dosages répétés de LH et d'œstradiol et des échographies ovariennes pour suivre la croissance du follicule. La rupture folliculaire survient 37 heures après le début du pic de LH lorsque celui-ci est détecté dans le plasma et 24 heures après si le dosage de la LH est urinaire. Le prélèvement ovocytaire peut être décidé soit à partir du pic spontané de LH (il faut alors accepter de réaliser la ponction folliculaire et la fécondation *in vitro* à toutes les heures du jour et de la nuit), soit à partir d'une injection déclenchante de *human chorionic gonadotrophin* (hCG) dès que le diamètre du follicule atteint 18 mm de diamètre avec une sécrétion œstrogénique supérieure à 150 pg/mL (la ponction est alors réalisée 35 heures après l'injection d'hCG).

Les cycles induits par le citrate de clomifène (150 mg/j pendant 5 jours en débutant entre le 2<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jours du cycle) permettent le développement d'un à trois follicules. Le taux de grossesses cliniques par cycle est d'environ 10 %<sup>[62]</sup>. Le monitoring de l'ovulation a les mêmes impératifs que celui des cycles spontanés. Le soutien de la phase lutéale par œstradiol et progestérone est recommandé pour améliorer les taux de réussite<sup>[53]</sup>.

Compte tenu des faibles taux de réussite et de la difficulté du suivi, les cycles spontanés et induits sont, actuellement, très peu utilisés pour préparer les ovaires au recueil ovocytaire.

#### ■ Protocoles de stimulation ovarienne en vue d'une fécondation *in vitro*

##### Principes

Les principes de la stimulation de l'ovulation sont de renforcer les processus de recrutement et de maturation folliculaires, qui sont essentiellement dépendants de la FSH. Lorsque la maturation folliculaire est suffisante, l'administration de LH (ou hCG) permet de reproduire l'effet du pic préovulatoire de LH pour induire la maturation finale des ovocytes.

L'objectif principal de la stimulation de l'ovulation pour fécondation *in vitro* est donc de multiplier le nombre d'ovocytes matures, susceptibles d'être fécondés car le transfert de plusieurs embryons augmente les chances de débuter une grossesse.

Par ailleurs, la stimulation de l'ovulation permet de prendre le contrôle du cycle pour ne plus être soumis aux phénomènes endocriniens spontanés de la patiente. Certains protocoles permettent de programmer les différents événements en cours de traitement, en particulier de programmer la date et l'heure des ponctions folliculaires.

En revanche, un des inconvénients de la stimulation de l'ovulation est de réaliser une maturation ovocytaire moins complète et de moins bonne qualité que les processus de régulation physiologiques. Il existe un certain degré d'inhomogénéité de la cohorte ovocytaire recrutée avec des ovocytes à différents stades de maturation<sup>[54]</sup>.

La stimulation de l'ovulation, par le recrutement multiple de follicules, entraîne une augmentation considérable des taux d'œstrogènes circulants et, dans une moindre mesure, des androgènes.

##### Médicaments

- Citrate de clomifène

Le taux d'annulation de cycles avec cette méthode est de 25 à 40 % des cas, soit du fait d'une réponse ovarienne insuffisante, soit à

cause d'un pic prématuré de LH. Classiquement, il est administré à la dose de 150 mg/j pendant 5 jours en débutant entre les 2<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> jours du cycle. Il est plus largement utilisé, dans les protocoles de fécondation *in vitro*, en association avec des gonadotrophines.

- *Gonadotrophines*

Si la plupart des études publiées à ce jour font état de traitements avec des *human menopausal gonadotrophin* (hMG) ou des FSH pures, les protocoles peuvent utiliser maintenant les FSH recombinantes. Les FSH recombinantes sont préparées, par recombinaison génétique, à partir de cultures de cellules d'ovaires de hamsters chinois. Cette méthode de préparation leur confère une très haute pureté et une activité spécifique (> 10 000 UI de FSH/mg de protéine), sans variation interéchantillons. Cette pureté et son faible pouvoir immunogénétique permettent une administration par voie sous-cutanée. Les FSH recombinantes contiennent une série d'isohormones, avec des points isoélectriques variant entre 4,3 et 5,7. Ces différences sont dues à leur composition en acide sialique et sont corrélées à leur activité biologique [58]. Leur demi-vie d'élimination est comparable à celle des FSH urinaires.

Les préparations de FSH recombinantes ne contiennent pas de LH. Cependant, il a été démontré que, sous agoniste de la GnRH, les taux de LH sont suffisants pour obtenir un développement folliculaire avec les FSH recombinantes [27]. Si l'efficacité d'un nouveau produit est étudiée par son pouvoir à stimuler correctement la folliculogénèse, à produire des ovocytes matures, à permettre une stéroïdogénèse adéquate pour le développement endométrial et par l'obtention de grossesses, les FSH recombinantes ont montré leur efficacité et leur sécurité dans les protocoles de fécondation *in vitro* [50, 72]. Les FSH recombinantes réduisent la durée de stimulation, la dose totale de FSH nécessaire pour un nombre d'ovocytes récupérés supérieur. La qualité des embryons obtenus est meilleure, ce qui permet plus souvent une congélation et augmente le taux global de grossesses [9, 22].

- *Agonistes de la GnRH*

Les agonistes de la GnRH diffèrent du décapeptide naturel par les acides aminés en position 6 et 10. Ceci leur confère une résistance à la dégradation par les endopeptidases et augmente leur demi-vie. L'administration initiale d'agonistes de la GnRH entraîne une décharge de gonadotrophines de l'hypophyse antérieure (effet *flare-up*). L'administration au long cours produit une contre-régulation et une désensibilisation des récepteurs à la GnRH de l'hypophyse entraînant la suppression de la sécrétion de LH et de FSH et, par conséquent, un état d'hypogonadisme réversible [49].

L'adjonction des agonistes de la GnRH à la stimulation ovarienne par gonadotrophines exogènes supprime le risque de pic prématuré de LH, réduit les risques de lutéinisation prématurée des cellules de la granulosa et réduit, ainsi, le nombre de cycles annulés pour lutéinisation prématurée ou ovulation. En fécondation *in vitro*, cette association permet d'augmenter le nombre d'ovocytes recueillis, le nombre d'embryons transférés et le taux de grossesses cliniques [52].

Dans les protocoles de fécondation *in vitro*, les agonistes de la GnRH peuvent être administrés soit en début de cycle (hypogonadisme obtenu en 14 jours), soit en phase lutéale du cycle précédant la fécondation *in vitro* (hypogonadisme obtenu en 10 jours), sans différence en termes de taux de grossesses.

L'utilisation des agonistes de la GnRH en fécondation *in vitro* implique de soutenir la phase lutéale par l'adjonction de progestérone ou d'hCG pour éviter l'insuffisance lutéale en période péri-implantatoire.

Pour les protocoles de fécondation *in vitro*, les agonistes de la GnRH se présentent sous forme injectable ou en spray nasal. Il existe des formes retardes (une injection pour 28 jours) ou immédiates (une injection quotidienne). Les résultats de l'action de ces différents agonistes de la GnRH sont comparables lors des protocoles de fécondation *in vitro* [21].

Lors des cycles de stimulation ovarienne sans agoniste, une injection d'agoniste de la GnRH peut être utilisée pour le déclenchement de

l'ovulation. Cette pratique est parfois préférable à l'injection d'hCG, surtout lorsqu'il existe un risque important de syndrome d'hyperstimulation [55].

- *Antagonistes de la GnRH*

Les antagonistes de la GnRH induisent une suppression totale et immédiate de la sécrétion de LH [4, 31]. À l'inverse des agonistes de la GnRH, ils ne produisent pas de stimulation initiale. Comparativement aux agonistes en stimulation de l'ovulation pour fécondation *in vitro*, les antagonistes de la GnRH induisent des taux de LH plus bas, plus d'ovocytes matures récupérés et une proportion plus importante d'embryons de bonne qualité [57]. Le soutien de la phase lutéale est conseillé lors de l'utilisation de ces protocoles pour fécondation *in vitro* [5].

Deux produits sont commercialisés : Cetrorelix® et Ganirelix®. Les études de doses ont démontré que la dose minimale active est de 0,25 mg/j pour les deux produits [6]. Une dose unique de 3 mg, administrée au 8<sup>e</sup> jour du cycle stimulé, semble être efficace dans la prévention du pic de LH lors de protocoles de stimulation pour fécondation *in vitro* [71].

- *hCG*

L'hCG, sécrétée par le trophoblaste, a une analogie structurale avec la LH qui lui confère le même type d'actions biologiques, en particulier, celle de réactiver la méiose ovocytaire. L'administration appropriée d'hCG, après que le follicule et l'ovocyte ont accompli l'ensemble des processus initiaux de la maturation, induit la lutéinisation et la rupture folliculaire ainsi que la maturation de l'ovocyte I en ovocyte II.

Dès les critères de maturation folliculaire obtenus, les posologies habituellement utilisées pour déclencher l'ovulation par hCG sont de 5 000 ou 10 000 UI. Toutefois, il semblerait que retarder l'injection déclenchante de 24 heures ne nuise pas aux taux de grossesses [1, 28]. La ponction folliculaire doit être réalisée 36 heures après l'injection ; dans tous les cas avant 38 heures.

L'hCG est détectable dans le plasma entre 8 et 10 jours après l'injection.

### Monitoring de l'ovulation

Le monitoring de l'ovulation correspond à la surveillance du développement folliculaire lors d'une stimulation ovarienne afin de repérer le moment adéquat du déclenchement et de cerner les situations à risques comme l'hyperstimulation ovarienne ou les réponses insuffisantes.

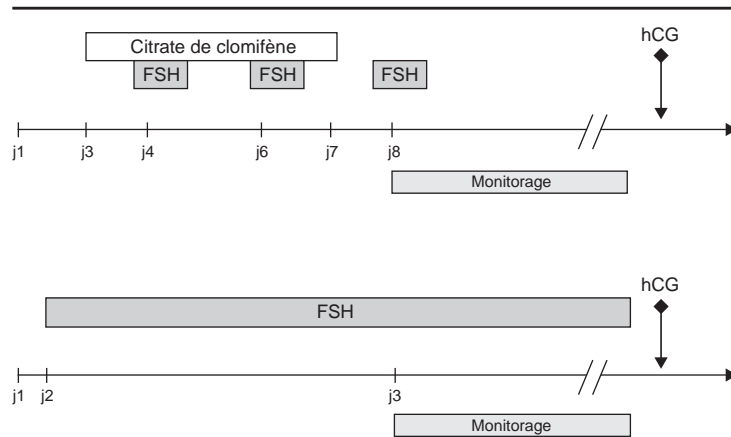
- *Échographie pelvienne*

L'échographie ovarienne, réalisée de façon préférentielle par voie vaginale, renseigne sur le développement morphologique des follicules sur chacun des ovaires. Elle permet de comptabiliser tous les follicules recrutés et de noter leur diamètre respectif. Ce diamètre correspond, généralement, à la moyenne de deux ou trois mesures dans les différents axes du follicule. Sans qu'il y ait de relation précise entre la mesure du développement folliculaire et le degré de maturation folliculaire obtenu après stimulation, la confrontation des données échographiques avec l'œstradiolémie permet d'approcher la notion de maturité. Ces critères permettent, généralement, de prendre les décisions appropriées sur la conduite de la stimulation ou le déclenchement. Parmi les différents examens du monitoring, l'échographie ovarienne est vraisemblablement celui qui renseigne le mieux au moindre coût [63].

Dans le même temps, l'échographie pelvienne permet de visualiser l'aspect de la muqueuse endométriale et de mesurer son épaisseur. Une épaisseur inférieure à 8 mm le jour de l'administration de l'hCG est de mauvais pronostic, alors que l'aspect en triple ligne est de bon pronostic [82].

- *Œstradiolémie*

Le taux d'œstradiol plasmatique est d'autant plus élevé que le nombre de follicules recrutés est important, et que leur volume



**1** Stimulation de l'ovulation sans agoniste de la gonadotrophin releasing hormone (GnRH). Protocole citrate de clomifène/follicle stimulating hormone (FSH) et protocole FSH seule.

(donc le nombre de cellules sécrétantes) est augmenté. L'œstradiolémie est donc reliée de façon quantitative à la réponse ovarienne. Une relation qualitative et pronostique peut être jugée sur l'allure de l'évolution de ce taux en cours de stimulation. L'évolution œstrogénique la plus favorable est une augmentation progressive et constante, y compris le lendemain du déclenchement par hCG.

- *LH plasmatique*

Le monitoring de la LH est indispensable dans les protocoles de stimulation sans blocage hypophysaire par un agoniste de la GnRH. Il permet de détecter un pic prématuré de LH, qui le plus souvent amène à annuler le cycle en cours. La détection du pic nécessite plusieurs dosages par jour, ce qui fait, parfois, préférer les dosages urinaires moins contraignants. De plus, la définition d'un valeur seuil pour le début du pic de LH est difficile à obtenir puisque ce seuil varie pour chaque patiente et d'un cycle à l'autre. Ce dosage est inutile dans les protocoles avec blocage de l'activité hypophysaire endogène, sous agonistes de la GnRH.

- *Progestéronémie*

Certaines équipes complètent le monitoring par un dosage de la progestéronémie avant l'injection déclenchante d'hCG. La présence de progestérone correspond, à ce moment du cycle, à un début de lutéinisation des cellules de la granulosa<sup>[59]</sup>. Après une réponse correcte à la stimulation de l'ovulation, une élévation de la progestéronémie au-delà de 0,9 ng/mL ne semble pas avoir de conséquences délétères sur la qualité embryonnaire mais peut nuire à la réceptivité endométriale<sup>[36]</sup>. En revanche, si la réponse à la stimulation est faible, une élévation de la progestéronémie est associée à de faibles taux de grossesses. Toutefois, la progestéronémie ne peut être considérée comme un facteur pronostique du cycle de fécondation *in vitro* en cours<sup>[44]</sup>.

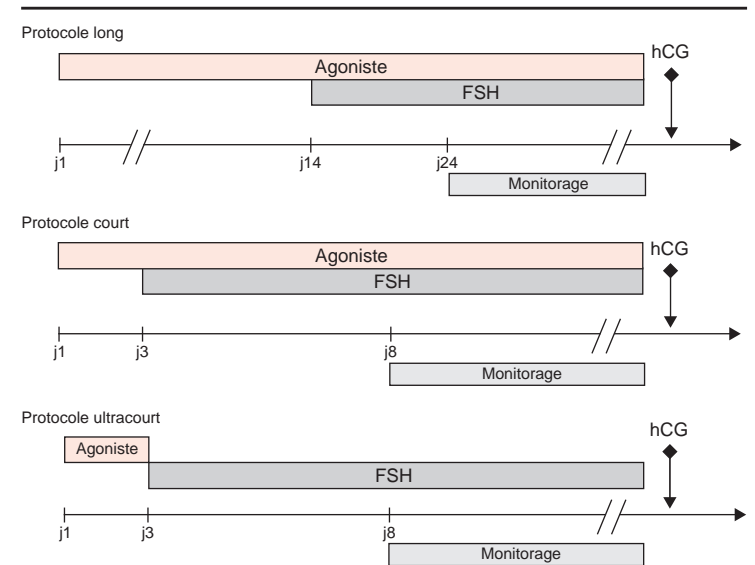
### Protocoles

Actuellement en France, 96 % des cycles de stimulation ovarienne en vue de fécondation *in vitro* sont réalisés avec des protocoles longs associant un agoniste de la GnRH et des gonadotrophines. Ce type de protocole a pour avantages de réduire le taux d'annulation de cycles, d'augmenter le nombre d'ovocytes recueillis et donc les taux de grossesses<sup>[7]</sup>.

- *Sans agoniste de la GnRH (fig 1)*

*Citrate de clomifène/gonadotrophines.*

Le citrate de clomifène est administré à la posologie de 100 mg/j du 3<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jours du cycle. Les gonadotrophines sont administrées, à doses standardisées, par exemple de 225 UI, les 4<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours du cycle. Le monitoring intervient à partir du 10<sup>e</sup> jour du cycle et des doses supplémentaires de FSH peuvent être administrées en fonction de la réponse.



**2** Stimulation de l'ovulation avec agoniste de la gonadotrophin releasing hormone (GnRH). Protocole long, protocole court et protocole ultracourt.

### Gonadotrophines seules.

Les gonadotrophines sont débutées tôt en phase folliculaire (2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour du cycle) à une posologie adaptée aux caractéristiques de chaque patiente (entre 150 et 300 UI/j). Leur administration est quotidienne et le monitoring de la réponse ovarienne intervient au 8<sup>e</sup> jour du cycle. La dose de gonadotrophines peut être alors modulée en fonction de la réponse ovarienne jusqu'au déclenchement.

- *Avec agoniste de la GnRH (fig 2)*

#### *Protocole long.*

Le principe est d'obtenir une désensibilisation hypophysaire par agoniste de la GnRH avant de débuter la stimulation ovarienne par gonadotrophines. L'agoniste de la GnRH est soit administré en début de phase folliculaire (1<sup>er</sup> ou 2<sup>e</sup> jour du cycle), soit en phase lutéale du cycle précédent. Son administration peut être quotidienne ou sous forme retard, avec une injection pour 28 jours. Le phénomène de désensibilisation est effectif entre 10 et 14 jours après son administration. Il peut être contrôlé par un dosage de l'œstradiolémie (< 50 pg/mL) et par une échographie pelvienne à la recherche de formations d'allure folliculaire sur les ovaires. Une fois la désensibilisation acquise, tout en poursuivant l'administration de l'agoniste, la stimulation de l'ovulation est débutée par l'injection quotidienne de gonadotrophines, à une dose entre 100 et 200 UI. Le monitoring de la stimulation de l'ovulation intervient entre les 8<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours de stimulation.

#### *Protocole court.*

Le principe est d'utiliser l'effet de stimulation initiale des agonistes de la GnRH. L'administration de l'agoniste de la GnRH et des gonadotrophines intervient donc de façon simultanée dès le début du cycle et se poursuit jusqu'à l'obtention des critères de déclenchement. Après la phase de stimulation de l'agoniste, la désensibilisation est suffisante pour éviter la survenue inopinée d'un pic de LH.

#### *Protocole ultracourt.*

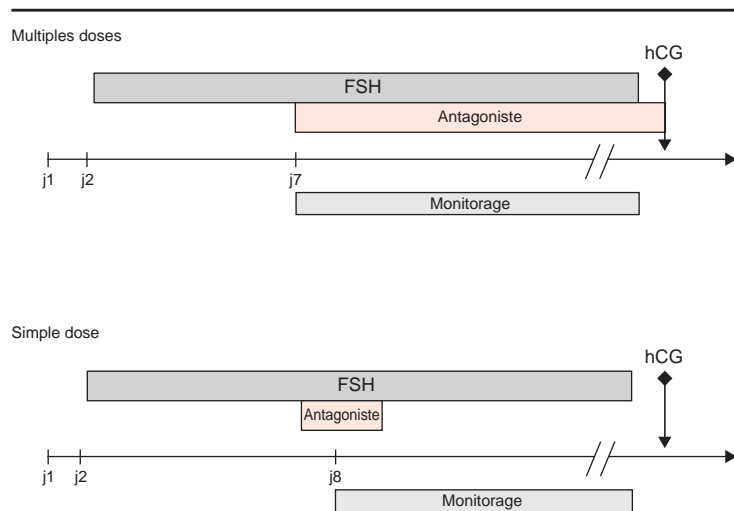
Le principe est identique, si ce n'est que l'agoniste est administré seulement pendant 2 à 3 jours avant de débuter les gonadotrophines.

- *Avec antagoniste de la GnRH (fig 3)*

Le principe est d'inhiber la survenue d'un éventuel pic prématuré de LH par l'administration d'un antagoniste de la GnRH.

#### *Protocole à doses multiples.*

La stimulation ovarienne par gonadotrophines est débutée dès le 2<sup>e</sup> jour du cycle, administrée de façon quotidienne, à doses



**3** Stimulation de l'ovulation avec antagoniste de la gonadotrophin releasing hormone (GnRH). Protocole multiples doses et protocole simple dose.

standardisées. L'antagoniste est administré à la posologie de 0,25 mg/j dès le 7<sup>e</sup> jour du cycle (6<sup>e</sup> jour de la stimulation) et ceci de façon concomitante des gonadotrophines jusqu'à l'obtention des critères de déclenchement.

*Protocole à dose unique.*

Le schéma est identique à l'exception d'une administration unique d'antagoniste au 8<sup>e</sup> jour du cycle, à la posologie de 3 mg.

#### • Protocoles de programmation

Les protocoles de programmation ont pour but d'éviter de réaliser les ponctions folliculaires et la fécondation *in vitro* certains jours, en particulier les dimanches<sup>[90]</sup>. Connaissant les jours à éviter, il est possible, par déduction, de décider du jour où la stimulation doit être débutée. Le cycle précédant celui de la fécondation *in vitro* est alors modifié en conséquence, notamment à l'aide de progestatifs (le début des règles est en moyenne 3 jours après l'arrêt de la noréthistérone).

Par ailleurs, lors des cycles utilisant des agonistes de la GnRH, il est possible de modifier la durée de la phase de désensibilisation, toujours dans le sens d'une augmentation de la durée, afin de débuter la stimulation par gonadotrophines le jour voulu (en moyenne 12 jours avant la ponction folliculaire)<sup>[65]</sup>. Dans ce schéma, la stimulation est généralement débutée un jeudi ou un vendredi pour une ponction entre le lundi et le vendredi.

#### Critères de déclenchement

Les critères de déclenchement sont à déterminer par chaque équipe. Ceux-ci sont dépendants des habitudes de chacun pour mesurer les diamètres des follicules, de la méthode de dosage de l'œstradiolémie et du type de protocole de stimulation choisi. Cependant, la précision de la décision de déclenchement par hCG est un des facteurs les plus importants du pronostic. Administrée trop tôt, l'hCG induit une atresie ovocytaire. En revanche, avec les protocoles avec agonistes de la GnRH, l'administration peut être différée de 24 heures après l'obtention des critères de déclenchement sans altérer les résultats.

Toutefois, avec les protocoles avec désensibilisation et gonadotrophines exogènes, les critères les plus communément admis sont de déclencher dès que au moins trois follicules atteignent 17-18 mm de diamètre avec un taux d'œstradiolémie supérieur à 1 000 pg/mL<sup>[85]</sup>.

#### Critères d'annulation d'un cycle

Quel que soit le type de protocole utilisé pour la stimulation ovarienne pour fécondation *in vitro*, 10 à 30 % des cycles sont annulés selon les équipes à cause d'une réponse inadéquate, n'offrant pas le maximum de chances de conception au couple<sup>[83]</sup>. Plusieurs situations peuvent amener à annuler un cycle de traitement.

– Les réponses insuffisantes : les définitions des réponses à la stimulation insuffisantes sont multiples. Toutefois, le recrutement de moins de trois follicules, le développement de structures d'allure kystique à l'échographie, la nécessité de stimuler avec des doses supérieures à quatre ampoules d'hMG (300 UI), une chute de l'œstradiolémie 2 jours consécutifs, un pic d'œstradiolémie inférieur à 750 pg/mL (2 700 pmol/L) le jour du déclenchement et un taux d'œstradiolémie inférieur à 100 pg/mL (360 pmol/L) après 5 à 8 jours de stimulation dans les protocoles sans agoniste semblent être admis par tous.

– Les réponses excessives : la définition varie selon les habitudes de chacun et les méthodes de dosages de l'œstradiolémie. Cependant, un recrutement de plus de 25 follicules à l'échographie et un taux d'œstradiolémie supérieur à 5 000 pg/mL (18 500 pmol/L) représentent une limite à ne pas franchir. Le risque, en cas de déclenchement par hCG, est le syndrome d'hyperstimulation ovarienne, qui, toutefois, peut aussi survenir pour des valeurs moins élevées<sup>[47]</sup>.

– L'atresie folliculaire : l'arrêt de la maturation folliculaire se manifeste par une chute de l'œstradiolémie. Ce phénomène peut survenir en cours de folliculogénèse (souvent associé à une réponse insuffisante ou à une insuffisance d'apports exogènes de gonadotrophines) ou à la suite d'une élévation prématurée de LH ou entre l'administration de l'hCG et le recueil ovocytaire, notamment si la décision du déclenchement est inadéquate.

– Le pic prématuré de LH : en dehors des protocoles avec agonistes de la GnRH, un pic de LH peut survenir, soit avant les critères de maturité (entraînant alors une atresie), soit trop tôt par rapport à la décision médicale de déclenchement (perturbant ainsi la programmation des événements).

#### Protocoles particuliers

##### • En présence d'un risque de réponse insuffisante

En présence d'un risque de réponse insuffisante, des dizaines de protocoles ont été décrits, révélant ainsi la difficulté à traiter ces patientes. L'approche la plus intuitive est d'augmenter les doses de gonadotrophines. Toutefois, les réponses à cette méthode peuvent être variables, et parfois, avec six ampoules d'hMG (450 UI), la réponse n'est pas améliorée<sup>[56]</sup>. Certains proposent de réduire la posologie de l'agoniste de la GnRH utilisé pour la désensibilisation<sup>[38]</sup>. D'autres essayent les protocoles courts, des protocoles sans agoniste de la GnRH, voire les cycles naturels avec des taux de succès très inconstants<sup>[8]</sup>. Les traitements adjuvants comme les glucocorticoïdes ou l'œstrogénothérapie n'ont pas clairement démontré leur efficacité<sup>[10]</sup>. L'adjonction d'hormone de croissance demande encore à être évaluée pour définir sa place et ses indications<sup>[23]</sup>. Bien que difficile à démontrer, l'arrêt du tabac doit être fortement conseillé<sup>[33]</sup>.

##### • En présence d'un risque de réponse excessive

Chez les patientes ayant des facteurs de risques de réponse excessive à la stimulation, la réduction des doses de gonadotrophines (< 150 UI) est la première étape qui apporte, souvent, la solution. L'utilisation de FSH purifiée semble préférable aux hMG<sup>[86]</sup>. Ceci étant, l'utilisation des FSH recombinantes n'élimine pas le risque de réponse excessive, ni de syndrome d'hyperstimulation. Chez les patientes avec un syndrome des ovaires polykystiques, la mise en œuvre des protocoles avec augmentation progressive des doses de gonadotrophines permet de recruter un nombre de follicules limité et éviter l'exposition à l'hyperstimulation.

##### • En présence d'une réponse excessive en cours de stimulation

Face à une réponse ovarienne jugée excessive, la conduite à tenir la plus simple et la plus sûre est de ne pas déclencher et d'annuler le cycle de stimulation. Par ailleurs, de nombreux protocoles ont été décrits pour tenter de réduire le risque d'hyperstimulation ovarienne comme les perfusions d'albumine, l'absence de soutien en phase

lutéale par de l'hCG ou la congélation embryonnaire et le transfert différé sur un cycle ultérieur<sup>[17]</sup>. L'alternative à l'annulation du cycle peut être de poursuivre l'agoniste de la GnRH en interrompant l'apport exogène de gonadotrophines. Dans ce cas, la stimulation adaptée peut être reprise après 25 jours. Le monitoring doit être précoce afin d'adapter, si nécessaire, les posologies en cours de stimulation.

Certains auteurs ont proposé une méthode portant les noms anglo-saxons de *coasting* ou *drifting* ou en français « protocole d'atresie contrôlée »<sup>[24, 40, 89]</sup>. Il s'agit, lorsque la réponse est jugée excessive, d'arrêter l'apport de gonadotrophines tout en poursuivant l'agoniste et en attendant que l'œstradiolémie chute en dessous d'une valeur seuil pour déclencher par hCG.

## RECUEIL OVOCYTAIRE

### ■ Techniques

La ponction folliculaire a pour but de recueillir le maximum d'ovocytes fécondables ayant accompli l'ensemble des processus de maturation nucléaire et cytoplasmique in vivo avant toute rupture folliculaire. L'heure du prélèvement sera définie de façon précise : la maturation est obtenue 25 à 30 heures après l'ascension préovulatoire du pic de LH (ou l'injection d'hCG) et la rupture folliculaire survient en moyenne 37 heures après. La ponction folliculaire doit permettre le recueil de 80 % des ovocytes.

Le matériel comprend un système d'aspiration réalisé avec des plastiques compatibles avec les cultures cellulaires et conçus pour diminuer le risque de traumatisme ovocytaire. L'aiguille a un diamètre interne d'environ 1 mm. L'augmentation de ce calibre n'augmente pas le nombre d'ovocytes collectés ou leur capacité de fécondation, mais élève de façon significative la sensation douloureuse perçue par la patiente. L'aiguille est reliée à l'éprouvette de recueil par une tubulure d'un seul tenant diminuant ainsi le risque de turbulences. Ce matériel est le plus souvent à usage unique. Dans le cas contraire, il faut être vigilant sur l'emploi des agents antiseptiques potentiellement cytotoxiques comme le formol et les produits iodés. Un rinçage à l'eau stérile est alors nécessaire avant son utilisation. Il faut également éliminer par rinçage le talc des gants des chirurgiens. L'ensemble du système de recueil est relié à une source de vide contrôlée par un manomètre. Une dépression de 80 à 100 mmHg est suffisante. Une dépression plus importante, notamment si elle est réalisée directement à la seringue, peut s'accompagner d'un taux d'ovocytes dépellucidés élevé. Avant chaque intervention, le système est testé en aspirant du milieu de culture dit « milieu de rinçage » dans l'aiguille et dans la tubulure. L'ovocyte n'est souvent aspiré que vers la fin de la ponction folliculaire avec du matériel plus épais et visqueux (les cellules granuleuses de la corona radiata et du cumulus). Il est donc nécessaire d'aspirer le contenu folliculaire « jusqu'à la dernière goutte » en orientant l'aiguille biseautée dans tous les axes du follicule et parfois même d'effectuer un lavage folliculaire. Celui-ci est réalisé par l'injection dans le follicule d'environ 2 mL de milieu de culture et peut être renouvelé plusieurs fois. Ce procédé reste réservé aux cas de réponses ovariennes paucifolliculaires.

Après le recueil, les liquides folliculaires sont transportés vers le laboratoire dans une enceinte isolée et chauffante à une température proche de 37 °C. Le prélèvement folliculaire est effectué sous contrôle échographique avec une sonde endovaginale. Celle-ci permet d'exploiter l'élasticité vaginale afin de se rapprocher de l'ovaire à ponctionner (de 1 à 3 cm) et ainsi d'obtenir une définition de l'image précise ce qui facilite la ponction. Cette sonde est munie d'un guide de ponction qui permet d'augmenter les taux de recueil. L'aiguille est introduite dans les culs-de-sac postérieurs ou latéraux du vagin vers l'ovaire ou vers le cul-de-sac de Douglas dans le cas où l'ovulation se serait déjà produite. La désinfection vaginale est réalisée avec des agents antiseptiques non cytotoxiques (chlorhexidine). Si ces produits sont indisponibles, il est préférable d'utiliser du sérum salé isotonique plutôt que des produits iodés qui diminuent le taux de grossesse sans diminuer significativement le risque infectieux.

La voie transurétrale offre les mêmes avantages que la voie transvaginale et est utilisée lorsque les ovaires sont haut situés, à distance des culs-de-sac vaginaux. La première technique décrite de ponction sous contrôle échographique est la ponction abdominale transvésicale. Mais l'aiguille doit pénétrer profondément dans l'abdomen, ce qui altère la précision et traverse la vessie et sa face postérieure générant ainsi des douleurs. Enfin, la contamination des liquides folliculaires par de l'urine est possible. C'est pourquoi cette technique a été abandonnée au profit de la voie transvaginale.

L'analgésie peut être obtenue par anesthésie locale (bloc paracervical), sédation ou anesthésie générale<sup>[29]</sup>. Certains gaz (isoflurane et protoxyde d'azote) peuvent être associés à une diminution du taux d'ovocytes matures recueillis et de leur taux de fécondance. Même s'ils ne semblent pas avoir d'influence sur le devenir ultérieur de ces ovocytes (taux de grossesse identique quel que soit le type d'agent anesthésique employé), les agents anesthésiques volatils sont à proscrire.

Certains proposent d'effectuer par voie coelioscopique, dans le même temps, le recueil ovocytaire et le bilan endoscopique des patientes infertiles. Ce bilan pelvien est alors gêné par la stimulation ovarienne, par le liquide et le sang qui s'accumulent dans le cul-de-sac de Douglas du fait de la ponction folliculaire et par l'impossibilité de faire les manœuvres de mobilisation utérine et les tests de perméabilité tubaire. Cependant, la coelioscopie (adhésiolyse ou coagulation d'endométriase) n'influence pas les taux de grossesse de ces patientes, par comparaison à la réalisation des deux procédures séparément<sup>[42]</sup>. Bien que ce mode de prélèvement ovocytaire ait été le premier élaboré, la voie coelioscopique a été abandonnée. Le prélèvement folliculaire sous contrôle échographique offre le même niveau de performance que la voie coelioscopique ainsi que d'autres avantages :

- il est réalisable sans anesthésie générale dans le cadre d'un service d'hospitalisation de courte durée (coût moindre) ;
- tous les follicules sont accessibles y compris ceux qui sont encapsulés dans un manteau adhérentiel ou ceux à développement centro-ovarien ;
- l'apprentissage de la technique de ponction sous contrôle échographique est aisé ;
- enfin, les ultrasons n'altèrent pas la qualité ovocytaire contrairement à l'exposition au CO<sub>2</sub> utilisé en coelioscopie pour l'insufflation abdominale qui est responsable d'une modification du pH du liquide folliculaire.

### ■ Complications

Bien que le nombre de complications ayant une traduction clinique soit très faible, la littérature médicale fait état de complications infectieuses dans 0,4 % des cas<sup>[46]</sup>. Elles sont en général retardées par rapport à la ponction. Les signes cliniques évoquant un tableau de pelvipéritonite et un syndrome inflammatoire biologique doivent y faire penser. L'imagerie reste non spécifique de ce contexte. Elles peuvent être secondaires à l'introduction transvaginale de bactéries, à une effraction digestive, même minime ou encore, et c'est le cas le plus fréquent, à l'acutisation d'un foyer inflammatoire annexiel ou pelvien (endométriase ou pyosalpinx). L'antibioprophylaxie, lors de la ponction, n'est toutefois pas recommandée. Si le traitement médical est débuté suffisamment tôt (avant l'abcédation), la guérison peut être obtenue sans avoir recours à un geste chirurgical. Dans le cas contraire, celui-ci est réalisé soit par laparotomie, soit par colpotomie postérieure ou encore par voie endoscopique.

Les complications hémorragiques représentent 0,2 % des cas et se manifestent par un tableau d'abdomen chirurgical associé à des signes d'anémie aiguë. En général, il s'agit d'un saignement d'origine ovarienne par lacération des vaisseaux péri-folliculaires ou hémorragie intra-folliculaire. Une plaie vasculaire est une éventualité moins fréquente ; elle peut entraîner la constitution d'un hématome rétropéritonéal plus ou moins extensif et symptomatique. L'observation en hospitalisation avec glace sur le ventre est le plus souvent suffisante. Une hémostase chirurgicale doit rester

exceptionnelle. Enfin, une hémorragie vaginale sera facilement diagnostiquée et un point en X dans le cul-de-sac vaginal en cause permet d'assurer l'hémostase.

Les autres complications imputables à la ponction sont rares. Pour mémoire, il est rapporté une péritonite mucineuse suite à la rupture de kyste dermoïde, une lésion urétérale et une appendicite perforée.

Les complications liées à l'anesthésie représentent moins de 10 % des cas [29].

Les ponctions blanches (sans ovocytes recueillis : 0,1 à 0,8 % des ponctions) sont consécutives soit à un problème technique, soit à l'absence d'ovocyte dans les follicules, soit à une erreur dans l'application du traitement de stimulation ovarienne [30, 76, 77].

## PHASE BIOLOGIQUE

### ■ Fécondation *in vitro* par simple rapprochement des gamètes

#### Manipulation des spermatozoïdes

##### • Objectifs

Il s'agit de préparer une suspension de spermatozoïdes dont les caractéristiques sont aussi proches que possible de celles qui se trouvent dans le tractus génital féminin en cas de normospermie. Ces caractéristiques sont :

- spermatozoïdes normaux, parmi lesquels sont retrouvés les spermatozoïdes féconds ;
- spermatozoïdes mobiles, condition indispensable à la pénétration de l'ovocyte ;
- spermatozoïdes capacités, pour assurer la fécondation ;
- spermatozoïdes en nombre suffisant (ni trop peu, car cela diminuerait les chances de rencontre avec l'ovocyte, ni trop, à cause de risques de polyspermie) ;
- spermatozoïdes débarrassés de toute trace de liquide séminal (qui contient des inhibiteurs de la fécondation) et des micro-organismes.

##### • Préparation de sperme *in vitro*

Le but est de sélectionner les spermatozoïdes mobiles à morphologie normale aptes à féconder les ovocytes et d'éliminer le plasma séminal, les débris cellulaires, les cellules (type leucocytes, hématies) et les agents infectieux [48].

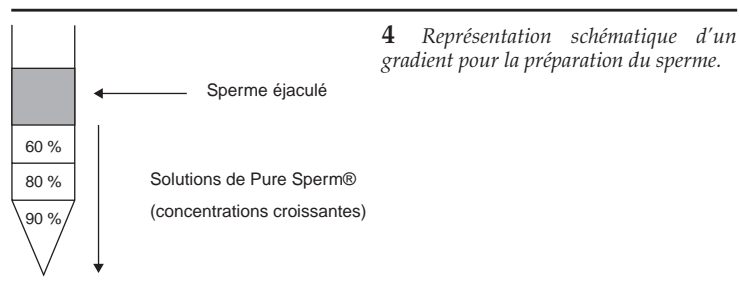
##### Recueil de sperme.

Le recueil de sperme doit se faire au laboratoire par masturbation dans un récipient approprié à usage unique et à col large. Le délai d'abstinence sexuelle (absence d'éjaculation) de 2 à 5 jours est recommandé. Un délai d'abstinence supérieur à 5 jours est toujours néfaste à la vitalité et à la mobilité des spermatozoïdes. Pour éviter une contamination accidentelle du sperme, le patient doit uriner avant le recueil, puis se laver les mains, effectuer une toilette du gland avec un savon bactéricide et antifongique et rincer avec un soluté physiologique stérile. Le prélèvement est ensuite placé à l'étuve à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à liquéfaction du liquide séminal avant exploitation.

##### Méthodes de préparation.

Plusieurs techniques de séparation et de sélection de spermatozoïdes se sont développées depuis quelques années. Celles-ci ont pour but de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal permettant soit d'augmenter le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et normaux aptes à féconder l'ovocyte, soit tout simplement de concentrer les spermatozoïdes en éliminant les débris cellulaires et les cellules rondes.

Le principe de ces techniques consiste souvent à sélectionner les spermatozoïdes mobiles et/ou normaux et concentrer ceux-ci dans un petit volume. Ces améliorations et sélections spermatisques dépendent à la fois de la qualité initiale du sperme et du principe



de la méthode employée. Certaines techniques consistent à sélectionner les spermatozoïdes normaux soit par une migration ascendante (migration-sédimentation) dans un milieu de culture (*swim-up* ou après lavage), soit par filtration après passage sur un gradient de densité (Pure Sperm®). D'autres méthodes reposent sur l'amélioration de la mobilité et de la survie des spermatozoïdes par la supplantation du milieu de culture par des agents pharmacologiques (sérum humain, liquide folliculaire, liquide tubaire).

Le choix du traitement repose sur l'efficacité de la technique évaluée sur le plan biologique en termes du taux de récupération, de pourcentage de spermatozoïdes mobiles et normaux, et sur le plan clinique en termes de grossesses obtenues.

##### Sélection du sperme sur les gradients de densité.

La préparation du sperme est commencée 30 minutes après l'éjaculation et une analyse primitive du sperme permet un contrôle de qualité sur la numération (appréciée par comptage des spermatozoïdes dans un hémocytomètre [cellule de Thoma ou de Malassez] après immobilisation des spermatozoïdes dans une solution formolée à 1 %) et la mobilité des spermatozoïdes (appréciation à l'examen direct sur une goutte de sperme liquéfié entre lame et lamelle à 37 °C).

Actuellement, la séparation du sperme sur un gradient de Pure Sperm® est la méthode de préparation la plus utilisée. Cette technique permet, d'une part, d'éliminer les débris cellulaires ou acellulaires, les spermatozoïdes portant plusieurs anomalies morphologiques, les germes contenus dans le sperme (à l'exception d'*Escherichia coli* qui semble adhérer aux spermatozoïdes), ainsi que les agglutinats et d'autre part, d'améliorer la récupération des spermatozoïdes mobiles et normaux quel que soit le sperme initial (normal ou anormal). Le principe du Pure Sperm® est d'assurer une séparation des cellules étudiées en fonction de leur densité, et la technique consiste à faire migrer le sperme sur un gradient discontinu par centrifugation. Le Pure Sperm® est une solution de particules colloïdales de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone, un polymère à site hétérogène. La réalisation du gradient consiste à verser successivement dans un tube des aliquots de 1 mL de solutions de Pure Sperm® diluées dans du milieu de culture de concentrations décroissantes (90 %, 80 % et 60 %) (fig 4), de façon à ce que les interfaces soient visibles entre les couches. Nous préparons 1 mL de chacune des trois fractions diluées de Pure Sperm® : à 60 % et 90 % avec du milieu Ferticult® et à 80 % avec de l'IVF® supplémenté en rouge de phénol (pour une meilleure distinction du gradient). La fraction la plus concentrée se trouve au fond du tube et la plus diluée en haut du tube. Chaque fraction est ajoutée délicatement au gradient pour éviter une homogénéisation du produit Pure Sperm®. Par la suite, le sperme liquéfié est déposé en totalité à la surface du gradient puis est centrifugé 20 minutes à 300 g (soit environ 1 800 tours/min). Les spermatozoïdes immobiles, le plasma séminal et les autres cellules du sperme restent dans les fractions 60 à 80 %, tandis que les spermatozoïdes mobiles migrent jusqu'à la fraction 90 % que l'on récupère. Un lavage est alors effectué pour éliminer les particules de Pure Sperm® avec du milieu IVF® (3 mL) par centrifugation 5 minutes à 300 g.

En définitive, cette fraction conservée contient en général les spermatozoïdes les plus mobiles puisque le Pure Sperm® améliore le recueil et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, notamment dans le cas des oligo-asthénospermies. Le culot est ensuite



resuspendu dans du milieu de culture IVF®. Le pourcentage de formes mobiles ainsi que la numération sont évalués avant l'utilisation. En principe, au terme de cette préparation, la suspension montre des spermatozoïdes :

- mobiles, théoriquement les plus mobiles ;
- normaux, car en règle générale, les spermatozoïdes les plus mobiles sont les plus normaux (bien qu'il n'y ait pas de coïncidence parfaite) ;
- capacités ;
- débarrassés de toute trace de liquide séminal et des micro-organismes ;
- en nombre correct que l'on peut ajuster par dilution.

Cependant, ces résultats théoriques sont parfois difficiles à atteindre :

- dans les oligo-astheno-térato-spermies sévères, une adaptation du gradient est recommandée ;
- certains micro-organismes, en particulier *Escherichia coli*, peuvent se fixer sur les spermatozoïdes et contaminer la suspension finale.

Autrement dit, la technique standard doit être adaptée à la qualité du sperme initial, en faisant varier les dilutions du gradient de Pure Sperm® pour obtenir un résultat le plus satisfaisant possible. L'échantillon ainsi préparé est ensuite mis en attente à l'étuve à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> avant insémination.

#### • Résultats

En fécondation *in vitro*, le nombre de spermatozoïdes nécessaire est d'environ 100 000/mL pour un ovocyte. Les conditions naturelles qui sont celles qui prévalent dans l'ampoule tubaire où a lieu normalement la fécondation sont ainsi artificiellement reconstituées. Cette concentration de spermatozoïdes peut être obtenue, même en cas d'oligo-astheno-térato-spermies sévères. Mais les résultats sont quand même limités par la qualité du sperme initial. En effet, le taux de fécondation diminue avec la qualité du sperme, de 63 % pour les spermés normaux à 5 % pour une oligo-astheno-térato-spermie très sévère [69]. De plus, le taux de segmentation diminue encore plus puisque 93 % des œufs provenant d'une fécondation par un sperme normal donnent un embryon, mais seulement 56 % des œufs provenant d'un sperme de mauvaise qualité donnent un embryon. Autrement dit, la diminution du nombre et de la mobilité est le signe d'une diminution de la fécondance des spermatozoïdes. Néanmoins, la préparation du sperme est une méthode tout à fait valable pour les spermés normaux. Dans les cas où la qualité du sperme est médiocre, elle améliore les taux de fécondation et en définitive permet d'obtenir un certain nombre de grossesses. Mais dans le cas de très mauvais spermés, les succès sont évidemment plus rares.

#### Manipulation des ovocytes

##### • Recueil des ovocytes

Il est particulièrement important d'avoir tous les ovocytes provenant des follicules ponctionnés, car cela augmente les chances de disposer du bon ovocyte. Ils sont recherchés dans les liquides folliculaires grâce au stéréomicroscope (loupe binoculaire, grossissement 10 à 40 fois). L'ovocyte de 110 µm de diamètre reste entouré de ses enveloppes (corona radiata et cumulus oophorus), l'ensemble ayant un diamètre de 2 ou 3 mm. La recherche rapide basée sur le repérage du cumulus est à proscrire, car il y a de nombreux ovocytes quasiment dépourvus de cumulus. Il est possible que ce soit les plus matures. La perte ou la destruction d'un ovocyte peut compromettre le succès de la tentative. La perte peut être favorisée par la viscosité du cumulus qui peut le faire adhérer à la paroi des tubes ou des pipettes. Les complexes cumulo-ovocytaires sont en définitive isolés du liquide folliculaire, rincés avec du Fercult® et mis en milieu de culture (IVF®) puis conservés dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide sous 5 % de CO<sub>2</sub> (maintien d'un pH de 7,4) pendant une durée maximale de 1 heure.

##### • Appréciation de la maturité des ovocytes

Une des conséquences de la stimulation est l'hétérogénéité de la cohorte ovocytaire. Tous les degrés de maturité peuvent être constatés :

- immaturité totale, cytoplasmique et nucléaire ;
- immaturité cytoplasmique isolée ;
- postmaturité complète.

La maturité nucléaire est signée par l'expulsion du premier globule polaire (première division méiotique) qui survient normalement pendant l'ovulation. Ce premier globule polaire peut être repéré, mais habituellement son observation est rendue impossible par les cellules périovocytaires. Celles-ci peuvent être enlevées mécaniquement ou à l'aide d'une enzyme : la hyaluronidase (présente dans l'acrosome du spermatozoïde). Mais il y a des risques de léser l'ovocyte et surtout sa zone pellucide et l'intérêt est limité car, malgré tout, il n'est pas toujours aisé de pouvoir conclure, le globule polaire étant d'une taille identique à celle d'une cellule de la corona radiata. Les phénomènes de maturation cytoplasmique sont mal connus. Il s'agit principalement de synthèses protéiques, dont certaines seulement sont connues (facteurs de décondensation spermatique, polysaccharides des grains corticaux). La maturation cytoplasmique comporte aussi vraisemblablement des modifications de la zone pellucide. Dans l'état actuel des techniques, rien ne permet de diagnostiquer cette maturité cytoplasmique sans léser l'ovocyte irréversiblement (diagnostic des grains corticaux au microscope électronique).

Des classifications ont été proposées. Certaines ont une valeur statistique, mais ne peuvent être appliquées à chaque ovocyte pris séparément :

- volume du cumulus, d'autant plus important que l'ovocyte est mature, mais il se peut aussi que la dissociation du cumulus au cours de l'aspiration soit précisément le signe d'une excellente maturité ;
- aspect du cumulus : les signes de bonne maturité sont l'augmentation de la filance (signe d'une bonne mucification) et l'absence de cellules lutéinisées (blanchâtres).

Les signes indirects en rapport avec la provenance de l'ovocyte (taille du follicule et contenu stéroïdien du liquide folliculaire) sont inutilisables en pratique.

##### • Maturation *in vitro* des ovocytes

Le prélèvement d'un ovocyte immature et la possibilité de lui faire parcourir *in vitro* l'ensemble des étapes de sa maturation nucléaire et cytoplasmique seraient une innovation très importante. Un des intérêts du diagnostic de la maturité des ovocytes serait de faire une maturation à la carte en fécondant immédiatement les ovocytes matures sans attendre qu'ils vieillissent et plus tard les ovocytes immatures. Les patientes ne seraient plus exposées aux traitements de stimulation et subiraient simplement une ponction folliculaire. Les ovocytes immatures ainsi collectés seraient cultivés *in vitro*. Mais leur maturation *in vitro* est-elle possible ?

La majorité des ovocytes sans globule polaire, donc en prophase I, font leur première division dès lors qu'ils sont *in vitro*. Ce phénomène est constaté dans l'espèce humaine comme dans beaucoup d'espèces de mammifères. Mais il n'est pas certain que la maturité cytoplasmique suive. Des ovocytes matures et des embryons ont été obtenus par certaines équipes mais les taux de succès restent très faibles [80]. Si les étapes de la maturation nucléaire semblent s'effectuer sans difficulté, c'est la maturation cytoplasmique qui est altérée et les connaissances sur les critères de qualité du cytoplasme sont pour l'instant pratiquement inexistantes.

#### Étape de fécondation

##### • Fécondation

La fécondation est le résultat d'une succession d'événements complexes qui assurent, grâce à la fusion de deux gamètes haploïdes (le spermatozoïde et l'ovocyte), la création d'un nouvel individu :

- la reconnaissance des gamètes ;
- la pénétration du spermatozoïde à travers la zone pellucide ;
- la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte ;
- la formation des deux pronucléi ;
- la syngamie.

- *Zygotes*

L'observation des zygotes peut avoir lieu 20 à 24 heures après l'insémination. Elle peut donner des renseignements utiles mais il y a souvent des faux positifs et des faux négatifs. L'intérêt de l'examen détaillé des zygotes est de vérifier la réalité de la fécondation et d'en détecter d'éventuelles anomalies. Le diagnostic de la fécondation ne peut être affirmé que sur l'observation des deux pronucléi. La présence de deux globules polaires ne suffit pas à assurer qu'il y a bien eu décondensation de la tête spermatique. Mais l'observation des deux pronucléi n'est réalisable qu'après décondensation complète, ce qui fait courir un risque de léser l'œuf ; l'absence de pronucléus n'est pas forcément signe de non-fécondation car ce stade est fugace et on peut se trouver en présence d'un œuf juste avant la formation des pronucléi ou juste après l'amphimixie ; la présence de deux pronucléi ne signifie pas que l'œuf est viable puisqu'en moyenne 10 % des œufs au stade de pronucléus n'iront pas plus loin.

Le taux de fécondation (pourcentage de zygotes par rapport au nombre d'ovocytes) est en moyenne de 59 %. Il varie en fonction des indications (65 % en cas de stérilité tubaire, 60 % dans les cas d'infécondité inexplicite, 55 % en cas d'hypofertilité masculine). Il varie aussi d'une tentative à l'autre en fonction de la qualité des ovocytes et de la qualité du sperme. Ces variations vont de 0 à 100 %, ce qui rend ininterprétable tout test de fécondance (visant à apprécier la fécondance des spermatozoïdes ou la fécondabilité des ovocytes) réalisé sur un petit nombre d'ovocytes. Au niveau national, et pour l'année 2000, le taux de fécondation était de 57,6 % pour les fécondations *in vitro* et de 62 % pour les ICSI.

### Manipulation des embryons

La fécondation est observée 18 à 22 heures après l'apparition des deux pronucléi ; 48 heures plus tard, c'est le stade quatre cellules qui est observé. L'examen des embryons se fait en principe 48 à 72 heures après l'insémination. Cet examen, outre l'intérêt théorique qu'il peut présenter, est très utile au choix des embryons à transférer. Les embryons sont comptabilisés, analysés et évalués en grades selon des paramètres essentiellement morphologiques indiquant leur qualité. Cette classification des embryons est basée sur la régularité des blastomères, leur nombre, la présence ou non de fragments cytoplasmiques. La qualité des embryons est un facteur pronostique important de leur chance d'implantation [43]. Ainsi, seuls les embryons considérés comme normaux seront choisis pour le transfert ou, si nécessaire, pour une congélation.

En fécondation *in vitro*, 42 à 48 heures après l'insémination *in vitro*, les embryons arrivent au stade de quatre blastomères dans 50 % des zygotes (taux de segmentation moyen), et le reste peut être réparti comme suit :

- 10 % des zygotes restent bloqués au stade de deux pronucléi ;
- 25 - 30 % au stade de deux blastomères ;
- 10 % au stade de cinq à huit blastomères.

Les zygotes présentant un rythme de clivage moindre ont un taux d'implantation également diminué. Au niveau national et pour l'année 2000, le nombre moyen d'embryons obtenus par tentative était de 4,94 pour les fécondations *in vitro* et de 4,7 pour les ICSI. Ce nombre peut varier de 0 à 29. Mais il faut choisir les embryons à transférer car il n'est pas possible de transférer simultanément plus de cinq embryons (dans certains cas il faut se limiter à trois) à cause du risque de grossesses multiples et, comme des ovocytes immatures peuvent donner des embryons, il serait utile d'essayer de les reconnaître afin de ne choisir pour un transfert immédiat que

ceux qui proviennent d'ovocytes matures. Le nombre moyen d'embryons par transfert en 2000 était de 2,28 en cas de fécondation *in vitro* et de 2,31 en cas d'ICSI, et tend à diminuer [41].

- *Appréciation qualitative*

Pour reconnaître les embryons viables, il n'y a pas de certitude possible, hormis les cas extrêmes, mais certains signes morphologiques peuvent avoir de la valeur. Deux méthodes, a posteriori, peuvent être utilisées pour les évaluer :

- comparer les critères morphologiques d'un lot d'embryons dont le transfert a donné une grossesse avec ceux d'un lot d'embryons dont le transfert n'a pas donné de grossesse. L'inconvénient de cette méthode est que, parmi les embryons du lot qui a donné des grossesses, tous les embryons transférés ne sont pas nidés ;

- évaluer les paramètres morphologiques d'embryons transférés qui ont tous donné une grossesse (transfert d'un seul embryon qui a abouti à une grossesse, transfert de deux embryons avec grossesse gémellaire, etc).

Il ressort de ces études que les meilleurs embryons sont le plus souvent :

- à quatre cellules, à j2, et huit cellules à j3 ;
- à blastomères égaux ;
- à blastomères réguliers ;
- à blastomères clairs (hyalins) ;
- dépourvus de cumulus compacté ;
- non fragmentés ;
- sans excédent.

- *Appréciation quantitative*

Sur une série de 1 000 tentatives, toutes indications confondues, après stimulation de l'ovulation par agoniste de la GnRH et hMG en protocole long, le taux de grossesses simples par transfert augmente avec le nombre d'embryons transférés. Le taux de grossesses multiples par transfert augmente de façon parallèle et atteint 15 % pour les transferts de quatre ou cinq embryons. Le taux de grossesses triples par transfert varie de 1,7 % pour les transferts de trois embryons à 5,8 % pour les transferts de cinq embryons. Le taux de grossesses quadruples est d'environ 1 % pour les transferts de quatre ou cinq embryons. La survenue des grossesses triples est corrélée avec certains paramètres [78] :

- qualité des embryons ;
- âge de la patiente ;
- rang de la tentative ;
- indication (risque plus élevé dans les indications masculines).

### ■ *Injection intracytoplasmique du spermatozoïde*

L'absence de fécondation, observée dans certaines stérilités masculines, est à l'origine du développement des techniques de fécondation assistée. Il s'agit d'assister le spermatozoïde à pénétrer la zone pellucide et donc de faciliter la fécondation. Depuis 1992, le succès de l'ICSI a révolutionné la prise en charge des stérilités masculines et le pronostic des insuffisances spermatiques sévères. En effet, il ne faut qu'un seul spermatozoïde par ovocyte, ce qui permet d'obtenir une grossesse en cas d'oligospermie sévère [74]. Des hommes considérés auparavant comme définitivement stériles peuvent maintenant avoir une descendance.

Autant la fécondation *in vitro* classique a complètement modifié le traitement de l'infertilité féminine d'origine tubaire, autant l'ICSI a bouleversé celui de la stérilité masculine puisque cette méthode s'adresse même à des patients azoospermiques dans l'éjaculat mais dont le testicule produit néanmoins quelques rares spermatozoïdes susceptibles d'être récupérés par biopsie et micro-injectés.

Actuellement, l'ICSI connaît un essor si rapide qu'elle occupe désormais une place essentielle parmi les techniques de fécondation

*in vitro*. Elle concernait 48,5 % des ponctions réalisées en France en 2000 sur plus de 80 centres biologiques qui la pratiquent. Les facteurs masculins sévères représentent l'indication majeure de l'ICSI, qu'il s'agisse d'atteinte portant sur l'un des paramètres du sperme (nombre de spermatozoïdes insuffisant, mobilité abaissée, pourcentage de formes atypiques trop élevé) ou sur les trois paramètres (oligo-astheno-terato-spermies sévères). Plus de 71 % des ICSI sont réalisées dans le cadre d'une infécondité masculine. Les autres indications sont probablement des indications après échec de la fécondation *in vitro* classique.

Dès le début, l'ICSI a été considérée comme une procédure à risque du fait qu'elle court-circuite la fécondation, c'est-à-dire du fait de son caractère plus invasif que la procédure de fécondation *in vitro* habituelle et parce que la fécondation peut être obtenue à partir de sperme qui aurait pu ne jamais être utilisé auparavant dans le traitement de l'infertilité. L'ICSI a alors soulevé beaucoup de craintes concernant les enfants ainsi conçus. Les partisans comme les opposants de l'ICSI ont exprimé un certain nombre d'éléments pouvant être liés à l'ICSI, risques qui peuvent relever de deux grandes catégories qui pourraient retentir sur l'embryon et le fœtus :

- problèmes liés à la technique elle-même : risque d'introduction de matériel étranger dans l'ovocyte lors de l'injection (toxine, virus, acide désoxyribonucléique [ADN], particules...), risque lié à l'introduction de la micropipette d'injection dans l'ovocyte (traumatisme ovocytaire causé par la perforation) ;
- problème de la transmission éventuelle des anomalies génétiques responsables de l'infertilité masculine, puisque l'ICSI contourne le processus de sélection naturelle et pourrait conduire à des situations à plus hauts risques [75].

Parmi celles-ci, les anomalies chromosomiques sont les plus fréquentes et imposent l'étude du caryotype des patients présentant une azoospermie ou une oligospermie non obstructive. Portant sur les risques de malformations et d'anomalies chromosomiques, ces craintes quant à la santé des enfants conçus par cette pratique ne semblent pas être fondées au vu des séries de plus en plus importantes qui sont publiées sur ce sujet [14, 16].

À ce jour, plus de 5 700 enfants sont nés en France par ICSI. Leur suivi ne montre pas d'élévation du taux d'anomalies congénitales. La Société européenne de reproduction humaine (ESHRE) a rapporté en 1996 et en 1998 l'activité des Centres de fécondation *in vitro* pratiquant l'ICSI et ne retrouve pas d'augmentation d'incidence des malformations et des anomalies chromosomiques. Les résultats de la cohorte initiale des 1 987 enfants du groupe de Bruxelles ont été publiés et ne révèlent pas un accroissement du risque de malformations congénitales majeures par rapport à la population générale [13]. Dans une cohorte danoise de 730 enfants ICSI, aucune augmentation des malformations majeures n'a été observée par rapport aux données de la population générale [60]. Un recueil épidémiologique de plus long terme est cependant nécessaire, car leur nombre est encore insuffisant pour avoir une étude significative. De plus, les enfants ne diffèrent pas de ceux conçus par fécondation *in vitro* classique, à l'exception du sex-ratio qui est abaissé.

### Préparation du sperme

Elle est identique à celle décrite ci-dessus, avec une sélection des spermatozoïdes mobiles et de morphologie normale sur le gradient de Pure Sperm®. Dans les oligo-astheno-terato-spermies sévères, le gradient est modifié pour obtenir un nombre convenable de spermatozoïdes. Le gradient de préparation est alors dans ces cas adapté : trois dilutions de Pure Sperm® sont préparées aux concentrations suivantes de 47,5 %, 60 % et 80 %. C'est cette dernière fraction qui sera récupérée puis lavée. Cette fraction 80 apporte des spermatozoïdes de moins bonne qualité (mobilité plus faible et atypique, tératospermie de plus en plus élevée). Le culot de spermatozoïdes obtenu est ensuite resuspendu dans un milieu de culture puis les spermatozoïdes sont incubés à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'au moment de l'injection.

### Préparation des ovocytes

Les ovocytes recueillis sont mis en milieu de culture (IVF®) et doivent ensuite subir une étape de décoronisation afin de débarrasser ceux-ci de toutes les cellules périovocytaires (cumulus oophorus et corona radiata). Pour cela, les ovocytes sont mis en contact avec une solution enzymatique à base de hyaluronidase. Cette enzyme va libérer les ponts hyaluroniques associant les cellules de la granulosa. Les cellules du cumulus sont ensuite retirées par simple action mécanique (aspiration-refoulement des ovocytes à l'aide d'une pipette). Les ovocytes décoronisés sont ensuite abondamment rincés par passages successifs dans de l'IVF® avant manipulation, c'est-à-dire micro-injection d'un spermatozoïde. L'observation au microscope permet alors de noter le stade de maturité ovocytaire. Seuls les ovocytes matures (métaphase II) ayant émis leur premier globule polaire seront micro-injectés.

### Technique de l'ICSI

Le matériel technique doit ensuite être installé ; chaque micromanipulateur permet de travailler en trois dimensions (de droite à gauche, de haut en bas et d'avant en arrière). Pour réaliser ces déplacements, deux sortes de *joysticks* de commande sont disponibles : l'un motorisé et l'autre manuel pour un déplacement plus précis, contrôlé par le manipulateur. Les *joysticks* sont reliés à des porte-pipette qui, pour une ICSI, sont de deux types :

- une pipette de contention à bord rodé pour maintenir l'ovocyte décoronisé ou nu sans léser la zone pellucide (diamètre extérieur de 100 µm) ;
- une pipette d'injection dont la pointe est biseautée (diamètre extérieur de 7 µm).

Dans une boîte de Pétri sont déposées autant de microgouttes (5 µL) de milieu de culture (ISM1®) que d'ovocytes et deux microgouttes de polyvinylpyrrolidone (PVP®). La première microgoutte de PVP® permettra le rinçage de la pipette d'injection et les spermatozoïdes seront déposés dans la deuxième microgoutte. Ceci a pour but d'isoler et de sélectionner quelques spermatozoïdes vivants qui auront migré à la périphérie de la microgoutte car ce composé possède une viscosité augmentée et va ainsi limiter le déplacement des spermatozoïdes. La boîte est recouverte d'huile de paraffine légère pour éviter la dessiccation des milieux puisque l'opération se déroule sur la platine chauffante à 37 °C du microscope inversé.

Un spermatozoïde vivant est aspiré dans la pipette d'injection après immobilisation. L'immobilisation du spermatozoïde candidat à l'injection est très importante car elle est le témoin d'une lésion des structures flagellaires facilitant ainsi la survenue de la fécondation (réaction de capacitation alors entamée).

L'ovocyte est ensuite maintenu par la micropipette de contention et placé dans le champ optique du microscope, de sorte que le globule polaire de l'ovocyte soit situé à 12 heures ou à 6 heures, afin d'éviter que la micropipette d'injection ne touche le fuseau de métaphase II. La micropipette d'injection est alors doucement introduite dans le cytoplasme de l'ovocyte du côté diamétralement opposé à la pipette de maintien afin d'y déposer le spermatozoïde, puis est délicatement retirée. Les ovocytes micro-injectés sont ensuite remis en milieu de culture à l'étuve à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>.

### ■ Congélation

La pratique de la congélation vise des objectifs différents suivant qu'elle concerne les gamètes, ovocytes et spermatozoïdes, ou les embryons, mais dans tous les cas, les principes des techniques cryobiologiques sont assez univoques, dans leurs grandes lignes. Dans le but d'éviter la formation de microcristaux qui pourraient provoquer des lésions intracellulaires, deux artifices techniques sont utilisés : les cryoprotecteurs (glycérol, propanediol) et la descente programmée en paliers de 37 °C à -196 °C.

### Spermatozoïdes

La congélation permet de réaliser des fécondations différées, soit pour utiliser du sperme de donneur (protection de l'anonymat et sécurité vis-à-vis du virus de l'immunodéficience humaine), soit qu'il s'agisse d'autoconservation, avant vasectomie ou traitement stérilisant.

La récupération de la mobilité initiale des spermatozoïdes est incomplète car 20 à 30 % des spermatozoïdes ne récupèrent pas leur mobilité. Cette perte est d'autant plus importante que la qualité du sperme est médiocre, ce qui diminue l'intérêt de la congélation des spermatozoïdes oligo-asthénospermiques.

Le pouvoir fécondant du sperme congelé-décongelé est conservé, qu'il soit utilisé en insémination artificielle ou en fécondation *in vitro*. Les résultats sont pratiquement les mêmes qu'avec l'utilisation de sperme frais, et le risque d'anomalie du développement embryonnaire n'est pas augmenté.

### Ovocytes

Si la congélation de sperme existe depuis près de 30 ans et a fait la preuve de son efficacité, la congélation ovocytaire reste encore imparfaite. La congélation des ovocytes pourrait permettre de constituer une banque en vue du don d'ovocytes et de l'autoconservation avant un traitement stérilisant. Elle permettrait également de procéder à des fécondations différées lorsque le nombre d'ovocytes recueillis est excessif (notamment par rapport à la qualité du sperme). Mais la récupération morphologique des ovocytes est mauvaise, inférieure à 50 %, du fait de la richesse en eau de ces cellules de gros volume, et la fécondabilité des ovocytes congelés-décongelés est réduite, inférieure à 25 %<sup>[26]</sup>. De nombreux ovocytes ne résistent donc pas aux processus de congélation-décongélation. De plus, le risque d'anomalies chromosomiques est important : aneuploïdie due au dysfonctionnement du fuseau de division de l'ovocyte mature (bloqué en métaphase II), polyspermie par défaut de réaction corticale. Le bon déroulement de la division cellulaire et de la réaction corticale de l'œuf suppose l'intégrité du cytosquelette microtubulaire. Or, celui-ci est précisément très vulnérable à basse température.

En conséquence, la congélation des ovocytes ne peut pas être pratiquée en routine et reste encore à l'état expérimental. Si la maturation *in vitro* avait été possible, on aurait pu envisager de congeler les ovocytes au stade immature, en prophase I, de façon à diminuer le risque d'anomalie chromosomique.

Si la congélation ovocytaire permet, imparfaitement, de conserver les gamètes féminins, les espérances menées sur la congélation du tissu ovarien visent aussi à conserver des follicules primordiaux en vue d'une greffe ultérieure<sup>[70]</sup>. Cette alternative est envisagée chez des femmes devant subir un traitement stérilisant, en effectuant une autogreffe après guérison de la maladie cancéreuse afin de préserver leurs chances de fécondité. Après les traitements stérilisants, si la patiente s'avère être infertile avec son ovaire résiduel, une autogreffe de son tissu ovarien congelé permettrait d'obtenir une grossesse. Il pourrait alors reprendre ses fonctions, assurant à la fois la production des gamètes mais aussi les sécrétions hormonales essentielles de l'ovaire. Actuellement, de nombreuses autoconservations sont rapportées et les indications sont en cours d'évaluation<sup>[68]</sup>.

### Embryons

L'intérêt principal de la congélation des embryons est de permettre un transfert différé d'une partie du lot d'embryons obtenus par fécondation *in vitro* afin de diminuer le risque de grossesse multiple<sup>[87]</sup>. En 2000, la congélation concernait 27,7 % des cycles de fécondation *in vitro* avec 3,85 embryons et 31,2 % des cycles en ICSI avec 3,5 embryons congelés. Depuis 1996, une augmentation des cycles avec congélation est observée et est certainement multifactorielle (diminution du nombre d'embryons transférés, augmentation du nombre d'embryons obtenus, modification de la politique de congélation). Après congélation-décongélation, la

récupération de la vitalité des embryons est incomplète. Environ 35 % des embryons subissent une destruction totale, et pour les autres, il peut y avoir perte d'un ou de plusieurs blastomères. Il est possible que les embryons les moins viables soient les plus fragiles et la congélation ferait alors une sorte de sélection, mais il se pourrait aussi que les blastomères en mitose soient les plus exposés. Le taux de nidation des embryons congelés-décongelés est diminué. Il est en moyenne de 5 % contre 10 à 15 % pour les embryons frais. En revanche, il est démontré que la congélation n'augmente pas la survenue d'anomalies congénitales.

## TRANSFERT EMBRYONNAIRE

### ■ Transfert transcervical

Les techniques de transfert embryonnaire convergent vers un seul but : rendre le passage de l'embryon vers la cavité utérine le moins traumatique possible. Est réalisé, au préalable, en consultation, un test de transfert avec les cathéters usuels, reproduisant ainsi les conditions du geste. Une pince de Pozzi peut être utilisée afin de redresser l'utérus ou un cathéter rigide qui peut faciliter le passage cervical. Si ce test s'avère impossible, il est renouvelé sous anesthésie générale. Lorsque le passage est rendu possible par l'anesthésie, on est en présence d'un simple spasme de l'orifice interne. Il faudra donc effectuer le transfert sous anesthésie générale ou sous sédation. Lorsque le passage reste impossible, une hystéroscopie est réalisée afin de rechercher<sup>[67]</sup> :

- une authentique sténose cervicale qui pourra être levée par une dilatation à la bougie de Hegar. Le test sera vérifié à nouveau avant le début de la stimulation. Certains ont proposé de réaliser cette dilatation le jour de la ponction ovocytaire mais ils ont obtenu des taux de grossesse par transfert médiocres ;
- une fausse route, source d'échec, qui sera évitée par échoguidage lors du transfert ;
- un polype intracervical.

Le transfert est réalisé le plus souvent dans une structure proche du laboratoire de fécondation *in vitro* afin d'éviter les manipulations et le transport de l'embryon (modification de température, de pH, contamination infectieuse). Après la pose du spéculum, les sécrétions vaginales et le mucus cervical sont soigneusement essuyés sans désinfection vaginale. Certains proposent d'aspirer à la seringue le mucus cervical afin d'éviter que les embryons ne soient retenus à son niveau. Le chargement du ou des embryons est réalisé par le biologiste. Le cathéter est rincé par du milieu de culture et relié à une seringue de 1 mL elle aussi purgée puis remplie avec 1 mL du milieu de culture. Son piston est ensuite poussé jusqu'à la butée de façon à créer une colonne liquidienne de la longueur du cathéter. Celle-ci est alors ramenée à 3 cm du bout du cathéter par un retrait du piston. Le ou les embryons choisis sont réunis dans une goutte de milieu de culture et l'ensemble est aspiré dans le cathéter. Cette microgoutte de 30 µL est placée à environ 2 cm de l'extrémité du cathéter. Pour fermer l'ensemble, une autre goutte de milieu de culture est aspirée et placée à l'extrémité du cathéter. Le cathéter ainsi chargé est introduit par le canal cervical jusque dans la cavité utérine et le dépôt des embryons se fait en poussant à fond le piston tout en évitant de toucher le fond utérin et de traumatiser la muqueuse endométriale. Le retrait progressif du cathéter est réalisé en maintenant la pression sur le piston ; toute dépression lors de ce geste est susceptible d'entraîner les embryons hors de la cavité utérine.

Enfin le cathéter est examiné à la loupe binoculaire. S'il existe un embryon résiduel, le chargement est refait et la manœuvre renouvelée. Si une goutte de milieu de culture perle au niveau du col après retrait du cathéter, elle aussi est prélevée et examinée. En effet, le renouvellement du passage ne semble pas altérer les taux de réussite contrairement à la perte embryonnaire lors du transfert<sup>[64]</sup>.

L'observation d'un décubitus strict après le geste est inutile et n'augmente pas le taux d'implantation<sup>[15]</sup>.

Le guidage échographique du transfert n'augmente les taux de grossesse qu'en cas de transfert difficile. Les taux d'implantation élevés sont associés aux transferts non compliqués. L'acte de transfert génère une stimulation mécanique de l'utérus à l'origine d'une augmentation de son activité contractile. Cette dernière affecte de façon péjorative les taux d'implantation en fécondation in vitro<sup>[37]</sup>. Une vessie pleine peut faciliter l'insertion du cathéter en alignant l'utérus sur le vagin dans le cas des utérus antéversés.

### ■ Complications

Elles sont rares :

- signes d'hyperactivité parasympathique ou de crise de tétanie se produisant lors du passage cervical. Ils sont évitables par une préparation de la patiente : explications du geste et administration d'une prémédication adéquate ;
- syndrome infectieux généralement lié à la réactivation d'un réservoir de germes déjà présent ;
- la fréquence des grossesses ectopiques est de 2 %. Le risque de grossesse extra-utérine est majoré si le transfert se fait dans le fond utérin (plutôt qu'au milieu de la cavité) ou si la quantité de liquide injectée avec l'embryon est importante<sup>[66]</sup>. Par ailleurs, la littérature fait état de grossesse intramurale, dans le ligament large ou rétropéritonéale secondaire à une perforation utérine lors du transfert.

### ■ Variantes et extensions de la technique de transfert

#### Transfert de gamètes intratubaire

Le transfert de zygotes intratubaire (ZIFT : *zygote intrafallopian transfer*) s'effectue sous contrôle cœlioscopique. L'embryon au stade de deux pronucléi est placé dans la trompe par l'ostium abdominal. L'indication est portée lorsque le transfert cervical est impossible et si les trompes sont normales.

#### Transfert d'embryons intratubaire

Le *tubal embryo transfer* (TET) est réalisé par cathétérisme de la partie proximale de la trompe sous contrôle échographique. Cependant, cette technique est responsable de douleurs pelviennes et de traumatisme de la muqueuse endométriale et tubaire.

#### Transfert transmyométrial

Le transfert transmyométrial est réalisé sous contrôle échographique et sous sédation. Un mandrin creux est introduit dans l'endomètre par voie transabdominale, transurétrale ou transvaginale dans lequel le cathéter chargé des embryons sera monté. Cette technique n'est réalisée que si le passage cervical est impossible et si les trompes sont obstruées sur leur portion distale.

## PHASE LUTÉALE

### ■ Physiopathologie

En fécondation in vitro, la phase lutéale doit être soutenue afin de ne pas réduire les chances de grossesses. Plusieurs mécanismes physiopathologiques laissent à craindre une anomalie de la phase lutéale après stimulation ovarienne et ponction folliculaire.

- Le risque de réduction de nombre de cellules de la granulosa (potentiel sécrétoire du corps jaune) après aspiration était vrai sur les cycles spontanés. Sur les cycles stimulés, même si ce risque persiste au moins en théorie, son effet devrait être compensé par le nombre de follicules recrutés par la stimulation ovarienne.
- L'hyperœstrogénie induite par la stimulation de l'ovulation est potentiellement lutéolytique.
- L'utilisation de cycles avec agonistes ou antagonistes de la GnRH supprime la LH endogène, indispensable au soutien du corps jaune.

– Les analyses histologiques de l'endomètre tendent à mettre en évidence des aspects d'hypermaturation qui pourraient être en rapport avec un excès relatif d'œstrogènes par rapport à la progestérone.

– La diminution de la contractilité utérine du fond vers le col utérin est plus lente dans les cycles stimulés en fécondation in vitro, probablement en raison des taux élevés d'œstradiol et de l'effet positif des œstrogènes sur la contractilité utérine<sup>[34]</sup>.

### ■ Soutien de la phase lutéale

#### Soutien par hCG

L'activité sécrétoire des corps jaunes peut être soutenue en intensité et en durée par l'injection itérative d'hCG à 1 500 UI le jour du transfert et 4 jours plus tard. Cependant, ces injections répétées d'hCG ne doivent pas être entreprises lorsque la réponse ovarienne est jugée forte afin de ne pas augmenter le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

#### Soutien par progestérone

Le soutien par administration exogène de progestérone apporte les bénéfices escomptés sur les taux d'implantation embryonnaire sans avoir les risques liés à l'hCG. Habituellement, l'administration par voie vaginale de 400 à 600 mg/j en deux ou trois prises est suffisante. Parmi les mécanismes impliqués dans l'amélioration des résultats, la réduction de la contractilité utérine est à prendre en compte<sup>[35]</sup>.

Cependant, si l'administration de progestérone semble moins risquée pour une efficacité équivalente à l'hCG, des questions sur le moment opportun pour débiter ce traitement et sur les modalités précises du traitement lui-même en termes de molécules, de voie d'administration et de durée de traitement restent à élucider.

## COMPLICATIONS DE LA FÉCONDATION IN VITRO

### ■ Syndrome d'hyperstimulation ovarienne

L'incidence du syndrome d'hyperstimulation ovarienne sévère concerne 0,5 à 2 % des patientes suivant un cycle de fécondation in vitro. Les troubles apparaissent en moyenne 6 jours après l'injection déclenchante d'hCG. La lutéinisation excessive des ovaires entraîne la production d'une substance encore inconnue, hCG-dépendante, responsable d'une cascade d'événements. Une augmentation de perméabilité capillaire survenant surtout au niveau des séreuses entraîne une fuite séreuse. Cette dernière est responsable d'une hypovolémie qui peut se compliquer d'une insuffisance rénale fonctionnelle, voire même organique (nécrose tubulaire aiguë), d'une augmentation de l'hormone antidiurétique et d'une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone<sup>[25]</sup>. Par ailleurs, il existe une production de prorénine et de rénine d'origine ovarienne. Ces modifications hormonales entraînent des troubles hydro-électrolytiques tels qu'une hyponatrémie de dilution et une hyperkaliémie. De plus, l'action conjointe de l'hémoconcentration et des perturbations œstrogénodépendantes de la crase sanguine peut favoriser la formation de thromboses artérielles et veineuses (surtout dans le territoire cave supérieur)<sup>[51]</sup>. Le syndrome régresse en général spontanément en 10 à 15 jours.

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne peut être d'apparition précoce et est le reflet de la réponse ovarienne à la stimulation. Il peut être plus tardif et associé à une grossesse débutante<sup>[61]</sup>. Les grossesses issues d'un traitement compliqué d'un syndrome d'hyperstimulation semblent être à haut risque obstétrical avec une majoration du risque d'avortement spontané précoce ou tardif, du risque d'hypertension artérielle gravidique, de diabète gestationnel<sup>[2]</sup>. Ces complications pourraient être en rapport avec le syndrome lui-même mais aussi avec un terrain à risque thromboembolique.

L'Organisation Mondiale de la Santé décrit trois types d'hyperstimulation ovarienne :

- légère : inconfort pelvien, gros ovaires kystiques ;
- moyenne : troubles digestifs ;
- sévère : épanchements séreux, troubles hydroélectrolytiques, accidents thromboemboliques.

La classification en cinq grades paraît plus précise [45] :

- hyperstimulation ovarienne minime :
  - grade 1 : distension abdominale et gêne ;
  - grade 2 : grade 1 plus nausées, vomissements, plus ou moins diarrhée ;
- hyperstimulation ovarienne modérée :
  - grade 3 : grade 2 plus ascite échographique ;
- hyperstimulation ovarienne sévère :
  - grade 4 : grade 3 plus ascite clinique et/ou épanchement pleural ou dyspnée ;
  - grade 5 : hémocoagulation, anomalies de la coagulation, anomalies de la fonction rénale.

Le traitement est symptomatique : repos strict, correction des troubles hydroélectrolytiques, restauration d'une volémie efficace et administration d'antalgiques. Une anticoagulation préventive est recommandée s'il existe des facteurs de risques, notamment des antécédents thromboemboliques ou un déficit en protéine C ou S ou lorsqu'une hyperstimulation sévère apparaît. L'utilisation de diurétiques est déconseillée car susceptible d'aggraver l'hypovolémie. Parfois, une dialyse temporaire est nécessaire. La ponction des épanchements n'est effectuée que lorsqu'il existe une gêne fonctionnelle.

La prévention de ce syndrome passe avant tout par la reconnaissance de groupe à risque. C'est le cas du syndrome des ovaires micropolykystiques et des patientes jeunes hyper-répondeuses chez qui l'on adapte les doses de gonadotrophines lors de la stimulation et où on évite la répétition des injections d'hCG lors du soutien de phase lutéale au profit de la progestérone micronisée. La possibilité d'hyperstimulation ovarienne est suspectée devant des taux sériques d'œstradiol élevés dont le niveau-seuil est variable selon les équipes, et un recrutement folliculaire échographique important. La recherche de marqueurs précoces sériques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est en cours [3]. S'il existe un risque d'hyperstimulation ovarienne, une mesure radicale consiste à annuler le cycle et à ne pas injecter d'hCG. D'autres mesures préventives peuvent être proposées. C'est le cas de l'aspiration précoce (10 à 12 heures après l'administration d'hCG) des follicules d'un seul ovaire. Elle ne modifie pas les taux de grossesses menées à terme et diminue la sévérité de l'hyperstimulation ovarienne mais sans avoir de véritable influence sur son incidence [32]. Quant à la cryopréservation embryonnaire associée à un transfert différé, elle modifie peu le risque d'hyperstimulation ovarienne mais fait chuter les taux de grossesse par rapport aux transferts d'embryons frais [39]. L'administration préventive d'albumine le jour de la ponction est controversée. Enfin, le *coasting* ou *drifting* consiste à continuer d'administrer l'agoniste de la GnRH sans gonadotrophines et à repousser l'administration d'hCG jusqu'à l'obtention de taux sériques d'œstradiol suffisamment bas, ces derniers étant définis par chaque centre. Une atresie folliculaire contrôlée est ainsi provoquée. Cette technique permet de diminuer la sévérité de l'hyperstimulation ovarienne sans la supprimer complètement (environ 7 % résiduel).

### ■ Risques carcinologiques

Parmi les complications à moyen ou long terme des traitements inducteurs de l'ovulation, des interrogations subsistent en ce qui concerne leur potentiel carcinogène. Les cancers de l'ovaire et du sein ont été les plus étudiés, mais plusieurs études restent controversées sur le plan méthodologique. À ce jour, aucune étude n'a mis en évidence un lien direct entre le traitement de l'infertilité et le cancer du sein, en sachant que les patientes infertiles représentent à elles seules un groupe à risque identifié.

Parmi les patientes infertiles, le risque relatif de développer un cancer de l'ovaire chez celles ayant pris du citrate de clomifène est de 3,1 contre 1,4 chez celles qui n'en ont pas pris [79]. Il existe une relation entre la durée de prescription et le risque. En effet, le risque relatif est de 0,8 lorsque l'exposition est de moins de 12 mois contre 11,1 si elle dépasse 12 mois. L'augmentation de fréquence porte essentiellement sur les tumeurs *borderline*.

Concernant l'exposition aux gonadotrophines, bien que certaines études prospectives aient rapporté une augmentation de l'incidence des tumeurs de l'épithélium ovarien, aucune relation n'a été clairement établie.

En ce qui concerne les enfants issus des techniques de fécondation *in vitro*, quelques cas de tumeurs ont été décrits. Mais le rôle de la fécondation *in vitro* sur la carcinogenèse pédiatrique reste à démontrer [88].

### ■ Autres complications

La stimulation ovarienne peut être à l'origine d'effets indésirables dont certains peuvent se compliquer. Les kystes ovariens surviennent soit après l'injection d'agoniste de la GnRH, soit en cours de stimulation. Selon leur nombre et leur volume, ces kystes peuvent gêner le monitoring de l'ovulation et demandent parfois à être ponctionnés. Cependant, le pronostic global du cycle lié à leur présence reste controversé [81].

Des métrorragies minimales peuvent survenir après l'injection de l'agoniste de la GnRH. Généralement spontanément résolutives, elles nécessitent de prolonger la phase de désensibilisation. Si elles persistent, la stimulation de l'ovulation doit être différée pour explorer la cavité utérine.

La torsion des annexes est un risque lié à l'augmentation de volume des ovaires. Celle-ci peut survenir à tout moment, parfois durant la grossesse. Le doppler ovarien est utile au diagnostic. Elle nécessite une exploration coelochirurgicale urgente pour détorsion afin de ne pas avoir à réaliser une annexectomie.

La stimulation de l'ovulation entraîne un état d'hypercoagulabilité qui peut se compliquer de thromboses, siégeant souvent à la partie supérieure du corps [11]. Ce phénomène est marqué en présence d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

La stimulation entraîne une prise de poids d'environ 250 g/cycle, sous la forme d'œdèmes.

Les FSH recombinants et les antagonistes de la GnRH peuvent entraîner des réactions locales aux points d'injection comme des brûlures, douleur, rougeur, œdème ou prurit [73].

Sur un autre registre, le fait d'être infertile, l'angoisse de la réussite et la complexité des traitements de fécondation *in vitro* engendrent du stress chez les couples [12]. Ce stress se majore si le résultat du test de grossesse est négatif. Le soutien psychologique doit préparer les couples plus à l'échec qu'au succès.

Enfin, le risque de ménopause précoce après traitement de l'infertilité par fécondation *in vitro* n'a jamais été démontré à ce jour.

## Références

- [1] Abdalla HI, Baber RJ, Leonard T, Kirkland A, Mitchell A, Power M et al. Time oocyte collection in an assisted conception programme using GnRH analogue. *Hum Reprod* 1989; 4 : 927-930
- [2] Abramov Y, Elchalal U, Schenker JG. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies complicated by severe ovarian hyperstimulation syndrome: a multicenter study. *Fertil Steril* 1998; 70 : 1070-1076
- [3] Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne L et al. Serum vascular endothelial growth factor concentration in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1999; 71 : 287-293
- [4] Albano C, Smitz J, Camus M, Riethmuller-Winzen H, Siebert-Weigel M, Diedrich K et al. Hormonal profile during the follicular phase in cycles stimulated with combination of human menopausal gonadotropin (hMG) and gonadotropin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix). *Hum Reprod* 1996; 11 : 2114-2118
- [5] Albano C, Smitz J, Tournaye H, Riethmuller-Winzen H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Luteal phase and clinical outcome after human menopausal gonadotropin/gonadotropin releasing hormone antagonist treatment for ovarian stimulation in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1999; 14 : 1426-1430
- [6] Anonymous. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). The Ganirelix dose-finding group. *Hum Reprod* 1998; 13 : 3023-3031
- [7] Barbieri RL, Hornstein MD. Assisted reproduction-in vitro fertilization success is improved by ovarian stimulation with exogenous gonadotropins and pituitary suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues. *Endocr Rev* 1999; 20 : 249-252
- [8] Bassil S, Godin PA, Donnez J. Outcome of in-vitro fertilization through natural cycles in poor responders. *Hum Reprod* 1999; 14 : 1262-1265
- [9] Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L et al. Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Gonal-F®) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP®): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 1997; 12 : 2133-2139
- [10] Bider D, Blankstein J, Levron J, Tur-Kaspa I. Gonadotropins and glucocorticoid therapy for "low-responders": a controlled study. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14 : 328-331
- [11] Biron C, Galtier-Dereure F, Rabesandranata H, Bernard I, Aguilar-Martinez P, Schved JF et al. Hemostasis parameters during ovarian stimulation for in vitro fertilization : results of a prospective study. *Fertil Steril* 1997; 67 : 104-109
- [12] Boivin J, Takefman JE. Stress level across stages in vitro fertilization in subsequently pregnant and nonpregnant women. *Fertil Steril* 1995; 64 : 802-810
- [13] Bonduelle M, Aytöz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13 : 781-782
- [14] Bonduelle M, Wilkens A, Buysse A, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem AC et al. A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13 : 196-207
- [15] Botta G, Grudzinskas G. Is prolonged bed resting following embryo transfer useful? *Hum Reprod* 1997; 12 : 2489-2492
- [16] Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998; 351 : 1529-1534
- [17] Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102 : 767-772
- [18] Claman P, Domingo M, Garner P, Leader A, Spence JE. Natural cycle in vitro fertilization embryo transfer at the University of Ottawa: an inefficient therapy for tubal infertility. *Fertil Steril* 1993; 60 : 298-302
- [19] Cosson M, Coffinet F, Gollfier F, Lansac J, Marret H. Recommandations pour la pratique: le kyste de l'ovaire. *J Gynecol Obstét Biol Reprod* 2001; 30 (suppl 4) : 457-45112
- [20] Cravello L, Porcu G, D'Ercole C, Roger V, Blanc B. Identification and treatment of endometriosis. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25 : 585-586
- [21] Dada T, Salha O, Baillie HS, Sharma V. A comparison of three gonadotropin-releasing hormone analogues in an in-vitro fertilization programme: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1999; 14 : 288-293
- [22] Daya S, Gunby J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999; 14 : 2207-2215
- [23] De Boer JA, Van Der Meer M, Van Der Veen EA, Schoemaker J. Growth hormone (GH) substitution in hypogonadotropic, GH-deficient women decreases the follicle-stimulating hormone threshold for monofollicular growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 : 590-595
- [24] Dechaud H, Anahory T, Aligier N, Arnal F, Humeau C, Hedon B. Coasting for the management of an excessive response to ovarian hyperstimulation. *Gynecol Obstet Fertil* 2000; 28 : 115-119
- [25] Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Camus M, De Maertelaer V, Englert Y. Prorenin and active renin concentrations in plasma and ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1997; 12 : 236-240
- [26] Demirci B, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryoconservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001; 75 : 754-762
- [27] Devroey P, Mannaerts B, Smitz J, Coelingh Bennink H, Van Steirteghem A. Clinical outcome of a pilot study on recombinant human follicle-stimulating hormone (Org 32489) combined with various gonadotropin releasing hormone agonist regimens. *Hum Reprod* 1994; 9 : 1064-1069
- [28] Dimitry ES, Oskarsson T, Conaghan J, Margara R, Winston RM. Beneficial effects of a 24 hours delay in human chorionic gonadotropin administration during in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum Reprod* 1991; 6 : 944-946
- [29] Dittkoff EC, Plumb J, Selick A, Sauer MV. Anesthesia practices in the United States common to in vitro fertilization (IVF) centers. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14 : 145-147
- [30] Driscoll GL, Tyler JP, Knight DC, Cooke S, Kime L, Clark L et al. Failure to collect oocytes in assisted reproductive technology: a retrospective. *Hum Reprod* 1998; 13 : 84-87
- [31] Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, Niebch G et al. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod* 1998; 13 : 2392-2398
- [32] Egbase PE, Sharhan MA, Grudzinskas JG. Early unilateral follicular aspiration compared with coasting for prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomised study. *Hum Reprod* 1999; 14 : 1421-1425
- [33] El-Nerm A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower AM, Grudzinskas JG. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1998; 13 : 2192-2198
- [34] Epiney M, Chardonnens D, Ayoubi JM, Fanchin R, Campana A, De Ziegler D. Changes in uterine contractility after ovulation: differences between menstrual and IVF cycles. *Fertil Steril* 2000; 74 (suppl) : 530
- [35] Fanchin R, Righini C, De Ziegler D, Olivennes F, Ledee N, Frydman R. Effects of transvaginal progesterone on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001; 75 : 1136-1140
- [36] Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Ferreira AL, De Ziegler D, Frydman R. Consequences of premature progesterone elevation on the outcome of in vitro fertilization : insights into a controversy. *Fertil Steril* 1997; 68 : 799-805
- [37] Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, De Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13 : 1968-1974
- [38] Feldberg D, Farhi J, Ashkenazi J, Dicker D, Shalev J, Ben-Rafael Z. Minidose gonadotropin-releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1994; 62 : 343-346
- [39] Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli C, Fortini D, Selman HA, Feliciani E. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Hum Reprod* 1999; 14 : 1457-1460
- [40] Fluker MR, Hooper WM, Yuzpe AA. Withholding gonadotropins (coasting) to minimize the risk of ovarian hyperstimulation during superovulation and in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1999; 71 : 294-301
- [41] Gerris J, van Royen E. Avoiding multiple pregnancies in ART: a plea for single embryo transfer. *Hum Reprod* 2000; 15 : 1884-1888
- [42] Gindoff PR, Hall JL, Nelson LM, Stillman RJ. Efficacy of assisted reproductive technology during diagnostic and operative infertility laparoscopy. *Obstet Gynecol* 1990; 75 : 299-301
- [43] Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J et al. Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10 : 2427-2431
- [44] Givens CR, Schriock ED, Dandekar PV, Martin MC. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration do not predict outcome in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril* 1994; 62 : 1011-1017
- [45] Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv* 1989; 44 : 430-440
- [46] Govaerts I, Devreker F, Delbaere A, Revelard P, Englert Y. Short-term medical complications of 1 500 oocyte retrievals for in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 77 : 239-243
- [47] Grudzinskas JG, Egbase PE. Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: novel strategies. *Hum Reprod* 1998; 13 : 2051-2053
- [48] Guerin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinat MC, Bouliou D. Improvement of survival and fertilizing-capacity of human spermatozoa in an IVF program by selection on discontinuous percoll gradients. *Hum Reprod* 1989; 4 : 798-804
- [49] Hedon B, Benos P, Dechaud H, Lefebvre P, Rousseau O, Bringer J et al. Les agonistes de la GnRH en gynécologie. *Encycl Méd Chir* (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), 85-A-30, Gynécologie, 1995 : 1-8
- [50] Hedon B, Out HJ, Hughes JN, Camier B, Cohen J, Lopez P et al. Efficacy and safety of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®) in infertile women pituitary-suppressed with triptorelin undergoing in-vitro fertilization: a prospective, randomized, assessor-blind, multicentre trial. *Hum Reprod* 1995; 10 : 3102-3106
- [51] Hocke C, Guyon F, Dulucq MC, Grenier N, Papaxanthos A, Leng JJ. Accidents thrombo-emboliques et hyperstimulation ovarienne. *J Gynecol Obstét Biol Reprod* 1995; 24 : 691-696
- [52] Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van Der Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin releasing hormone agonists to in vitro fertilization and gamete intrafallopian tube transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 1992; 58 : 888-896
- [53] Hurd WW, Randolph JF, Christmann GM, Ansbacher R, Menge AC, Gell JS. Luteal support with both estradiol and progesterone after clomiphene citrate stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66 : 587-592
- [54] Inaudi P, Germond M, Senn A, De Grandi P. Timing of hCG administration in cycles stimulated for in vitro fertilization: specific impact of heterogeneous follicle sizes and steroid concentrations in plasma and follicle fluid on decision procedures. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9 : 201-208
- [55] Itskovitz J, Boldes R, Levron J, Erlik Y, Kahana L, Brandes JM. Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1991; 56 : 213-220
- [56] Karande VC, Jones GS, Veek LL, Muasher SJ. High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low-responder patients. *Fertil Steril* 1990; 53 : 486-489
- [57] Kol S, Lightman A, Hillensjo T, Devroey P, Fauser B, Tarlatzis B et al. High doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist in in-vitro fertilization cycles do not adversely affect the outcome of subsequent freeze-thaw cycles. *Hum Reprod* 1999; 14 : 2242-2244
- [58] Lambert A, Talbot JA, Anobile CJ, Robertson WR. Gonadotropin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Mol Hum Reprod* 1998; 4 : 619-629
- [59] Lindheim SR, Cohen MA, Chang PL, Sauer MV. Serum progesterone before and after human chorionic gonadotropin injection depends on the estradiol response to ovarian hyperstimulation during in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16 : 242-246
- [60] Loft A, Petersen K, Erb K, Mikkelsen AL, Grinstead J, Hald F et al. Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum Reprod* 1999; 14 : 2143-2148

- [61] Lyons CA, Wheeler CA, Frishman GN, Hackett R, Seifer DB, Haning RV Jr. Early and late presentation of ovarian hyperstimulation syndrome: two distinct entities with different risk factors. *Hum Reprod* 1994; 9 : 792-799
- [62] McDougall MJ, Tan SL, Hall SV, Balen A, Mason BA, Jacobs HJ. Comparison of natural with clomiphene citrate stimulated cycles in in vitro fertilization: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 1994; 61 : 1052-1057
- [63] Murad NM. Ultrasound or ultrasound and hormonal determination for in vitro fertilization monitoring. *Int J Gynecol Obstet* 1998; 63 : 271-276
- [64] Nabi A, Awonuga A, Birch H, Barlow S, Stewart B. Multiple attempts at embryo transfer: does this affect in-vitro fertilization treatment outcome? *Hum Reprod* 1997; 12 : 1188-1190
- [65] Nakagawa K, Yamano S, Senuma M, Myogo K, Yamazaki J, Aono T. Avoidance of oocyte retrieval on the week end through the use of scheduled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1997; 68 : 787-790
- [66] Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 60 : 919-921
- [67] Noyes N, Licciardi F, Grifo J, Krey L, Berkeley A. In vitro fertilization outcome relative to embryo transfer difficulty: a novel approach to the forbidding cervix. *Fertil Steril* 1999; 72 : 261-265
- [68] Nugent D, Meirou D, Brook PF, Aubard Y, Godsen RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997; 3 : 267-280
- [69] Oehninger S, Kruger TF, Simon T, Jones D, Mayer J, Lanzendorf S et al. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11 : 1086-1089
- [70] Oktay K, Kartikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 342 : 1919
- [71] Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod* 1998; 13 : 2411-2414
- [72] Out HJ, Mannaerts BM, Driessens SG, Coelingh Bennink HJ. Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. *Hum Reprod Update* 1996; 2 : 162-171
- [73] Out HJ, Reinitz PE, Coelingh Bennink HJ. A prospective, randomized study to assess the tolerance and efficacy of intramuscular and subcutaneous administration of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Fertil Steril* 1996; 67 : 278-283
- [74] Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992; 340 : 17-18
- [75] Patrizio P. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod* 1995; 10 : 2520-2530
- [76] Pellicer A, Diamond MP, De Cherney AH. Evaluation of stimulated cycles with multiple follicular development but low oocyte retrieval. *Int J Fertil* 1989; 34 : 37-41
- [77] Quintans CJ, Donaldson MJ, Blanco LA, Pasqualini RS. Empty follicle syndrome due to human errors: its occurrence in an in vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1998; 13 : 2703-2705
- [78] Roseboom TJ, Vermeiden JPW, Schoute E, Lens JW, Schats R. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Hum Reprod* 1995; 10 : 3035-3041
- [79] Rossing MA, Daling J, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994; 331 : 771-776
- [80] Russell JB. Immature oocyte retrieval with in vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11 : 289-296
- [81] Segal S, Shifren JL, Isaacson KB, Leykin L, Chang Y, Pal L et al. Effect of baseline ovarian cyst on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. *Fertil Steril* 1999; 71 : 274-277
- [82] Sher G, Herbert C, Maassarani G, Jacob MH. Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Hum Reprod* 1991; 6 : 232-235
- [83] Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Baltimore : Williams and Wilkins, 1994
- [84] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2 : 366-367
- [85] Tan SL, Balen A, Hussein E, Mills C, Campbell S, Yovich J et al. A prospective, randomized study of the optimum timing of human chorionic gonadotropin administration after pituitary desensitization in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 57 : 1259-1264
- [86] Tanbo T, Dale PO, Kjekshus E, Hang E, Abyholm T. Stimulation with human menopausal gonadotropin versus follicle-stimulating hormone after pituitary suppression in polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1990; 53 : 798-803
- [87] Tiitinen A, Halttunen M, Harkki P, Vuoristo P, Hyden-Granskog C. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16 : 1140-1144
- [88] Toren A, Rechavi G, Ramont B. Pediatric cancer: environmental and genetic aspects. *Pediatr Hematol Oncol* 1996; 13 : 319-331
- [89] Waldenström U, Kahn J, Marks L, Nilsson S. High pregnancy rates and successful prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome by "prolonged coasting" of very hyperstimulated patients: a multicentre study. *Hum Reprod* 1999; 14 : 294-297
- [90] Zorn JR, Boyer P, Guichard A. Never on a Sunday: programming for IVF-ET and GIFT. *Lancet* 1987; 1 : 385-386