

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur B. Blanc*

**Extrait des
Mises à jour
en Gynécologie
et Obstétrique**

—
**TOME XXVI
publié le 28.11.2002**



*VINGT-SIXIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2002*

Le diagnostic pré-implantatoire : de la théorie à la pratique

C. RONGIERES¹, C. MOUTOU², C. WITTEMER², J. OHL¹,
K. BETTAHAR¹, P. GERLINGER², I. NISAND¹, S. VIVILLE²
(Strasbourg)

INTRODUCTION

La fécondation in vitro (FIV), qui généralement permet l'obtention de plusieurs embryons, couplée aux techniques plus récentes de la biologie moléculaire, permet de proposer aux couples à risque de transmettre une maladie génétique d'établir le statut génétique des embryons obtenus in vitro et de ne transférer que les embryons sains ou porteurs sains. Une telle analyse constitue le diagnostic pré-implantatoire (DPI) (Handyside A et al., 1990).

Cette alternative au diagnostic anténatal (DAN) offre aux couples la possibilité de débiter une grossesse sans craindre d'être confrontés à la difficile décision d'interrompre ou non une grossesse dont le fœtus serait diagnostiqué comme atteint par des méthodes plus conventionnelles telles que l'amniocentèse ou la choriocentèse.

1. Centre d'AMP, Centre Médico-Chirurgical et Obstétrical Schiltigheim
CMCO - 19 rue Louis Pasteur - 67300 SCHILTIGHEIM
2. Laboratoire de Biologie de la Reproduction Faculté de Strasbourg

LE DPI EN FRANCE

Le DPI a soulevé, particulièrement en France, un intense débat quant aux possibles dérives eugéniques qu'il implique. Afin d'éviter ces dérives, la France s'est dotée d'une loi très stricte encadrant cette activité. Il s'agit de la loi n°94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal, dite de « Bioéthique ». Fait particulier, la France est le seul pays à s'être doté d'une loi spécifique concernant le DPI, et ceci avant que ne débute la pratique du DPI. En effet, dans les autres pays européens pratiquant le DPI soit il existe une législation, mais elle concerne la recherche sur l'embryon humain et le DPI est alors assimilé à de la recherche – c'est le cas de l'Angleterre et de l'Espagne –, soit il n'y a pas de législation – c'est le cas de la Belgique, des Pays-Bas. L'Italie à l'heure actuelle est en cours d'élaboration d'une loi qui non seulement interdirait le DPI mais rendrait la pratique de la FIV difficile voire impossible. En ce qui concerne la Belgique et les Pays-Bas, une législation est en cours d'élaboration également, mais, là aussi, elle concerne la recherche sur l'embryon humain.

La loi française stipule dans son article L.162-17 que « le diagnostic biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro n'est autorisé qu'à titre exceptionnel dans les conditions suivantes :

« Un médecin exerçant son activité dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire tel que défini par l'article L. 162-16 doit attester que le couple, du fait de sa situation familiale, **a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité, reconnue comme incurable au moment du diagnostic.** »

Le diagnostic ne peut être effectué que lorsque a été préalablement et précisément identifiée, chez l'un des parents, l'anomalie ou les anomalies responsable(s) d'une telle maladie. Les deux membres du couple expriment par écrit leur consentement à la réalisation du diagnostic et le diagnostic ne peut avoir d'autre objet que de rechercher cette affection ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter.

« Il ne peut être réalisé que dans un établissement spécifiquement autorisé à cet effet après avis de la Commission Nationale de Médecine et de Biologie de la Reproduction et du Diagnostic Prénatal et dans les conditions définies par décret en Conseil d'État ».

En France, trois centres sont autorisés à la pratique du DPI :

– Un centre parisien constitué d'une association entre le centre de génétique de l'hôpital Necker-Enfants malades (Pr Wekemans, Pr A.Munnich, Dr P.Ray) et le centre de biologie de la reproduction de l'hôpital Béclère (Pr R.Frydman, Dr N. Frydman, Dr S. Romana) ;

– Un centre strasbourgeois comportant le service de biologie de la reproduction et le centre d'AMP du CHU de Strasbourg. (Dr S.Viville, Dr C.Rongières, Dr J. Ohl, Dr K.Bettahar, Dr C.Witteimer, Pr P. Gerlinger, Pr I. Nisand) ;

– Un centre montpelliérain avec le service de biologie de la reproduction de l'hôpital Arnaud de Villeneuve à Montpellier, le centre d'AMP (Pr C.Humeau, Dr F.Arnal, Dr H.Déchaud, Pr Hédon) et le service de génétique (Dr M.Claustre, Dr A.Girardet, Dr Blanchet, Dr P Sarda).

Pour éviter toute suspicion de dérive eugénique, il a été créé en 1997, au sein de l'*European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), un consortium européen du DPI (*ESHRE PGD consortium* ; site Web : www.eshre.com).

Parmi les objectifs que nous nous sommes fixés, le premier est de rendre aussi transparente que possible notre activité en assurant le suivi de la pratique du DPI en Europe. Les données ainsi collectées sont publiées annuellement dans la revue *Human Reproduction*. Les derniers résultats ont été publiés en janvier 2002 incluant tous les cycles depuis 1999 (*ESHRE PGD consortium Steering Committee 2002*) (2). 1561 cycles ont ainsi été colligés, provenant de 25 centres par accumulation de trois années d'expérience (1999, 2000, 2001). Sur l'année 2001, de 426 ponctions ovocytaires, 349 transferts d'embryons ont pu être effectués qui ont abouti à 81 grossesses (19 % par ponction ovocytaire et 23 % par transfert).

Dans le même ordre d'idées, dès leur autorisation publiée, les trois centres français ont décidé de s'associer pour créer le groupe d'étude et de travail sur le DPI ou GET-DPI (Viville S., 2001) (22). Là aussi, l'objectif principal est de coordonner notre activité et de la rendre publique.

Une plaquette commune pour les patientes et les médecins devrait sortir prochainement.

POPULATION CONCERNÉE ET DISTRIBUTION DES PATHOLOGIES

La moitié des couples rencontrés ont déjà une histoire obstétricale dramatique avec soit un enfant atteint vivant ou décédé, soit une ou plusieurs expériences d'interruption médicale de grossesse (IMG). Le diagnostic s'est fait la plupart du temps à l'occasion de ces grossesses. Maintenant que le DPI est autorisé en France, les couples qui se savent à risque de transmettre une affection sont dirigés et/ou demandeurs de DPI d'emblée sans tentative naturelle préalable. Pour un certain nombre d'entre eux, le recours à l'IMG est impossible par principe ou par rapport à un enfant atteint vivant dans la famille. Certaines pathologies à déclaration tardive comme la maladie de Huntington ou la polypose rectocolique familiale (PRF) amènent les couples à demander un DPI, qui leur paraît plus acceptable qu'un DPN. Le vécu de ces familles par rapport à ces pathologies lourdes est terrible. La déclaration de la maladie de Huntington chez l'un des parents, la question pour cette fille ou ce fils d'être porteur ou non de la mutation génétique provoquent une angoisse et un malaise difficilement surmontables. De même dans le cadre de la polypose rectocolique familiale, c'est au vécu du patient lui-même que se fait la référence, les interventions digestives à un âge jeune, les décès précoces de personnes de la famille et l'incertitude de la date d'apparition des symptômes d'un enfant à venir sont autant d'arguments pour une prise en charge en DPI.

Une partie des couples présente une infertilité, si le recours au DPI n'était pas évident dans un premier temps, il leur paraît alors concevable dans le cadre d'une AMP qui devient nécessaire.

En Europe, deux autres indications sont très présentes. La recherche d'aneuploïdies chez des patientes de plus de 37 ans et qui effectuent des cycles de FIV/ICSI. Cette indication a pour but d'éliminer les aneuploïdies dues à l'âge et d'éviter ainsi l'obtention d'une grossesse dans de difficiles conditions, puis l'IMG du fait d'une anomalie de nombre ou de structure des chromosomes, bien connue dans la population de ces patientes. Sur les 1561 cycles effectués en Europe en 3 ans, cette indication est représentée pour 799 cycles soit la moitié des indications de DPI. Elle est strictement interdite en France puisqu'elle n'entre pas dans le cadre législatif indiquant clairement que l'anomalie doit être caractérisée chez l'un des parents. De plus, plusieurs pathologies sont recherchées en même temps ce qui est actuellement non compatible avec le cadre stricto sensu du DPI en France.

L'autre indication est très discutée et discutable au sein même de la communauté européenne, il s'agit du DPI pour « *social sexing* » ou harmonisation de la famille. Le but est de ne replacer que des embryons de sexe non représenté dans la famille. Cette indication est également interdite en France et il est facile d'imaginer la dérive qu'elle pourrait apporter dans certains pays comme l'Inde ou la Chine. Le GET-DPI y est fortement opposé et l'a clairement exprimé dans une lettre publiée dans *Human Reproduction* par la voix de Pierre Ray (2002) (14).

Enfin, le tri des embryons dans le cadre d'une compatibilité HLA pour traiter un frère ou une sœur malade, dans l'urgence ou en prévention d'une rechute, n'est pas représenté en Europe, officiellement en tous cas. Un débat éthique autour de ce sujet est en cours. Le Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE) vient d'émettre un avis à ce sujet. (Site Web : www.ccne-ethique.fr).

LES INDICATIONS DU DPI EN FRANCE ET LES NOUVEAUX DIAGNOSTICS

Après biopsie d'au mieux deux blastomères, deux techniques de diagnostic d'anomalies sont possibles. La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et la *Fluorescence In Situ Hybridation* (FISH) (Griffin et al. 1993) (4). La PCR permet d'identifier des mutations, elle est utilisée aussi bien pour des pathologies récessives que dominantes. Une des limites de cette technique vient de l'impossibilité, pour le moment, de caractériser de façon fiable plus d'une mutation à la fois. Ceci signifie que lorsqu'un diagnostic est disponible, il l'est pour une des mutations responsables du syndrome et non pour le syndrome. Sachant que de multiples mutations peuvent être responsables d'un même syndrome (plus de 1000 pour la mucoviscidose) et qu'il faut 6 mois à un an de mise au point pour chaque diagnostic, on comprend mieux pourquoi si peu de diagnostics sont disponibles. La deuxième grande limite de la PCR vient de la nécessité non seulement d'avoir caractérisé le gène lié à la pathologie, mais aussi la ou les mutations impliquées dans le syndrome.

La FISH quant à elle permet de déterminer partiellement le contenu chromosomique d'un noyau. Elle fut initialement développée comme alternative à la PCR pour déterminer le sexe des embryons. En effet, elle est techniquement plus simple et plus fiable que la PCR. Un tel diagnostic est proposé pour les pathologies récessives liées au

chromosome X. Dans un tel cas, le DPI est basé sur la détermination du sexe des embryons et le transfert des embryons féminins dans la mesure où seuls les embryons masculins sont à risque de développer la pathologie. L'avantage de cette technique provient de la disponibilité d'un DPI pour près de 200 pathologies et éventuellement, si le diagnostic clinique est certain, de la possibilité de réaliser un DPI même si le gène n'est pas encore cloné. L'inconvénient majeur est que, parmi les embryons mâles rejetés, un sur deux est statistiquement un embryon sain. La FISH est aussi utilisée pour la recherche de translocations chromosomiques ainsi que d'aneuploïdies. Dans le premier cas, le but est de sélectionner les embryons sains ou porteurs équilibrés. De tels diagnostics impliquent, tout comme pour la PCR, une mise au point longue dans la mesure où, pour la majorité des couples, il sera nécessaire de développer des sondes spécifiques. Certaines pathologies peuvent bénéficier d'une FISH ou d'une PCR selon l'état des connaissances du centre et les possibilités de recherche (hémophilie, Duchenne...). Un diagnostic de sexe élimine tous les garçons, autant les sains que les porteurs de l'anomalie, là où la PCR permettrait un transfert d'embryons sains. Mais chaque diagnostic par PCR nécessite des mois de recherche et de travail pour une mutation orpheline reconnue dans une seule famille. C'est pour cela que l'orientation du travail des centres en France actuellement est de privilégier l'augmentation du nombre des diagnostics possibles puisque nous n'avons pas encore les moyens d'en affiner les techniques.

LA TECHNIQUE DU DPI

La pratique du DPI est possible du fait du grand nombre d'embryons produits lors de la FIV. En effet, le nombre d'embryons obtenus, 6 à 8 dans les bonnes situations, assure statistiquement la présence d'au moins un embryon sain dans la cohorte des embryons analysés. Sans cette certitude, les techniques de biologie moléculaire sur cellule unique n'auraient dans ce contexte que peu d'intérêt.

Le DPI s'adresse à des couples à risque de transmettre une maladie génétique, auxquels est proposée une FIV. Sur les embryons ainsi obtenus, au troisième jour après la fécondation, à un stade théorique de 8 cellules, une ou deux cellules sont prélevées : on parle de biopsie embryonnaire. Celle-ci n'affecte pas le potentiel de développement de l'embryon. Techniquement il s'agit de micromanipulations, assimi-

DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE

Liste non exhaustive des pathologies
déjà prises en charge et à venir

Autosomique récessif	Maladies monogéniques Autosomique dominant	Lié au chromosome X	Anomalies du caryotype
<p>Amyotrophie spinale Albinisme oculo-cutané β thalassémie Drépanocytose Dystrophie ectodermique Mucoviscidose/ABCD <i>Maladie de Tay-Sachs</i></p>	<p>Achondroplasie Maladie de Huntington Maladie de Peutz-Jeghers Myotomie dystrophique de Steinert Polypose colique familiale <i>Rétinoblastome</i> <i>Neurofibromatose</i></p>	<p>Adrénoleucodystrophie Albinisme oculaire Agammaglobulinémie de Burton ATRX Choroidéramie Charcot-Marie-Tooth Déficit en ornithine carbamyl transférase Goball-Rosen Hémophilie A Maladie de Hunter Maladie de Menkes Maladie de Peizaeus-Merbacher Myopathie de Becker Myopathie de Duchenne Myopathie myotubulaire Retard mental lié à l'X Récepteur aux androgènes Syndrome d'Alport Syndrome de l'X fragile Vacterl Autres</p>	<p>Translocations réciproques Translocations robertsoniennes Autres</p>
<p>ABCD : agénésie bilatérale des canaux déférents ; ATRX : syndrome comprenant α-thalassémie et retard mental lié à l'X Cette liste est non exhaustive du fait de nouvelles prises en charge de couples présentant d'autres pathologies. Il faut comprendre que ce n'est pas la pathologie existante qui génère un DPI puis une proposition à des couples. C'est la demande des couples qui va induire une démarche de la part du centre de DPI ; peut-on déjà faire le diagnostic ? Sinon est-il réalisable ? Si oui en combien de temps, comment, est-ce prioritaire ?</p>			

lables à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), bien que plus délicates, permettant de perforer la zone pellucide, dans laquelle se trouve encore l'embryon à ce stade de développement, et d'aspirer une ou deux cellules.

ASPECTS PARTICULIERS DE L'AMP EN VUE D'UN DPI

Pour le couple, la première des difficultés à surmonter est très certainement son statut génétique, et le risque de donner naissance à un enfant atteint d'une pathologie très invalidante, voire létale. En ce qui concerne le DPI, la difficulté pour ces couples vient de la nécessité de passer par une FIV. La plupart d'entre eux n'ont pas d'antécédent d'infertilité, or la FIV reste une technique peu efficace. Les taux de grossesses après transfert sont d'environ 20 à 30 %, ce qui signifie que les couples doivent envisager de revenir 3 à 5 fois avant d'espérer une grossesse. Il est fondamental d'informer les couples de ces difficultés et des différentes autres options envisageables (don de gamète, adoption). Il n'en reste pas moins qu'avant d'accepter un couple en vue d'un DPI, un bilan soigneux et dans les mêmes modalités qu'un couple stérile doit être effectué.

Il comprendra des dosages hormonaux de base chez la femme (FSH, LH, Estradiol, Prolactine, TSH, voire inhibine B). L'obtention de plusieurs embryons est indispensable au transfert d'embryons sains, il faut donc s'assurer que la patiente répondra correctement aux traitements de stimulation. Vandervost et al. ont montré qu'à moins de 6 follicules, il était préférable d'annuler le cycle de stimulation, les chances de transfert d'embryons sains étant proche de 0. L'âge de la patiente est à corrélérer au statut hormonal, quand on sait qu'après 38 ans la fertilité diminue de façon drastique. L'hystérogrophie et/ou l'hystéroscopie sont à exécuter pour vérifier l'intégrité de la cavité utérine. On préférera l'hystéroscopie dans les cas d'antécédents d'IMG. Chez l'homme, un contrôle du spermogramme est suffisant. Les sérologies obligatoires seront effectuées juste avant la prise en charge en AMP.

Pour le biologiste, la principale difficulté réside dans le peu de matériel biologique disponible. En effet, on peut considérer que la difficulté de la réalisation d'une analyse génétique est inversement proportionnelle au nombre de cellules disponibles. Ce peu de matériel implique des conditions d'analyse drastiques. En effet, de multiples sources de contamination peuvent affecter le résultat d'un DPI. Elles

peuvent provenir de cellules du manipulateur, de cellules de la corona radiata entourant l'embryon, de spermatozoïdes prisonniers de la zone pellucide ou, et cela représente la source principale, de produits d'amplifications antérieures pouvant rester, sous forme d'aérosol, dans le laboratoire. Afin de minimiser ce problème, nous travaillons en tenue stérile sous hotte à flux laminaire et dans une pièce réservée à cet effet. Cette pièce est en surpression et équipée de lampes UV. Pour éviter la contamination par les spermatozoïdes surnuméraires ou les cellules de la corona radiata, l'ICSI est donc préconisée et systématique. De plus, la méthode de l'ICSI permet d'éviter les rares mais possibles absences de fécondation en FIV classique.

La congélation d'embryons surnuméraires sains est effectuée avec accord parental. Le transfert d'embryons congelés déjà biopsiés donne peu de résultats, mais aujourd'hui quelques équipes rapportent des grossesses. Il est vrai que le cycle de congélation-décongélation est mal supporté par ses embryons largement « hatchés » laissant passer les cryoprotecteurs. Une amélioration à cet endroit est à atteindre ; pour l'instant, un échec de transfert amène à recommencer un nouveau cycle de FIV-ICSI. Wilton et al. (2001) (24) ont rapporté une amélioration du protocole de congélation, qui reste à vérifier mais qui apporterait un confort considérable pour les couples.

La prise en charge d'un couple en vue d'un DPI se plie aux règles habituelles des couples infertiles mais est soumise à quelques contraintes d'ordre technique. L'expérience belge nous a largement guidés et nous évite les écueils dans lesquels ils sont eux-mêmes tombés à leur début.

Il ne faut pas perdre de vue que l'objectif est d'aider ces patients à avoir un enfant, même porteur, mais indemne de la pathologie transmissible. Cette condition n'est pas en soi suffisante pour accepter en DPI tous les couples, même si les techniques de dépistage existent. Le résultat de la tentative de FIV est primordial à double titre : elle permettra la naissance d'un enfant sain dans une famille le plus souvent déjà blessée par une parentalité douloureuse et elle s'adresse à des couples fertiles qui ont déjà obtenus des grossesses spontanément. Ces couples sont transposés dans un univers qui leur est inconnu et qu'ils n'imaginaient pas aussi complexe et incertain. Le *screening* des patients doit être sérié afin d'éviter de les entraîner dans des procédures compliquées qui n'aboutiraient pas de façon prévisible.

Le choix des techniques de laboratoire et les stratégies de transfert sont importants pour la qualité du DPI et l'amélioration des chances de grossesse, tout en diminuant les contraintes du biologiste responsable du diagnostic définitif.

1. Stratégie d'inclusion en FIV en vue d'un DPI

Une cohorte suffisante d'embryons assure la présence d'au moins un embryon sain. Cette nécessité d'obtenir plusieurs embryons est due à l'influence de la pathologie sur le nombre d'embryons non atteints et transférables, à la perte de matériel entre la ponction et le transfert et à l'influence du nombre d'embryons transférés sur le taux de grossesses. Vandervost et al. (1998) (20) ont très bien montré (Tableau I) la corrélation entre la pathologie héréditaire et le nombre d'embryons non atteints. La pathologie héréditaire elle-même peut être à risque de mauvaise réponse à la stimulation. On pouvait s'en douter pour les patientes porteuses de l'X fragile dont on sait qu'elles présentent une ménopause précoce (18), on le découvre avec les myotonies de Steinert et la grande difficulté de stimuler et de ponctionner les patientes achondroplases. De même, le nombre de complexes cumulus-ovocyte (CCO) est significativement lié aux taux de grossesses (Tableau II), avec un taux croissant de grossesses en fonction du nombre d'embryons transférés chez ces mêmes couples (Tableau III), élément que l'on connaît bien en AMP. Liebars et al. (10) montrent que moins de 50 % des CCO obtenus donneront des embryons biopsiables (Tableau IV). Ainsi ce sera sur des critères classiques qu'il faudra sélectionner les patientes avec une extrême vigilance, puisque Vandervost propose l'annulation des cycles à moins de 6 follicules espérés et qu'entre 6 et 8 l'annulation doit être discutée avec le couple.

Tableau I

*Influence de la pathologie sur le nombre d'embryons non atteints et transférés.
Vandervost et al. Hum Reprod 1998*

Pathologie héréditaire	Monogénic récessif	Monogénic dominant	Lié à l'X	Sex. aneuploïdie
Cycles (n)	29	33	14	8
CCO (n)	405	398	221	116
E Biopsiés (n)	133	202	111	40
E normaux	84	35	35	18
E normaux/CCO	0,21	0,16	0,16	0,15
Par E biopsié	0,63 ^{a, b}	0,31 ^{a, c}	0,31 ^{b, d}	0,45 ^{c, d}
CEI	0,19	0,14	0,13	0,20

a, b : p < 0,00005 c : p < 0,005 d : p < 0 05
CEI : cycle efficiency index CCO : Complexe cumulus-ovocyte

DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE

Tableau II

Caractéristiques des cycles quand < 9 et = 9 CCO prélevés

Caractéristiques	Nombre de CCO	
	< 9	= 9
Nbre de cycles (% du total)	22 ^a (26,1)	62 ^a (73,9)
Total de CCO prélevés	124	1020
Nbre de cycle avec E biopsiés (%)	18 (82)	59 (95)
Nbre d'E biopsiés (± SD)	2,23 ± 1,57 ^b	7 ± 4 ^b
Nbre de cycles avec TE (%)	14 ^c (63,6)	54 ^c (87)
Nbre d'E normaux/ CCO	0,14	0,18
Nbre de TE/cycle (± SD)	0,77 ± 0,69 ^d	1,94 ± 1,05 ^d
Nbre d'E /transfert (± SD)	1,21 ± 0,68 ^e	2,22 ± 1,05 ^e
Implantatio/E (%)	20	13
Grossesses/cycles (%)	2/22 (9)	13/62 (20,9)

a, b, d, e : p < 0,0005 c : p < 0,05

Tableau III

Influence du nombre d'embryons transférés sur le taux de grossesses

	Nbre d'embryons transférés				
	0	1	2	3	4
Nbre de cycles	16	22	24	21	1
Nbre de grossesses (%)	0 (0)	2 (10,1)	5 (18,1)	7 (33,3)	1 (100)

Tableau IV

Annulation des cycles (Liebars et al. 1998)

Moyenne du nombre de CCO	12,3
Ovocytes Meta II	10,9
Ovocytes injectés	10,6
2PN	8,4
Embryons biopsiés	5,8

< de 50% des ovocytes donneront des embryons biopsiables

– **L'âge** de la patiente est un facteur prédictif puissant de bonne réponse aux stimulations de l'ovulation. Le déclin de la fertilité commence à partir de 35 ans et, à partir de 40 ans, tous les aspects de la FIV sont touchés malgré l'augmentation des doses : diminution du pic d'estradiol, nombre de follicules recrutés, nombre d'ovocytes recueillis et taux de grossesses significativement plus bas que chez des patientes jeunes. Pour Hull et coll. (1996) (7), le taux de naissances vivantes après transfert embryonnaire est de 32,2 % entre 25 et 29 ans et de 8,8 % entre 40 et 44 ans.

S'il est difficile de refuser d'emblée d'inclure une patiente en AMP pour âge élevé (40-42 ans), cela l'est d'autant plus dans le cadre d'un DPI où les patientes sont a priori fertiles.

– **Les dosage hormonaux au troisième jour du cycle (J3)** seront donc un bon corollaire à l'âge pour prendre une décision. Le taux de FSH à J3 reste le meilleur paramètre pour l'instant et le plus reconnu. Il existe une variabilité des dosages en fonction des cycles et en fonction des laboratoires, ce qui amène à les contrôler au moins une fois. Un taux de FSH = 12 mUI/ml est considéré comme pathologique mais chaque centre possède son seuil de référence en fonction du laboratoire avec lequel il travaille. La FSH de base ne peut s'interpréter sans la présence de l'estradiolémie à J3. Licciardi et al. (1995) (9) n'ont aucune grossesse pour un estradiol supérieur à 75 pg/ml. Les taux d'estradiolémie sont inversement proportionnels aux taux de FSH par effet de *feed-back* négatif. Ainsi une FSH normale est faussement rassurante si on retrouve une estradiolémie élevée. Cette proposition est vraie en dehors du syndrome des ovaires polykystiques qui présentent une estradiolémie physiologiquement élevée.

L'inhibine B à J3 est un troisième marqueur qui commence à se répandre. Un taux < 45 pg/ml marque une insuffisance ovarienne débutante et d'après Siefer et al. (1999) (17), l'inhibine B serait diminuée avant l'augmentation de la FSH. De nouvelles études discutent ces résultats, rendant les taux de FSH de base seuls performants (Corson et al. 1999) (1). Pourtant plusieurs équipes retrouvent ce seuil à 45 pg/ml. L'interprétation de l'inhibine B doit se faire en fonction des taux de la FSH et de l'estradiol et le tout doit être corrélé à l'âge. Dans le doute, le volume ovarien et la présence de petits follicules sur l'ovaire en début de cycle permettra le plus souvent de conclure.

– **Les tests de réserve ovarienne** peuvent contribuer à prendre une décision dans les cas difficiles, en particulier chez des femmes entre 39 et 41 ans et pour lesquelles les taux de base de FSH ou d'estradiol sont limites. Le test au citrate de clomiphène (TCC) ou l'*exogenous FSH ovarian reserve test* (EFORT) sont deux tests rapides, simples et qui per-

mettent d'évaluer la réponse de l'ovaire à la stimulation. Une élévation de la FSH à J3 et à J10 à plus de 10 mUI/ml après traitement de 5 jours de 100 mg de CC ou un delta < 30 pg/ml d'estradiol entre J3 et J4 et après 300 UI de FSH à J3 mettent en évidence une insuffisance ovarienne qui ne répondra pas au traitement de stimulation de l'ovulation. Chez des patientes jeunes cependant, une élévation de la FSH ne doit pas faire reculer devant une tentative de FIV. Certaines études montrent un taux de réussites cumulé satisfaisant mais seulement dans le cadre de l'infertilité, où le but est l'obtention d'une grossesse même avec un faible recueil ovocytaire. La nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'embryons pour aboutir à un transfert change considérablement les données du problème.

Ainsi, un bilan mettant en évidence une patiente qui répondrait peu ou pas à une stimulation d'ovulation en vue d'un DPI doit amener à rediscuter l'indication et éventuellement à ne pas l'intégrer dans un protocole (C. Rongières-Bertrand et al. 1997) (15). Il est vrai qu'une stimulation de l'ovulation en vue d'une FIV/ICSI est un bon test de réponse ovarienne et permet dans un certain nombre de cas de faire comprendre au couple l'inefficacité d'une prise en charge.

– **L'imagerie** permet d'objectiver la qualité de la cavité utérine et donc de l'accueil de l'embryon, ce d'autant qu'il existe des antécédents de curetage ou de fausse couche tardive. L'hystéroscopie est supérieure à l'hystérogographie pour diagnostiquer les petites lésions intra-utérines (polypes, myomes, synéchies) et les pathologies de la muqueuse (hyperplasie, atrophie, endométrite). Un traitement chirurgical adéquat sera proposé avant tout traitement de stimulation. (Rongières-Bertrand C. 1999) (16).

– **Le spermogramme** est à demander même si l'ICSI est la technique de choix pour un DPI. Il permet d'éviter les mauvaises surprises le jour de la ponction (OATS sévère, azoospermie) et si besoin de rechercher des anomalies génétiques ou autres devant des pathologies découvertes à ce moment-là (caryotype parental, anticorps antispermatozoïdes, infection).

2. Choix de la stimulation

Le choix de la stimulation doit se faire en fonction du profil hormonal de la patiente comme dans une AMP classique. Il n'y a pas de légitimité à proposer une hyperstimulation de l'ovulation contrôlée « forcée ». Les risques d'hyperstimulation sont vrais également pour ces patientes. Il s'agit plutôt d'adapter le traitement afin d'obtenir envi-

ron une dizaine de follicules. L'existence de trois centres de DPI en France amène les gens à consulter loin de chez eux. Les centres d'AMP locaux font relais et permettent le déplacement des patientes soit juste pour le jour de la ponction ovocytaire soit à partir du 6^e-8^e jour de la stimulation de façon à contrôler le cycle. Il est préférable pour le centre qui effectue le DPI de prescrire le traitement de stimulation et de le monitorer avec le centre relais. Ceci permet de fixer ensemble les dates de début de traitement, de suivre les monitorages sur des traitements connus et ainsi de pouvoir annuler à distance avant de déplacer les patients si d'emblée la première échographie de contrôle ne semblait pas favorable. La prise en charge des patients après le démarrage de la stimulation par le centre DPI directement est certes difficile pour les patients que l'on éloigne de chez eux mais, par ailleurs, permet une surveillance rapprochée, une relation privilégiée avec les patients. L'échec de stimulation ou l'annulation du traitement est alors sous la responsabilité du centre de DPI, ce qui facilite la relation triangulaire patients, centre relais et centre DPI.

3. Choix de l'ICSI

La technique de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) est aujourd'hui la technique de choix pour un DPI. La PCR en général et en particulier sur une ou deux cellules nécessite minutie et vigilance. Il s'agit d'éviter toute contamination par de l'ADN extérieur : en particulier celui de l'opérateur, l'ADN volatile des PCR antérieures mais aussi les cellules du cumulus ou d'autres spermatozoïdes qui peuvent venir polluer le prélèvement de blastomère si l'embryon a été fécondé en fécondation *in vitro* classique.

À ces critères se rajoute également la diminution du risque d'échec de fécondation. Staessen et al. (1999) (19) montrent qu'il existe un petit avantage à l'ICSI en minimisant les risques d'échec de fécondation sans oblitérer les chances de développement embryonnaire et d'implantation potentielle. (Tableau V).

4. Le transfert embryonnaire

Le diagnostic préimplantatoire se fait en général à J3 de la culture embryonnaire, dans le but d'obtenir un embryon entre 4 à 8 cellules pour un diagnostic par PCR ou FISH au mieux sur deux blastomères d'un même embryon. Grifo et al. (1998) (53) ont transféré à J4 après

DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE

Tableau V

Fertilisation à 2PN dans une cohorte d'ovocytes traités par FIV ou ICSI

	FIV (n = 334)	ICSI (n = 328)	
Tous patients (n = 56)			
Nb de CCO	6,0 ± 2,2	5,9 ± 2,3	
2PN/CCO (%)	53,0 ± 31,2	62,0 ± 26,6	NS
Sans EF (n = 47)			
Nb de CCO	6,1 ± 2,2	5,9 ± 2,3	
2PN/CCO (%)	60,3 ± 25,6	63,8 ± 25,2	NS
Avec EF en FIV (n = 7)			
Nb de CCO	5,9 ± 1,8	6,2 ± 1,9	
2PN/CCO (%)	–	69,2 ± 15,3	
Avec EF en ICSI (n = 2)			
Nb de CCO	4,0 ± 1,4	3,5 ± 0,7	
2PN/CCO (%)	56,6 ± 33,0	–	
EF : échec de fertilisation			

un DPI par PCR effectué le 3^e jour. Ils ont retrouvé, sur 7 couples intéressés, un taux de d'implantation de 37,5 % avec un taux d'enfants vivants/transfert de 25 % dont une grossesse gémellaire. Ils concluent qu'il n'y a pas d'effets adwerses au transfert à J4, alors qu'il existe non seulement une plus grande sécurité au diagnostic génétique mais aussi une possibilité d'augmenter le nombre de recherches possibles du fait du temps imparti au biologiste. De plus ils soulignent l'augmentation de taux d'implantations bien qu'il s'agisse d'une petite série.

Gianaroli et al. (1999) (3) ont effectué chez 86 patientes de mauvais pronostic (échecs répétés d'implantation, indication de caryotype pour âge maternel, translocation) 116 cycles de FIV. Deux groupes ont été individualisés : le groupe 1 qui a bénéficié d'un transfert à J3 en fin d'après-midi avec une analyse par FISH des chromosomes X, Y, 13, 16, 18 et 21 et un deuxième groupe dont les embryons ont été transférés à J4 le matin avec une analyse par FISH des chromosomes précédents plus le 14, 15 et 22. Cette technique se faisait alors en deux temps. (Tableau VI). Leurs conclusions sont similaires à l'équipe de Grifo avec un commentaire supplémentaire développant le bénéfice en termes de sélection d'embryons sains et viables à J4, sans contrainte de temps pour le biologiste comme pour la patiente.

Tableau VI
Devenir des embryons biopsiés congelés ou non congelés

	Embryons biopsiés	Embryons non biopsiés
Nombre de patientes	30	43
Âge (années ; moyenne \pm SD)	36,3 \pm 3,7	36,1 \pm 2,8
Nombre d'embryons décongelés	55	94
intacts (%)	5 ^a (9)	24 ^a (25)
lysés (%)	19 ^b (34)	12 ^b (13)
Index de survie %	38 ^c	61 ^c
a = 4,98 ; p < 0,025 b = 8,71 ; p < 0,001 c = 48,11 ; p < 0,001		

Veiga et al. (1999) (21) ont publié les résultats de trois patientes dont le DPI a été fait à J3 et le transfert entre J5 et J6. Leurs résultats montrent l'absence de dommages de la biopsie embryonnaire sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. De plus, ils évoquent la possibilité d'un DPI à J5 permettant l'obtention de plus de matériel. Depuis, beaucoup de DPI sont effectués pour recherche d'aneuploïdies chez des patientes en FIV/ICSI (Munné et al. 2000) (21). On sait qu'il peut exister des mosaïques avec aneuploïdies à ce stade, sans connaître encore leurs conséquences pathologiques et la capacité de réparation de ces embryons (Wells et al. 2000) (23).

Les transferts en France sont actuellement réalisés à J3 en fin d'après-midi ou à J4 selon les équipes. La littérature préconise les transferts à J4 et il n'est pas impossible qu'un transfert à J5-J6, après maîtrise de la culture prolongée, soit un jour proposé.

Comme il n'y a pas de légitimité à une hyperstimulation forcée, il n'y a pas de légitimité à transférer plus de deux embryons chez ces femmes en général fertiles. La politique de transfert doit rester la même qu'en AMP classique pour éviter à ces couples des grossesses multiples. La validité du test génétique sur une cellule est de 95 % et peut aller jusqu'à 98 % sur deux cellules dont les signaux sont clairs et sans équivoque. C'est pourquoi, en dehors d'un diagnostic de sexe, il leur est conseillé un DAN. Les grossesses multiples chez ces patientes présentent les mêmes risques que chez les autres mais la grande probabilité d'un diagnostic génétique anténatal pour confirmer le DPI ne fait qu'accroître les risques de pertes fœtales. L'amniocentèse n'est pas sans risque supplémentaire dans ces grossesses. La

réduction embryonnaire en cas de grossesse triple pose deux problèmes, le risque de perdre toute la grossesse et le vécu délicat de cette technique dans ce contexte. Pourtant, comme toute nouvelle technique, l'obtention de bons résultats n'est pas sans passer par une période d'apprentissage qui nous confronte quand cela est possible à la dure décision d'un transfert de 3 embryons.

5. La congélation embryonnaire

La congélation des embryons sains surnuméraires n'a pas aujourd'hui donné de résultats satisfaisants. Van Steirteghem n'a aucune grossesse après transfert d'embryons sains biopsiés ayant subi un cycle de congélation-décongélation. Magli et al. (1999) (12) ont comparé des embryons après décongélation. Le groupe 1 comprenait 55 embryons biopsiés décongelés et le groupe 2 comprenait 94 embryons sans biopsie décongelés. Le pourcentage d'embryons intacts après décongélation est significativement plus élevé dans le groupe 2 (25 % vs 9 % ; $p < 0,025$). Ils décrivent un index intéressant : l'index de survie qui correspond au nombre de blastomères vivants divisé par le nombre de blastomères totaux congelés. Cet index est significativement plus élevé dans le groupe 2 (61 % vs 38 % ; $p < 0,001$). Dans un deuxième temps, ils ont analysé par FISH des embryons qui avaient été congelés pour hyperstimulation ovarienne. Ils ont été décongelés puis biopsiés et transférés. Ils retrouvent 52 % d'aneuploïdies, 19 % (3/19) de grossesses évolutives et 10 % d'implantations. Les auteurs préconisent qu'à l'heure actuelle il est préférable de ne pas congeler les embryons biopsiés jusqu'à la mise au point d'un protocole congélation-décongélation qui soit approprié et qui passerait par une ouverture de la zone pellucide moins agressive. Ludwig et al. (1998) (11) ont montré, chez la souris, que congélation et biopsie sont possibles. Aujourd'hui, la congélation peut être conseillée aux couples avec toute la prudence nécessaire dans les chances de réussite. Certaines équipes ont tout récemment obtenu des grossesses après un cycle congélation-décongélation sur des embryons déjà biopsiés. Les protocoles de congélation s'améliorent et il semble que nous sommes sur la bonne voie. (Jericho et al. 2002) (8).

CONCLUSION

Le DPI est possible du fait de l'acquisition de plusieurs embryons en FIV ouvrant la probabilité d'obtenir un embryon sain au moins. Les choix des techniques de fécondation et de congélation sont intimement liés à la performance du DPI. Les inclusions en vue d'un DPI, le choix de la stimulation et du transfert doivent être soumis à une réflexion drastique plus encore que dans le cadre de l'infertilité. L'écoute du couple à tous ces endroits doit être supportée par des psychologues mais également par les cliniciens et généticiens de l'équipe. La contrainte d'un traitement de stimulation en FIV n'est pas sans effet sur la représentation déjà ébranlée de leur capacité à se reproduire.

Résumé

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) existe en France depuis juillet 1999. La loi de bioéthique est très précise à ce sujet contrairement à nos homologues européens. 3 centres français ont été autorisés à réaliser cette technique dont 2 sont effectifs pour l'instant. Ces centres ont formé un groupe de travail « le GET-DPI » dont l'objectif est de coordonner les activités et de les rendre publiques. La plupart des couples en demande de DPI ont déjà rencontré une histoire obstétricale dramatique, d'autres qui connaissent leur statut génétique préfèrent un DPI plutôt que de se confronter à une IMG. Enfin, certaines pathologies d'apparition tardive font l'objet de demande de DPI ce qui n'est pas sans soulever quelques problèmes éthiques, les patients eux-mêmes ne voulant pas connaître leur statut. En Europe, deux autres indications sont représentées : la recherche d'aneuploïdies chez des patientes âgées en FIV ou en présence de fausses couches à répétition et le DPI pour social sexing ou harmonisation de la famille. Ces deux diagnostics sont interdits en France. La technique du DPI, soit un diagnostic génétique par PCR ou par FISH sur une seule cellule est délicate. Le tri des embryons qui s'ensuit implique l'obtention d'un certain nombre d'ovocytes puis d'embryons pour espérer en transférer au moins un. Ainsi, si les conditions de prise en charge d'un couple en DPI sont basées sur des critères semblables à ceux valables pour un couple infertile, la sélection est drastique. Il est nécessaire de s'assurer de la bonne réponse ovarienne de la patiente à la stimulation et l'annulation d'un cycle avant même toute ponction est facile si les conditions ne sont pas requises. Les patients sont prévenus de cette exigence. Le soutien de ces couples est fondamental, les préserver d'un autre type d'échec en partie.

DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE

Centre parisien :

Rendez-vous à l'hôpital Antoine Bécère

157 rue de la Porte de Trivaux – 92140 CLAMART

Pr René Frydman, Dr Nelly Frydman : 01 45 37 44 44

Sage-femme référente : Mme Violaine Kerbrat

Psychiatre psychanalyste : Dr Muriel Flis-Treves

Centre strasbourgeois :

Rendez-vous à l'hôpital CMCO

19 rue Louis Pasteur – 67300 SCHILTIGHEIM

Consultations téléphoniques : 03 88 62 82 80

Dr Stéphane Viville, Dr Catherine Rongières : 03 88 62 82 80

03 88 62 83 10

Sage-femme référente : Mme Marie-Paule Bailly

Psychiatre psychanalyste : Dr Daniel Lemler

site Web : <http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/chimbio/DPI/index.html>

Bibliographie

1. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. 1999 *Hum Reprod*; 14: 2818-2821.
2. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). 2002, *Hum Reprod*; 17: 233-246.
3. Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fortini D, Ferraretti A. Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. 1999 *J Assis Reprod Gen*; 16: 170-175.
4. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Atkinson RML, Delhanty JDA. Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescence in situ hybridation. *Br Med J* 1993; 306: 1382.
5. Grifo JA, Giatras K, Tang XT, Krey L. Successful outcome with day 4 embryo transfer after preimplantation diagnosis for genetically transmitted diseases. 1998 *Human Reprod*; 13: 1656-1659.
6. Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-770.
7. Hull MGR, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. 1996, *Fertil Steril*; 65: 783-790.
8. Jericho H, Wilton L, Edgar DH. A modified method for cryopreservation of biopsied human preimplantation embryos. 18th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Vienne 2002, oral presentation 0-040, p15.
9. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentration as pronosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. 1995, *Fertil Steril*; 64: 991-994.
10. Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Joris H, Lissens W, Van Assche E, Nagy P, Bonduelle M, Vandervorst M, Devroey P, Van Steirteghem A. Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 186-95.
11. Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani S, Diedrich K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. 1998, *Hum Reprod*; 13: 3165-3168.
12. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Munné S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod*, 1999; 14: 770-773.
13. Munné S., Sandalinas M, Escudero T. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; 73: 1209-1218.
14. Ray PF, Munnich A, Nisand I, Frydman R, Vekemans M, Viville S. The place of social sexing in medicine and science. *Hum Reprod* 2002; 17: 248-249.
15. Rongières -Bertrand C, Olivennes F, Fernandez H, Fanchin R, Righini C, Hazout A, Glissant M, Frydman R. Rôle pronostique de l'âge et des dosages hormonaux de base dans le traitement de l'infertilité. 1997 *Contr Fertil Sex*; 25: 202-205.
16. Rongières-Bertrand C, Taylor S, Olivennes F, Fernandez H, Frydman R. Apport de l'hystérocopie dans le bilan de l'infertilité. *Rep Hum Horm* 1999; XII: 173-184.
17. Seifer DB, Scott RT, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, Danforth DR. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. 1999 *Fertil Steril*; 72: 63-65.
18. Sherman S. Premature ovarian failure in the Fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97: 189-194.
19. Staessen C, Camus M, Clasen K, de Vos A, Van Steirteghem A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. 1999 *Hum Reprod*; 14: 2474-2479.
20. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Veld H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. 1998 *Hum Reprod*; 13: 3169-

DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE

3176.

21. Veiga A, Gil Y, Boada M, Carrera M, Vidal F, Boiso I, Menezo Y, Barri PN. Confirmation of diagnosis in preimplantation genetic diagnosis (PGD) through blastocyst culture: preliminary experience. 1999 *Prenat Diagn*; 19: 1242-1247.

22. Viville S et GET-DPI. Le diagnostic pré-implantatoire : Bilan d'activité du groupe d'étude et de travail du DPI (GET-DPI) 2000. *Med Scie* 2001; 17: 919-923.

23. Wells D, Delhany JDA. A novel metho-

dology allows detection of every chromosome in single blastomeres from human preimplantation embryos and reveals aneuploidy, mosaicism and uniformly normal embryo 21-26. Octobre 2000, Oral Presentation(0-001), 56th annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine, San Diego, USA.

24. Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001; 345(21): 1537-41.