

CONSEIL D'ORIENTATION
SEANCE DU VENDREDI 04 MAI 2012

DELIBERATION N° 2012-CO-22

OBJET : Liste des procédés biologiques régulièrement utilisés en AMP et des techniques visant à améliorer les procédés biologiques autorisés



Madame Marie-Françoise BARATON, représentante de la Fédération nationale d'aide aux insuffisants rénaux

Monsieur Patrick NIAUDET, président du conseil d'orientation

Monsieur Bruno GAURIER, représentant de l'Association des paralysés de France

Madame Pascale FOMBEUR, conseiller d'Etat

Monsieur Henri JOYEUX, représentant de l'Union Nationale des Associations Familiales

Professeur Jean-Louis VILDE, membre du Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé

Madame Sylvie BUNFORD, représentante de l'Association « AMPhore »

Monsieur Pierre LYON-CAEN, représentant de la commission nationale consultative des droits de l'homme

Madame Danièle LOCHAK, représentante de la Ligue des droits de l'homme

Docteur Jean-Marie KUNSTMANN, expert scientifique spécialisé dans le domaine de la médecine de la reproduction et de la génétique



Docteur Jacqueline MANDELBAUM, responsable service de biologie de la reproduction

Madame Frédérique DREIFUSS-NETTER, conseiller à la Cour de cassation

Professeur Jean-Pierre JOUET, expert scientifique spécialisé en hématologie

Professeur Dominique BONNEAU, généticien

Professeur Jacques BELGHITI, chirurgien en transplantation d'organes

Madame Ingrid CALLIES, conseillère pour l'Ethique

Docteur Alain TENAILLON, Anesthésiste réanimateur

Professeur Mohamad MOHTY, hématologue

Docteur Pierre LEVY-SOUSSAN, médecin psychiatre

Docteur Gérard SEYEUX, médecin psychanalyste

Madame Suzanne RAMEIX, philosophe

Monsieur Jean-François MALATERRE, représentant de l'Association française contre les myopathies

Monsieur Nicolas AUMONIER, philosophe

Le conseil d'orientation,

- Vu l'article L. 1418-4 du code de la santé publique, et
- l'article R. 1418-17 du code de la santé publique.

Adopte, à la majorité des membres présents l'avis du conseil d'orientation portant sur la liste des procédés biologiques régulièrement utilisés en AMP et la liste des techniques déjà mises en œuvre, accompagnées du dossier technique mentionné à l'article 3 du décret du 14 mars 2012, telles qu'elles figurent en annexe de la présente délibération.

Fait à Saint-Denis, le 4 mai 2012

Le président du Conseil d'orientation
de l'Agence de la biomédecine



Patrick NIAUDET

Listes des procédés biologiques régulièrement utilisés en AMP et des techniques visant à améliorer les procédés biologiques autorisés

Liste des procédés biologiques

Les procédés dont les noms suivent, et que je vous propose d'inscrire dans l'arrêté pris en application de l'article 3 du décret n°2012-360 du 14 mars 2012 relatif aux procédés biologiques utilisés en assistance médicale à la procréation, correspondent à des procédés d'ores et déjà mis en œuvre depuis de nombreuses années, "consacrés" par l'usage et évalués annuellement au moyen des rapports annuels d'activité réglementaires des centres.

1. Préparation de sperme en vue d'AMP ;
2. Fécondation *in vitro* sans micromanipulation ;
3. Fécondation *in vitro* avec micromanipulation ;
4. Congélation de gamètes ;
5. Congélation de tissus germinaux ;
6. Congélation d'embryons, de zygotes ;
7. Maturation *in vitro* des ovocytes.

Liste des techniques visant à l'amélioration d'un procédé, déjà répertoriées

Les techniques dont les intitulés suivent correspondent à des techniques existantes faisant l'objet d'un suivi annuel dans le cadre du rapport annuel d'activité transmis par les établissements de santé et les laboratoires de biologie médicale autorisés aux agences régionales de santé et à l'Agence de la biomédecine. Elles visent à l'amélioration des procédés existants déjà en œuvre listés ci-dessus.

A noter que la vitrification, bien qu'en usage hors de France depuis les années 80, n'a été introduite qu'à l'occasion des débats parlementaires relatifs à la révision de la loi de bioéthique.

1. IMSI (technique d'amélioration du procédé de fécondation *in vitro* avec micromanipulation) ;
2. Ecllosion assistée dans le cadre de la Fécondation *in vitro* avec micromanipulation ;
3. Culture embryonnaire prolongée en milieu défini dans le cadre de la fécondation *in vitro* avec ou sans micromanipulation ;
4. Sélection des spermatozoïdes vivants avant fécondation *in vitro* avec micromanipulation
5. Vitrification des gamètes (technique d'amélioration du procédé de congélation des gamètes) ;
6. Vitrification des embryons et zygotes (technique d'amélioration du procédé congélation des embryons).

Les fiches suivantes décrivent, conformément aux dispositions de l'article 3 du décret du 14 mars 2012, les procédés et les techniques biologiques d'AMP existants.

La préparation de sperme en vue d'AMP

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

Le procédé consiste à préparer le sperme au laboratoire d'AMP en vue d'une insémination artificielle dans l'utérus ou la réalisation d'une fécondation *in vitro*.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

Ce procédé biologique en vue d'AMP existe de longue date, faisant appel à différents modes de préparation du sperme (Steptoe PC 1970, Lopata A 1976, Paulson JD, 1977, Erickson RJ 1977, Gorus FK 1981) et a permis la réalisation des inséminations artificielles intra-utérines et de la fécondation *in vitro*. Le premier enfant conçu par fécondation *in vitro* est né en 1978 en Angleterre (Steptoe PC and Edwards RG, 1978, Lancet).

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

Ce procédé biologique a pour principe de récupérer, à partir d'un sperme frais ou congelé, les spermatozoïdes qualitativement les plus satisfaisants, en les séparant du liquide séminal. Les spermatozoïdes les plus mobiles sont sélectionnés soit dans l'optique d'une insémination artificielle intra-utérine consistant à les déposer dans l'utérus de la femme au moment de l'ovulation, soit pour la réalisation d'une fécondation *in vitro* avec ou sans micromanipulation.

Les principales étapes sont :

- l'isolement des spermatozoïdes mobiles par centrifugation sur gradient de densité ou par migration ascendante, ou par simple lavage dans le cas des spermés présentant une oligozoospermie sévère
- le lavage des spermatozoïdes ainsi isolés.

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

Ce procédé permet la réalisation d'inséminations artificielles et de fécondations *in vitro*, AMP pratiquées depuis plus de 30 ans dans la majorité des pays.

Concernant l'efficacité, ce procédé, en permettant la sélection des spermatozoïdes les plus mobiles, a permis une amélioration des résultats des inséminations intra-utérines et des fécondations *in vitro*. Cette technique améliore également la sécurité sur le plan bactériologique.

En France, le procédé de préparation du sperme est une activité réalisée depuis plus de 30 ans, et soumise à autorisation depuis 1988 (délivrée par l'agence régionale de l'hospitalisation, puis par l'agence régionale de santé compétente, après avis de l'Agence de la biomédecine). Elle obéit aux règles générales fixées par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP (depuis 1999). Un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine, conformément aux dispositions du décret n°2008-588 du 19 juin 2008.

De 2006 à 2009, 213 052 inséminations artificielles intra-utérines ont été réalisées en France, ayant permis la naissance de 24 294 enfants (rapport annuel de l'Agence de la biomédecine 2010). Lors de l'attribution du prix Nobel à Robert Edwards en 2010, une estimation à plus de 4 millions d'enfants nés par FIV à ce jour dans le monde a été rapportée.

▪ Impact sur le nombre d'embryons conservés

La préparation de sperme en vue d'inséminations intra-utérines n'a aucun impact sur la conservation des embryons, puisque la fécondation se fait selon le processus naturel, *in vivo*. En ce qui concerne l'application de ce procédé à la fécondation *in vitro*, la limitation nécessaire du nombre d'embryons transférés à un ou deux réduit le risque de grossesse multiple (cf. procédé « Fécondation *in vitro* »).

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de préparation du sperme en vue d'AMP serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.

La fécondation *in vitro* (FIV)

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

Le procédé consiste à réaliser au laboratoire (*in vitro*) la fécondation en mettant en présence les gamètes masculins et féminins en vue du transfert du (des) embryon(s) dans l'utérus.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

En 1978, naissait en Angleterre le premier enfant conçu par fécondation *in vitro* (Steptoe PC and Edwards RG, 1978, *Lancet*).

Cette première mondiale a été obtenue après plus de 20 ans de travaux menés sur les petits mammifères puis transposés à l'espèce humaine (Edwards RG, 1969 ; Steptoe PC, 1970 ; Steptoe PC, 1971).

Ce succès, transposable à de très nombreux couples infertiles dans le monde, a été récompensé par l'attribution du prix Nobel de médecine 2010 au Pr Robert G. Edwards.

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

Le procédé consiste à mettre en présence les ovocytes et les spermatozoïdes pour obtenir la fécondation au laboratoire.

Les principales étapes sont :

- Collecte des ovocytes à partir des liquides folliculaires ponctionnés et mise en incubation dans un milieu de culture
- Préparation des spermatozoïdes au laboratoire (cf procédé « Préparation du sperme en vue d'AMP »)
- Mise en présence des ovocytes et des spermatozoïdes
- Incubation à 37°C
- Observation des étapes-clé au microscope

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

La FIV est pratiquée en routine depuis plus de 30 ans dans la majorité des pays.

Lors de l'attribution du prix Nobel 2010 à Robert G. Edwards, on a estimé à plus de 4 millions d'enfants nés dans le monde grâce à la FIV.

En France, la FIV est une activité encadrée soumise à autorisation depuis 1988. Elle obéit aux règles générales fixées par décret depuis 1995 et par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP depuis 1999. Un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008 (décret du 19 juin 2008).

De 2005 à 2009 en France, d'après les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, 22 666 enfants ont été conçus par FIV, auxquels il faut ajouter plus d'un millier d'enfants conçus par FIV et issus d'un transfert d'embryons congelés (rapport d'activité de l'Agence de la biomédecine 2010).

Il faut souligner la grande difficulté d'évaluer de façon fiable l'impact de ce mode de conception sur la santé des enfants qui en sont issus. L'analyse des publications disponibles, visant à évaluer les taux de malformations ou de pathologies génétiques, est extrêmement délicate en raison des variations méthodologiques, de la difficulté de tenir compte des nombreux facteurs confondants et du défaut de populations contrôles. Des évaluations rigoureuses sont nécessaires. Les données actuelles sur le développement staturo-pondéral et psychomoteur sont rassurantes. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur la fertilité de ces enfants devenus adultes.

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

Afin de concilier efficacité et sécurité, une double stratégie a été mise en place progressivement. La limitation nécessaire du nombre d'embryons transférés, à un ou deux embryons par transfert, réduit considérablement le risque de grossesse multiple. Les chances supplémentaires de succès offertes aux couples grâce à la congélation des embryons « surnuméraires » et à leur transfert différé ont favorisé la généralisation des transferts de un ou deux embryons.

Ainsi, parmi les évolutions observées ces dernières années dans le domaine de la FIV, le nombre moyen des embryons transférés (transfert immédiat et transfert d'embryons congelés) diminue progressivement. Cette évolution contribue ainsi à l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité.

En 2010 en FIV intra conjugale, la moyenne du nombre d'embryons transférés est de 1.8 et, pour 90% des transferts, un ou deux embryons sont transférés (données préliminaires 2010). Le nombre moyen d'embryons congelés est de 1,1 par tentative pour la même période.

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de fécondation *in vitro* serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés, en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.

La Fécondation in vitro avec micromanipulation ou ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection)**▪ Nature du procédé biologique d'AMP**

Le procédé consiste à réaliser au laboratoire la fécondation d'un (de plusieurs) ovocyte(s) mature(s) en injectant un spermatozoïde directement dans le cytoplasme ovocytaire en vue du transfert d'un (de plusieurs) embryon(s) dans l'utérus. Cette injection est appelée en anglais « IntraCytoplasmic Sperm Injection » ou ICSI.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

La première grossesse obtenue après ICSI a été publiée en 1992 (Palermo *et al.*, 1992).

Cette première mondiale a été suivie de nombreuses naissances publiées dans la littérature aussi bien après ICSI utilisant des spermatozoïdes éjaculés qu'après ICSI utilisant des spermatozoïdes obtenus chirurgicalement (par biopsie testiculaire ou ponction épидидymaire) chez des patients azoospermiques (n'ayant aucun spermatozoïde dans l'éjaculat) (Craft *et al.* 1993 ; Silber *et al.* 1994).

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

Le procédé consiste à injecter un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de chaque ovocyte mature de la conjointe.

Les principales étapes sont :

1. Collecte des ovocytes à partir des liquides folliculaires ponctionnés
2. Préparation des spermatozoïdes au laboratoire (cf. procédé « Préparation du sperme en vue d'AMP »)
3. Décoronisation (dénudation) des ovocytes pour éliminer les cellules folliculaires qui les entourent. Cette étape permet de visualiser parfaitement les ovocytes pour déterminer ceux d'entre eux qui sont matures (c'est-à-dire les ovocytes qui présentent un globule polaire) et pour les injecter (on n'injecte que les ovocytes matures).
4. Injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme de chaque ovocyte mature.
5. Incubation à 37°C.
6. Observation des étapes-clé au microscope

Seules les étapes 3 et 4 diffèrent des étapes de la FIV conventionnelle sans ICSI.

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

L'ICSI est pratiquée en routine depuis près de 20 ans dans tous les pays du monde.

En France, environ 63% des ponctions folliculaires sont suivies d'une ICSI et 37% sont suivies d'une FIV conventionnelle (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

En France, la FIV avec micromanipulation est une activité encadrée soumise à autorisation depuis 1994. Elle obéit aux règles générales fixées par décret depuis 1995 et par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP depuis 1999. Un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008 (décret du 19 juin 2008).

L'ICSI a fait l'objet d'une évaluation par la Haute Autorité de Santé en 2006 (http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_500305/rapport-icsi et http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_500304/synthese-icsi).

En 2010 en France, d'après les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, 8 388 enfants ont été conçus par ICSI, auxquels il faut ajouter les 2 678 enfants issus d'un transfert d'embryons congelés (après FIV conventionnelle ou ICSI) (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

▪ Impact sur le nombre d'embryons conservés

Comme pour la FIV sans micromanipulation, afin de concilier efficacité et sécurité, une double stratégie a progressivement été mise en place. La nécessaire limitation du nombre d'embryons transférés, à un ou deux embryons par transfert, réduit considérablement le risque de grossesse multiple. Les chances supplémentaires de succès offertes aux couples grâce à la congélation des embryons « surnuméraires » et à leur transfert différé ont favorisé la généralisation des transferts de un ou deux embryons.

Ainsi, parmi les évolutions observées ces dernières années dans le domaine de l'AMP, le nombre moyen des embryons transférés (transfert immédiat et transfert d'embryons congelés) diminue progressivement. Cette évolution contribue ainsi à l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité.

En 2009 en ICSI intra conjugale, la moyenne du nombre d'embryons transférés est de 1.8 et, pour 90% des transferts, un ou deux embryons sont transférés (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine). Le nombre moyen d'embryons congelés est de 1,0 par tentative pour la même période.

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de fécondation in vitro avec micromanipulation (ou ICSI) serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.

Amélioration du procédé biologique d'AMP de fécondation in vitro avec micromanipulation (ICSI)

IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection)

▪ **Caractérisation / nature du procédé**

L'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection) est une amélioration du procédé biologique d'AMP existant appelé ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection). Il consiste à injecter dans chaque ovocyte de la patiente un spermatozoïde sélectionné de façon plus précise en fonction de sa morphologie. Cette amélioration est obtenue grâce à l'utilisation d'un plus fort grossissement optique que celui habituellement utilisé lors d'une ICSI.

Cette amélioration de procédé est proposée pour favoriser le développement embryonnaire qui dépend, entre autres paramètres, de la qualité du spermatozoïde ayant fécondé l'ovule.

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

Les « inventeurs » de l'IMSI (Bartoov et al, 2006) ont proposé cette amélioration technique de l'ICSI pour améliorer ses résultats en termes de développement *in vitro* des embryons, de viabilité de l'embryon après l'implantation utérine (diminution des fausses couches spontanées) et donc d'enfants nés.

L'IMSI s'est développée en 2006 après que l'équipe de Bartoov a proposé en 2002 une nouvelle approche de l'observation des spermatozoïdes appelée MSOME (Motile Sperm Organelle Morphology Examination). La sélection des spermatozoïdes y est effectuée en éliminant les spermatozoïdes de forme anormale et ceux présentant des vacuoles au niveau de la tête. Plusieurs travaux ont montré un lien entre ces formes anormales et des modifications du risque de fragmentation nucléaire ou d'anomalie de la condensation de la chromatine (Boitrelle F *et al* 2011, Cassuto NG *et al* 2009 et 2012, Franco JG *et al* 2008, Vanderzwalmen P *et al* 2008).

Depuis, plusieurs milliers d'enfants sont nés dans le monde grâce à cette technique.

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

La procédure consiste seulement à utiliser un dispositif optique plus puissant que celui habituellement utilisé en ICSI classique. Elle ne change rien aux étapes habituelles de la FIV avec ou sans ICSI.

Alors que l'ICSI utilise généralement des optiques grossissant 200 ou 400 fois le spermatozoïde à injecter (objectif x20 ou x40 couplé à un oculaire x10), l'IMSI utilise un grossissement 600 à 1000.

Ce dispositif peut varier suivant les équipes. Il peut être complété par un système de contraste interférentiel (Nomarski) et un système de grossissement supplémentaire utilisant un zoom couplé à un moniteur.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

L'amélioration technique IMSI ne modifiant que le grossissement utilisé pour observer le spermatozoïde à injecter, elle n'apporte aucun risque supplémentaire vis-à-vis des spermatozoïdes, des ovocytes ou des embryons qui en sont issus. Au contraire une communication en congrès (Cassuto *et al* ASRM 2011) suggère un taux de malformation plus faible après IMSI qu'après ICSI mais cette donnée nécessite d'être confirmée.

En France, les activités d'IMSI sont répertoriées et tracées par l'Agence de Biomédecine depuis 2006. Comme pour toute technique d'AMP, un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008 (décret du 19 juin 2008).

De 2006 à 2009 en France, 7678 ponctions avec IMSI ont été réalisées, permettant l'obtention de 1864 grossesses et la naissance de 1770 enfants (données 2009, rapport d'activité Agence de la biomédecine

2010). En 2010, l'IMSI a été utilisée au cours de 9% des ICSI réalisées (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

Comme pour la FIV avec ou sans ICSI, afin de concilier efficacité et sécurité, une double stratégie a été mise en place. La nécessaire limitation du nombre d'embryons transférés, à un ou deux embryons par transfert, réduit considérablement le risque de grossesse multiple. Les chances supplémentaires de succès offertes aux couples grâce à la congélation des embryons « surnuméraires » et à leur transfert différé ont favorisé la généralisation des transferts de un ou deux embryons.

Ainsi, parmi les évolutions observées ces dernières années dans le domaine de l'Assistance Médicale à la Procréation, le nombre moyen des embryons transférés par transfert (transfert immédiat et transfert d'embryons congelés) diminue progressivement. Cette évolution contribue ainsi à l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique de l'IMSI, visant à améliorer le procédé de fécondation in vitro avec micromanipulation (ICSI) peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des techniques d'amélioration des procédés biologiques d'AMP autorisés.

Amélioration du procédé biologique d'AMP de fécondation in vitro avec micromanipulation (ICSI)

La sélection des spermatozoïdes vivants avant fécondation in vitro avec micromanipulation

▪ **Caractérisation / nature du procédé**

Pour féconder un ovule par la technique d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), il est obligatoire que le spermatozoïde injecté soit vivant. L'opérateur réalisant l'ICSI choisit ainsi toujours un spermatozoïde mobile, donc vivant. Or, parfois, tous les spermatozoïdes disponibles sont immobiles (certains cas de biopsies testiculaires, de ponctions épидидymaires, de nécrospérmies extrêmes, de pathologies du mouvement spermatique). Les résultats de l'ICSI sont alors très médiocres puisque les spermatozoïdes sont injectés « à l'aveugle », sans connaître leur statut vital.

Lors d'un spermogramme diagnostique, la vitalité des spermatozoïdes est analysée en utilisant de substances qui colorent les spermatozoïdes (éosine, nigrosine) et qui ne peuvent donc pas être utilisées en ICSI en raison de leur toxicité potentielle.

C'est pourquoi, dans ces cas particuliers, certaines techniques de sélection des spermatozoïdes ont été mises au point pour améliorer les résultats du procédé ICSI tout en restant sécurisées.

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

Dans les années 1980, plusieurs substances ont été proposées dans la littérature pour augmenter la mobilité de spermatozoïdes déjà spontanément mobiles en insémination et en Fécondation In Vitro. Ces substances permettent de stimuler la production énergétique au sein du spermatozoïde (caféine, théine, pentoxifylline et autres inhibiteurs de phosphodiésterases). Ces substances étaient déjà utilisées depuis de nombreuses années dans la pharmacopée humaine. Par la suite, ces substances ont été utilisées avec succès en ICSI dans les cas où tous les spermatozoïdes disponibles s'avéraient immobiles (Terriou et al., 2001; Mangoli et al, 2011).

Une autre technique permettant de reconnaître des spermatozoïdes immobiles vivants dans une population de spermatozoïdes immobiles consiste tout simplement à incuber ces derniers dans un milieu de culture dilué avec de l'eau salée. Cette dilution entraînant une diminution de pression osmotique, l'eau pénètre dans le flagelle du spermatozoïde qui s'enroule si ce dernier est vivant. C'est pourquoi cette technique s'appelle le HOST ou Hypo Osmotic Swelling Test (Verheyen et al., 1997).

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

Elle consiste à incuber les spermatozoïdes immobiles selon des modalités de temps et de concentrations prédéfinies et d'attendre que les spermatozoïdes reprennent un mouvement (cas des substances favorisant mobilité des spermatozoïdes) ou que leur flagelle s'enroule (HOST). Les étapes ultérieures du procédé ICSI sont ensuite les mêmes que celle d'une ICSI réalisée avec des spermatozoïdes spontanément mobiles.

▪ **Données arguant sur la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

La sécurité et l'innocuité des méthodes redonnant une mobilité aux spermatozoïdes immobiles sont assurées par le fait que les molécules employées sont utilisées depuis fort longtemps en pharmacopée humaine et que leur mode d'action est parfaitement connu en biologie cellulaire.

La dilution des milieux de conservation des spermatozoïdes réalisée lors du HOST utilise quant à elle une simple solution salée.

De nombreux enfants sont nés à ce jour grâce à ces deux types de sélection de spermatozoïdes avant ICSI. Aucune étude n'a rapporté d'effets délétères, ni sur les embryons ni sur les enfants nés grâce à leur utilisation.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique de sélection des spermatozoïdes vivants avant fécondation in vitro avec micromanipulation peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des améliorations des procédés biologiques d'AMP autorisés.

Amélioration des procédés biologiques d'AMP de FIV et ICSI

Éclosion assistée dans le cadre de la Fécondation in vitro avec micromanipulation

▪ **Nature du procédé biologique d'AMP**

La zone pellucide est une enveloppe acellulaire qui entoure l'ovocyte puis l'embryon précoce pendant les 5-6 premiers jours de son développement. L'éclosion embryonnaire est le processus biologique au cours duquel la zone pellucide qui entoure l'embryon va s'ouvrir permettant alors à l'embryon de s'implanter dans l'endomètre de l'utérus où il va ensuite se développer pendant toute la durée de la grossesse.

Le procédé consiste à retirer, perforer ou amincir la zone pellucide qui entoure le ou les embryon(s) précoce(s) avant d'effectuer le (leur) transfert in utero et ceci afin de faciliter le (leur) éclosion. L'objectif de ce procédé est d'améliorer les chances d'implantation du (des) embryon(s) transféré(s).

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

Après fécondation in vitro, les chances d'implantation d'un embryon sont comprises entre 15 et 20% en moyenne. Ainsi, l'absence d'éclosion serait responsable d'une partie des échecs d'implantation en fécondation in vitro. L'éclosion assistée par micromanipulation de la zone pellucide de l'embryon pourrait augmenter les chances d'implantation embryonnaire. Cette dernière hypothèse est à l'origine de la mise au point de l'éclosion embryonnaire assistée ou "Assisted Hatching" par l'équipe de Jacques Cohen en 1990.

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

Les embryons qui vont subir une éclosion embryonnaire assistée (EEA) sont des embryons issus de la fécondation in vitro classique (FIV) ou par micromanipulation des gamètes (ICSI). Les embryons peuvent être frais ou décongelés.

L'EEA s'effectue au cours d'une observation des embryons à l'aide d'un microscope à 37°C. La procédure utilisée pourra être :

- Mécanique avec dissection partielle de la ZP à l'aiguille ou "partial zona dissection",
- Chimique ou "zona drilling" exposant la zone pellucide de l'embryon à un jet perpendiculaire de solution de tyrode acide (pH=2,3), avec la possible digestion enzymatique totale de la zone pellucide dans le cadre du transfert embryonnaire au stade blastocyste,
- Thermique à l'aide d'un laser.

L'EEA thermique à l'aide d'un laser est la technique la plus utilisée à l'heure actuelle. Elle vise le plus souvent à amincir la zone pellucide.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

L'EEA a été proposée pour :

- **les patientes à faible chance de succès en fécondation in vitro** (âge supérieur ou égal à 38 ans, FSH augmentée à J3 du cycle menstruel et échecs répétés d'implantation),
- **les embryons à faible chance d'implantation** si les femmes ne correspondent pas aux critères précédents (embryons de moins de 5 cellules à J3, embryons comportant plus de 20% de débris cellulaires, embryons à zone pellucide épaisse, embryons décongelés).

L'EEA a été proposée dès les années 1990 et s'est développée plus largement en France et à l'étranger dans les années 2000 du fait du développement des lasers à rayons infrarouges.

Même si l'apport de l'EAA en fécondation in vitro reste controversée dans certaines études, cette technique reste utile dans les échecs répétés d'implantation et avant le transfert des embryons décongelés.

L'éclosion embryonnaire assistée obéit aux règles générales par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP (10 août 2010). Un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008 (décret du 19 juin 2008).

De 2007 à 2010 en France, d'après les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, 8057 tentatives de FIV, ICSI et transferts d'embryons décongelés_ont bénéficié d'une éclosion embryonnaire assistée aboutissant à la naissance de 1906 enfants.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique d'éclosion assistée dans le cadre de la FIV ou de l'ICSI peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des techniques d'amélioration des procédés biologiques d'AMP autorisés.

Amélioration des procédés biologiques d'AMP de FIV et ICSI

La culture embryonnaire prolongée en milieu définie dans le cadre de la fécondation *in vitro* avec ou sans micromanipulation

▪ **Caractérisation / nature du procédé**

Il s'agit de maintenir en culture l'embryon jusqu'à la période où il acquiert la capacité de s'implanter dans l'utérus (J5 ou J6 dans les conditions naturelles). Cette idée n'est pas nouvelle puisqu'elle faisait déjà partie des questionnements soulevés par le pionnier dans le domaine, le Pr Robert G. Edwards (Steptoe et al, 1971).

En effet, le développement au stade de blastocyste correspond à l'état de l'embryon au moment de sa présence dans l'utérus et de son implantation.

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

Cette pratique visant à améliorer les conditions de culture embryonnaire dans l'objectif de reproduire les conditions naturelles de l'arrivée de l'embryon dans l'utérus a été une préoccupation dès les étapes pionnières de la FIV (Bolton, 1989 ; Menezo, 1990).

Le frein à l'application de ce principe reposait sur l'inadéquation des conditions de culture pour permettre ce développement, de sorte qu'il a fallu attendre le développement de milieux adaptés aux besoins de l'embryon en croissance pour pouvoir l'envisager (Gardner et al, 1998, 2000.)

Cette méthode s'est développée à partir des années 1990-2000. Le bénéfice cumulé résultant du transfert de blastocyste dans les suites d'une tentative de FIV ou après transfert différé d'embryon congelé, par rapport au transfert d'embryon de deux ou trois jours, fait encore l'objet de controverses (méta-analyse de Blake, 2005 ; Guerif, 2011). En revanche, l'efficacité en lien direct avec le transfert lors de la tentative a clairement été démontrée (Papanikolaou, 2006 ; Zech, 2007 ; Guerif, 2009), de même que la possibilité de mieux contrôler le risque de grossesse multiple en favorisant le transfert d'un seul embryon (Guerif, 2011).

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

Elle consiste seulement à poursuivre la culture de l'embryon, avec une observation à J5 ou à J6, permettant de statuer sur la poursuite de son développement, pour réaliser, si c'est le cas, le transfert au stade de blastocyste.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

En France, les activités de fécondation *in vitro* et de culture embryonnaire sont encadrées et soumises à autorisation depuis 1988. La culture embryonnaire obéit aux règles générales fixées par décret (depuis 1995) et par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP (depuis 1999). Un dispositif d'AMP vigilance réglementaire a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008.

Cette activité spécifique est suivie par l'Agence de la biomédecine depuis 2006. En 2010, elle représente 2 824 et 4 936 cycles respectivement en FIV et en ICSI ainsi que 3 296 transferts d'embryons congelés avec un total de 2 334 enfants nés vivants. Le pourcentage de grossesse par tentative est de l'ordre de 29% (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

La capacité pour un embryon d'atteindre le stade de blastocyste traduit une aptitude au développement qui augure à la fois de ses chances futures d'implantation plus élevées que pour l'embryon à J2, mais aussi de la réduction d'un certain nombre d'anomalies chromosomiques responsables de l'arrêt du développement avant le stade de blastocyste (Staessen, 2004).

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

Il n'est pas négligeable, dans la mesure où la proportion d'embryons capables d'atteindre ce stade de développement se situe selon les cas entre 60% et 80%, de sorte qu'une fois le transfert embryonnaire réalisé, le nombre d'embryons « surnuméraires » congelables sera forcément plus faible.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique de culture embryonnaire peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des techniques d'amélioration des procédés biologiques d'AMP autorisés.

La congélation des gamètes

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

La congélation des gamètes est un procédé biologique qui vise à cryoconserver les ovocytes ou les spermatozoïdes afin de préserver la fertilité d'un individu, lorsque celle-ci risque d'être prématurément altérée par une pathologie ou un traitement toxique pour ses cellules germinales ou en vue d'un don pour un couple tiers. La congélation des gamètes peut également s'effectuer avant la mise en œuvre d'une AMP (congélation des spermatozoïdes à usage autologue avant AMP) ou au cours d'une AMP (congélation des ovocytes à usage autologue).

Seront successivement évoqués la congélation des spermatozoïdes et la congélation des ovocytes.

1. La congélation des spermatozoïdes

La congélation des spermatozoïdes consiste à protéger et conserver par refroidissement des spermatozoïdes qui seront conservés pour l'individu lui-même (conservation des spermatozoïdes à usage autologue) ou pour un tiers dans le cadre d'un don de spermatozoïdes.

▪ Données de la littérature / antériorité

La congélation des spermatozoïdes s'est effectuée d'abord en zootechnique chez les bovins (pour revue, Emperaire et al., 1973). En 1953, Sherman et Bunge ont rapporté la première congélation réussie de spermatozoïdes humains et quelques mois plus tard, ils ont obtenu la première grossesse à l'aide de spermatozoïdes humains congelés (Sherman, 1963). Cette possibilité de pouvoir congeler des spermatozoïdes va permettre le développement de « banques » de spermatozoïdes dans différents pays grâce au stockage des spermatozoïdes dans l'azote liquide.

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

La procédure de congélation des spermatozoïdes comporte plusieurs étapes :

- **la recueil des spermatozoïdes.** En fonction du contexte médical, les spermatozoïdes sont le plus souvent recueillis après masturbation dans un éjaculat. Plus rarement, ils peuvent être recueillis dans les urines des hommes qui présenteraient une éjaculation rétrograde vers la vessie. Les spermatozoïdes peuvent aussi être issus d'un prélèvement chirurgical directement dans les testicules, dans un canal appelé épидидyme situé à la sortie des testicules ou dans un canal qui fait suite à l'épididyme appelé canal déférent,
- **la transport des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement** qui doit être réalisé dans les plus brefs délais dans du milieu de culture maintenu entre 34° et 37°C, vers le Laboratoire spécialisé en cryobiologie assurant la congélation des spermatozoïdes,
- **la préparation spermatozoïdes** qui consiste à mettre en contact les spermatozoïdes avec un milieu protecteur et à conditionner ce mélange dans des paillettes en matière synthétique,
- **la congélation des spermatozoïdes** qui consiste actuellement à descendre lentement la température à l'aide d'un appareil de congélation automatique ou directement dans les vapeurs d'azote, jusqu'à une température de -150°C,
- **la conservation des spermatozoïdes** qui s'effectue dans l'azote liquide à une température de -196°C et dont la durée peut s'étendre sur une longue période.

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

En France, en 1973, la première banque de spermatozoïdes congelés, appelée Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains (CECOS), est créée officiellement par Georges David au

Kremlin Bicêtre. De telles banques vont s'ouvrir sur tout le territoire national assurant ainsi la congélation des spermatozoïdes dans le cadre du don ou de la préservation de la fertilité masculine (conservation des spermatozoïdes à usage autologue). La congélation des spermatozoïdes à usage autologue dans le cadre d'une AMP va alors être réalisée dans tous les centres d'AMP.

A l'heure actuelle, la congélation des spermatozoïdes est considérée comme un procédé biologique d'AMP historique utilisé en routine dans tous les centres d'AMP français et étrangers. Des millions d'enfants sont nés dans le monde après utilisation de spermatozoïdes décongelés.

En France, la congélation des spermatozoïdes est une activité encadrée, soumise à autorisation et qui obéit aux règles générales fixées par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP (depuis 1999).

De 2006 à 2009 en France, d'après les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, 18 097 patients ont bénéficié d'une congélation de spermatozoïdes afin de préserver leur fertilité et 1161 hommes ont congelé leurs spermatozoïdes en vue de don.

2. La congélation des ovocytes

▪ **Caractérisation / nature du procédé**

Le procédé consiste à réaliser au laboratoire la congélation d'ovocytes dans le but de pouvoir les conserver à basse température (cryoconservation).

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

- La première naissance obtenue après congélation « lente » d'embryons humains a été publiée en 1984, faisant suite à une large expérimentation animale. Cette technique a été appliquée aux ovocytes, mais avec des résultats moins bons que pour les embryons: les ovocytes ponctionnés à l'issue de la stimulation sont en métaphase II, ce qui représente un état instable, les microtubules sur lesquels sont accrochés les chromosomes subissant une dépolymérisation au cours du refroidissement lent. Cette congélation dite « lente » comprend l'utilisation de concentrations relativement faibles de cryoprotecteurs et un refroidissement très progressif (0.3°C/min) jusqu'à une température d'au moins - 30°C suivi d'une descente rapide en température jusqu'à -150°C .

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

Le procédé consiste à refroidir les ovocytes jusqu'à la température de l'azote liquide : - 196°C.

Les principales étapes sont :

3. Au laboratoire, exposition des ovocytes à des solutions de congélation contenant des cryoprotecteurs en concentration croissante;
4. Conditionnement des ovocytes dans des dispositifs spécifiques (paillettes) ;
5. Refroidissement des ovocytes de façon très progressive dans des congélateurs programmables ;
6. Stockage des ovocytes dans des containers d'azote liquide, pour une conservation de longue durée.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

La congélation lente des ovocytes est pratiquée depuis une vingtaine d'années, même si elle est restée peu utilisée en dehors de contraintes légales (Porcu et al, 2000; Fabbri et al, 2001).

En France, la congélation des ovocytes n'est pas de pratique courante dans les centres d'AMP, du fait d'indications médicales limitées et de l'efficacité médiocre de la congélation lente sur les ovocytes.

▪ **Perspectives offertes par la congélation ovocytaire**

Deux indications principales se dégagent:

- la préservation de la fertilité, si la femme doit subir un traitement stérilisant
- la constitution de banques d'ovocytes congelés, destinés au don de gamètes : cela permettrait de dissocier totalement la ponction ovarienne chez la donneuse, du transfert chez la receveuse, avec un nombre d'ovocytes mis en fécondation, défini à l'avance par l'équipe.

▪ Impact sur le nombre d'embryons conservés

La possibilité de congeler des ovocytes permettrait en théorie de réduire le nombre d'embryons cryoconservés en diminuant le nombre d'ovocytes « frais » mis en fécondation.. Toutefois il n'est pas aisé d'anticiper sur le nombre d'embryons obtenus à partir d'un nombre limité d'ovocytes mis en fécondation. L'idéal serait de mettre en fécondation un seul ovocyte et de transférer l'embryon ainsi obtenu mais cet idéal se rencontre peu souvent en pratique. Les situations sont souvent plus complexes sans qu'on puisse les anticiper :

- la tentative peut générer des embryons surnuméraires (au-delà du nombre que l'on souhaite transférer) et ils seront congelés. Ces embryons congelés viendront compliquer la situation ultérieure du couple qui disposera à la fois d'ovocytes et d'embryons congelés, ne pouvant pas les réutiliser dans le même temps

la tentative du fait du nombre restreint d'ovocytes mis en fécondation ne permettra pas de concevoir un seul embryon et ne sera pas suivi de transfert embryonnaire. Une nouvelle tentative avec mise en fécondation d'un nombre à nouveau restreint d'ovocytes sera nécessaire et la procédure sera répétée tant que le couple disposera d'ovocytes conservés.

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de congélation des gamètes serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés, en application de l'article du décret du 14 mars 2012.

Amélioration du procédé biologique d'AMP de congélation des gamètes

La vitrification des ovocytes

▪ Caractérisation / nature du procédé

La vitrification est une technique de congélation des ovocytes qui vient améliorer le procédé biologique de congélation des gamètes appliqué aux ovocytes en vue de cryoconservation. Technique ultra-rapide de congélation, elle aboutit à la constitution d'un état vitreux et évite la formation de cristaux de glace intracellulaires inhérents à la congélation lente, qui sont particulièrement délétères pour ce type de cellule. La vitrification nécessite l'adjonction de cryoprotecteurs à concentration élevée. Les vitesses de refroidissement sont de l'ordre de 20 000°/minute en systèmes dits « ouverts », où l'ovocyte se trouve momentanément au contact de l'azote liquide et de 2 000°/minute en systèmes dits « fermés », où l'ovocyte n'entre pas en contact direct avec l'azote, ce qui représente une plus grande sécurité sanitaire.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

De nombreuses publications scientifiques internationales démontrent l'efficacité supérieure de ce procédé sur la congélation classique, dite « lente ». A ce jour, plusieurs milliers d'enfants sont nés à l'étranger après fécondation d'ovocytes préalablement vitrifiés. La vitrification ovocytaire n'a été mise en œuvre dans les centres d'AMP qu'à partir du moment où la loi du 7 juillet 2011 l'a spécifiquement autorisée. Une première naissance française vient d'être rapportée.

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

La technique de vitrification reproduit les étapes décrites dans la fiche procédé « congélation des gamètes » Chapitre 2. Congélation des ovocytes en y apportant les modifications suivantes :

- Exposition à des concentrations supérieures de cryoprotecteurs, souvent associés entre eux pour en diminuer les concentrations ;
- Utilisation de dispositifs de conditionnement des ovocytes différents des paillettes classiques. Deux systèmes sont opérationnels, systèmes fermés et systèmes ouverts. Des aménagements de ces systèmes permettent d'éviter le contact direct avec un azote liquide qui ne présenterait pas les garanties d'asepsie nécessaires pour la congélation et la cryoconservation au long cours ;
- Refroidissement ultra rapide des ovocytes par immersion dans l'azote liquide.

▪ Données arguant sur la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

La vitrification ovocytaire, bien que rapportée dès les années 1990 dans l'espèce humaine (Vanderzwalmen et al, 1997), a connu un véritable essor depuis les années 2000 avec le développement de nouveaux supports de congélation-conservation (Al-Hasany *et al*, 2007 ; Vajta B *et al*, 2006). Une publication récente [Cobo et al, 2011] associant les données de 2 équipes, espagnole et américaine, utilisant des ovocytes vitrifiés dans un programme de don d'ovocytes, a montré que sur plus d'un millier de cycles, le taux de fécondation des ovocytes décongelés est d'environ 75%, le taux d'implantation de 40%, et le taux de grossesses cliniques par transfert de 55%. Plus récemment une étude de cohorte observationnelle réalisée dans trois centres a souligné l'impact de l'âge des patientes et du nombre d'ovocytes vitrifiés sur le résultat [Rienzi et al, 2012]

Une méta-analyse également récente (Cobo et al, 2011), portant sur des essais randomisés, a confirmé la supériorité de la technique de vitrification sur celle de congélation lente en termes de survie ovocytaire (Odds ratio : O.R. = 2,46), taux de fécondation (O.R. = 1,50), taux d'embryons de haute qualité (O.R. =

3,32). Les taux de fécondation et de grossesses cliniques n'étant pas différents entre les groupes « ovocytes vitrifiés » et « ovocytes frais ».

Les données actuelles portant sur plusieurs milliers d'enfants nés après fécondation d'ovocytes qui ont été cryoconservés par vitrification, ne montre pas un taux d'anomalies différent de celui observé pour n'importe quelle technique d'AMP.

▪ **La limitation du nombre d'embryons conservés**

La congélation des ovocytes est destinée à répondre à des indications médicales comme la préservation de la fertilité ou utilisée pour faciliter l'organisation du don d'ovocytes. Utilisée dans le cadre de l'AMP intra conjugale, en limitant volontairement le nombre d'ovocytes mis en fécondation et ainsi le nombre d'embryons conçus et cryoconservés, la congélation des ovocytes peut apparaître comme une alternative à la congélation embryonnaire.

Depuis 2004 en Italie, la loi interdit de congeler des embryons humains et limite le nombre d'ovocytes mis en fécondation au nombre d'embryons que l'on souhaite obtenir pour le transfert. Après des années d'expérience de congélation ovocytaire avec différentes techniques, devant un taux de grossesses multiples significativement augmenté, cette stratégie apparait à l'évidence comme à la fois un leurre et un danger. Une modification du cadre légal s'est récemment imposée au législateur italien.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique de vitrification des gamètes peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des améliorations des procédés biologiques d'AMP autorisés.

La congélation des tissus germinaux

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

Le tissu germinale est le tissu qui est situé dans la gonade féminine (l'ovaire) ou masculine (le testicule) et qui renferme les cellules germinales. Les cellules germinales sont les cellules du testicule ou de l'ovaire dont la maturation aboutit aux gamètes féminins (les ovocytes matures) ou masculins (les spermatozoïdes).

La congélation des tissus germinaux est un procédé biologique qui vise à conserver par congélation tout ou partie d'une gonade féminine ou masculine afin de préserver la fertilité d'un individu, lorsque celle-ci risque d'être altérée par une pathologie ou un traitement particulièrement toxique pour son tissu germinale.

Seront successivement évoqués la congélation du tissu ovarien et la congélation du tissu testiculaire.

1. La congélation du tissu ovarien

La congélation du tissu ovarien consiste à prélever un ovaire ou des fragments d'ovaire afin de protéger par congélation les follicules ovariens primordiaux qui contiennent les ovocytes immatures et qui sont à la fois le support de la production des hormones féminines et de la fertilité de la femme.

▪ Données de la littérature / antériorité

La mise au point de ce procédé biologique a été réalisé dans les années 1950 chez les rongeurs (Parkes et al., 1953). En 1960, Parrott obtient la première naissance de souris après greffe de tissu ovarien décongelé. Un regain d'intérêt pour la congélation du tissu ovarien apparaît dans les années 1990. Les améliorations de ce procédé biologique seront réalisées jusqu'à nos jours chez différents mammifères (souris, brebis, primates..).

Dans l'espèce humaine, la congélation du tissu ovarien a été rapportée pour la première fois au Royaume Uni en 1996 (Bahadur et al., 1996). Otkay et al. (1998) définissent la congélation du tissu ovarien comme un procédé biologique permettant de préserver la fertilité de la femme. La première naissance d'un enfant après greffe de tissu ovarien décongelé a été rapportée en 2004 par l'équipe de Donnez (Donnez et al., 2004). A l'heure actuelle, plus de 30 greffes de tissu ovarien¹ décongelé ont été réalisées en Europe (Schmidt et al., 2011), et 15 naissances ont été rapportées à travers le monde (Donnez and Dolmans, 2011).

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

La procédure de congélation du tissu ovarien comporte plusieurs étapes :

- **la validation de l'indication** qui est réalisée au cours d'une concertation pluridisciplinaire rassemblant les praticiens prenant en charge la pathologie de la patiente et le biologiste de la reproduction,
- **le prélèvement du tissu ovarien** qui consiste à prélever un ovaire entier ou des fragments d'ovaire au cours d'une intervention chirurgicale réalisée le plus souvent par coelioscopie. L'intervention est soit réalisée spécifiquement pour le prélèvement de l'ovaire, soit le plus souvent associée à un geste chirurgical prévu dans le contexte de la maladie (mise en place d'une chambre implantable ou d'un cathéter central, résection d'une masse tumorale...). Les complications de l'acte chirurgical sont celles de la coelioscopie et du prélèvement lui-même. Ainsi, les risques de complications sont faibles et les suites opératoires sont le plus souvent

¹ A noter que la greffe de tissus ovariens est actuellement envisagée en France dans le cadre de protocoles de recherches biomédicales, autorisés par l'AFSSAPS. Un protocole est actuellement en cours de réalisation.

simples. La laparotomie sera utilisée de manière plus exceptionnelle en présence de contre-indications à la coelioscopie ou si elle s'impose dans la prise en charge thérapeutique de la pathologie. Dans ce contexte, les risques ajoutés sont ceux liés uniquement au prélèvement ovarien,

- **le transport du tissu ovarien** qui doit être réalisé dans les plus brefs délais dans la glace fondante vers le laboratoire spécialisé en cryobiologie assurant la congélation du tissu ovarien,
- **la préparation du tissu ovarien** qui consiste à isoler au sein de l'ovaire la zone périphérique appelée cortex. Cette zone sera alors découpée en petits fragments qui seront déposés dans un petit tube contenant un milieu cryoprotecteur,
- **la congélation du tissu ovarien** qui consiste actuellement à descendre lentement la température à l'aide d'un appareil de congélation automatique et programmable jusqu'à une température comprise entre -80°C et -150°C . Les fragments sont ensuite stockés dans l'azote liquide à -196°C jusqu'à leur utilisation,
- **la conservation du tissu ovarien** qui s'effectue dans l'azote liquide à une température de -196°C et qui peut s'étendre sur une longue période de quelques années pour les patientes les plus âgées et en âge de procréer à plus de vingt années pour les patientes les plus jeunes.
- **l'examen anatomo-pathologique** qui est réalisé sur un fragment de cortex ovarien avant ou après décongélation ainsi que sur une autre partie du tissu ovarien qui n'est pas congelé appelée la médullaire. Cet examen a pour but de vérifier la richesse du tissu en follicules primordiaux et de détecter une éventuelle localisation secondaire de la maladie, si la patiente présente une pathologie tumorale.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

La congélation du tissu ovarien est réalisée depuis 1996 et se développe dans la majorité des pays depuis le début des années 2000. En France, elle s'est développée depuis la fin des années 1990. L'arrêté du 3 août 2010 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en Assistance Médicale à la Procréation (article III-4) définit les conditions dans lesquelles la conservation des gamètes et des tissus germinaux à usage autologue peut être appliquée.

En France, d'après les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, 1296 autoconservations de tissu ovarien étaient en cours au 31/12/2010.

2. La congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

Chez l'homme adulte, la congélation de tissu testiculaire se résume à la congélation de spermatozoïdes extraits des biopsies chirurgicales selon des modalités déjà décrites dans la procédure biologique de la congélation des gamètes. En effet l'observation après la puberté d'une spermatogenèse complète permet d'envisager d'emblée la conservation de la cellule germinale mature, c'est-à-dire le gamète.

Il n'en est pas de même chez le garçon pré-pubère où la spermatogenèse n'a pas encore démarré. La congélation du tissu testiculaire consiste à prélever un ou plusieurs fragments de testicule sur un ou deux testicules afin de protéger par congélation les tubes séminifères contenant les cellules germinales immatures et les cellules de Sertoli support de la fertilité de l'homme ainsi que les cellules de Leydig support de la production des hormones masculines.

▪ **Données de la littérature / antériorité**

La congélation du tissu testiculaire a initialement été rapportée chez les rongeurs et les primates (Izadyar et al., 2002, Schlatt et al., 2002). En 2004, Bahadur rapporte les premiers essais de congélation de tissu testiculaire chez des adolescents avec un procédé qui ne garantit pas cependant la fonctionnalité du tissu après décongélation. En revanche, Keros et al. (2005) décrit le procédé de congélation de tissu testiculaire à partir de tissus testiculaires humains adultes et Kvist et al. (2006) rapporte pour la première fois la congélation de tissu testiculaire humain prépubère.

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

La procédure de congélation du tissu testiculaire comporte les mêmes étapes que celles décrites pour la congélation du tissu ovarien, seules les étapes du prélèvement et de l'examen anatomopathologique sont différentes pour le tissu testiculaire. La congélation proprement dite suit une procédure adaptée au tissu testiculaire.

Le prélèvement du tissu testiculaire consiste à prélever un ou plusieurs fragments tissulaires sur un ou deux testicules au cours d'une intervention chirurgicale qui est soit isolée ou soit le plus souvent associée à un geste chirurgical prévu dans le contexte de la maladie. Les complications de l'acte chirurgical sont celles du prélèvement testiculaire lui-même, si celui-ci est isolé.

L'examen anatomo-pathologique est réalisé sur un fragment de tissu testiculaire avant ou après décongélation. Cet examen a pour but de vérifier la richesse du tissu en cellules germinales immatures, la bonne qualité de conservation du tissu après décongélation et de détecter une éventuelle localisation secondaire de la maladie, si le patient présente une pathologie tumorale.

▪ **Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

La congélation du tissu testiculaire est un procédé biologique plus récent que la congélation du tissu ovarien mais a respecté les mêmes étapes de validation que celles utilisées pour le tissu ovarien.

Aucune utilisation de tissu testiculaire humain décongelé n'a été rapportée à ce jour car il intéresse principalement des enfants et jeunes adolescents qui n'ont pas encore atteint l'âge adulte et n'ont donc pas encore de projet parental. En revanche, les utilisations du tissu testiculaire décongelé ont déjà été validées dans différentes espèces animales et principalement chez les rongeurs. Il s'agit de la greffe de tissu testiculaire (Shinoara et al., 2002), de la transplantation des cellules germinales (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) et de la spermatogenèse in vitro (Sato et al., 2011).

De 2005 à 2010 en France, les rapports annuels d'activité des centres d'AMP que collige l'Agence de la biomédecine, concernent les conservations de tissu testiculaire réalisées, chez des sujets adultes et pré-pubères.

En l'état des connaissances, le procédé de congélation des tissus germinaux respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme ou l'homme.

Dans ces conditions, le procédé de congélation des tissus germinaux serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés, en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.

La congélation des zygotes et embryons humains

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

Le procédé consiste à réaliser au laboratoire la congélation d'un (de plusieurs) zygote(s) ou embryon(s) dans le but de pouvoir les conserver à basse température (cryoconservation). Le terme zygote s'applique à l'ovocyte fécondé au stade des pronuclei ; le terme embryon s'applique à l'embryon préimplantatoire, (embryon clivé précoce âgé de 2 ou 3 jours, ou blastocyste au 5^{ème} ou 6^{ème} jour du développement).

La congélation dite « lente » comprend l'utilisation de concentrations relativement faibles de cryoprotecteurs et un refroidissement très progressif (0.3°C/min) jusqu'à une température d'au moins -30°C suivi d'une descente rapide en température jusqu'à -150°C.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

La congélation/décongélation dite « lente » est appliquée depuis plus de vingt ans en routine dans les laboratoires d'AMP (Trounson et al., 1983 ; Zeilmaker et al., 1984) ; Les premières naissances obtenues après congélation de l'embryon chez l'humain ont été publiées en 1984 (Zeilmaker et al., 1992), après une large expérimentation animale.

Cette technique a été adoptée en routine, comme corollaire de la FIV avec stimulation ovarienne, afin de préserver les embryons dits « surnuméraires » pour un éventuel transfert différé.

Les premiers enfants nés après congélation/décongélation lente embryonnaire ont été rapportés en 1984 par Zeilmaker et al. Depuis, cette méthode a été appliquée de façon large dans les laboratoires d'AMP à travers le monde pour la congélation des embryons humains obtenus en FIV/ICSI au stade clivé ou blastocyste. Les suivis des naissances et des enfants nés après transfert intra-utérin d'embryon(s) congelé(s)/décongelé(s) montrent qu'ils sont en bonne santé et une absence d'augmentation de malformations néonatales, comparé à la population générale (Wennerholm, 2000 ; Wennerholm et al., 2009).

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

Le principe de la congélation lente est une déshydratation lente et progressive de l'embryon par l'utilisation de cryoprotecteurs à faible concentration et par l'application d'une descente en température lente et contrôlée.

Les principales étapes sont :

3. Au laboratoire, exposition des zygotes ou embryons à une solution de congélation contenant des cryoprotecteurs,
4. Conditionnement des zygotes ou embryons dans des dispositifs spécifiques (par exemple paillettes),
5. Refroidissement des zygotes et embryons soit de façon progressive dans des congélateurs programmables (congélation lente),
6. Rangement des zygotes et embryons dans des containers d'azote liquide ou tout autre système permettant le maintien de basses températures ($\leq -150^{\circ}\text{C}$), pour une conservation de longue durée.

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

La congélation lente embryonnaire est réalisée en routine depuis plus de 25 ans dans tous les pays du monde qui pratiquent l'AMP.

En France, environ 25% des tentatives de FIV/ICSI sont suivies d'une congélation de 3.5 embryons en moyenne. En 2010, il y a eu, en France, 19 108 transferts d'embryons congelés (TEC) aboutissant à environ 19% de grossesse par transfert et à la naissance de 2 678 enfants vivants (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

En France, la congélation d'embryon(s) est une activité encadrée soumise à autorisation depuis 1994. Elle obéit aux règles générales fixées par décret depuis 1995 et par l'arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques en AMP depuis 1999. Un dispositif d'AMP vigilance a été mis en place par l'Agence de la biomédecine en 2008 (décret du 19 juin 2008).

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

Parmi les évolutions observées ces dernières années dans le domaine de l'AMP, le nombre moyen des embryons transférés par transfert (transfert immédiat et transfert d'embryons congelés) diminue progressivement. Cette évolution contribue ainsi à l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité. En 2010, en transfert d'embryons congelés en intra conjugal, la moyenne du nombre d'embryons transférés est de 1.6 (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de congélation embryonnaire serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.

Amélioration du procédé biologique d'AMP de congélation des zygotes et embryons

La vitrification des zygotes et des embryons

▪ **Caractérisation / nature du procédé**

La vitrification est une technique de congélation qui vise à améliorer le procédé biologique de Congélation des zygotes et embryons humains en vue de cryoconservation. Technique ultra-rapide de congélation, elle aboutit à la constitution d'un état amorphe et évite la formation de cristaux intracellulaires inhérents à la congélation lente, qui peuvent être particulièrement délétères.

La vitrification nécessite l'adjonction de cryoprotecteurs à concentration élevée. Les vitesses de refroidissement sont de l'ordre de 20 000°/minute en systèmes dits « ouverts » et de 2 000°/minute en systèmes dits « fermés ».

▪ **Données de la littérature / antériorité, enfants nés**

Lors du processus de congélation, la formation de cristaux de glace intra- et extra-cellulaires peut endommager la structure et les fonctions des cellules constituant l'embryon (Son et al., 2009). La vitrification/réchauffement des embryons est d'application plus récente et vise à limiter ces effets délétères.

Les travaux rapportés initialement chez l'animal (Rall and Fahy, 1985) puis chez l'Homme (Kasai and Mukaida, 2003 ; Youssry , 2007) plus récemment, tendent à démontrer que la vitrification est une méthode de congélation embryonnaire innovante pouvant représenter une alternative efficace à la congélation lente (Liebermann et al., 2002 ; El-Danasouri and Selman, 2001 ; Vajta and Nagy, 2006).

Compte-tenu de ces éléments, la technique de vitrification des embryons humains est utilisée aujourd'hui de façon courante dans des laboratoires d'AMP à travers le monde comme par exemple au Japon (Mukaida et al., 2003 ; Takahashi et al., 2005 ; Kuwayama et al., 2007 ; Mukaida et al., 2009), en Belgique (Vanderzwalmen et al., 2006 ; Van den Abbeel, 2009) ou aux Etats Unis (Liebermann, 2009).

Les études comparant les résultats obtenus après congélation/décongélation lente et vitrification/réchauffement d'embryons humains tendent à montrer que les taux de survie embryonnaire post-décongélation et de grossesses évolutives sont plus élevés après vitrification/réchauffement des embryons aussi bien au stade clivé (Stehlik et al., 2005 ; Rama Raju et al., 2005 ; Balaban et al., 2008 ; Loutradi et al., 2008 ; Son et al., 2009) qu'au stade blastocyste (Liebermann et al., 2006 ; Stehlik et al., 2005 ; Kuwayama et al., 2005 ; Son et al., 2009).

▪ **Procédure, modes opératoires, étapes critiques**

La technique de vitrification des embryons ou zygotes reproduit les étapes décrites dans le procédé Congélation des zygotes et embryons humains en y apportant les modifications suivantes :

- Exposition à des concentrations plus élevées de cryoprotecteurs ;
- Conditionnement dans des dispositifs spécifiques, systèmes ouverts ou fermés ;
- Refroidissement ultrarapide par immersion directe dans l'azote liquide.

▪ **Données arguant sur la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé**

La vitrification embryonnaire, bien que déjà rapportée dès les années 1990 dans l'espèce humaine (Vanderzwalmen et al, 1997), a connu un véritable essor depuis les années 2000 et le développement de nouveaux supports de congélation-conservation (Al-Hasany *et al*, 2007 ; Vajta B *et al*, 2006).

L'expérience de vitrification est importante à l'étranger et donne des résultats souvent bien supérieurs à ceux de la congélation lente. De très nombreuses publications et communications scientifiques font état de plusieurs centaines d'enfants nés dans le monde sans que soient mises en évidence des pathologies

congénitales induites (Desai, 2007 ; Balaban *et al.*, 2008 ; Raju *et al.*, 2008. Les données disponibles indiquent un taux de survie des embryons après décongélation et un taux de grossesse supérieurs à ceux de la congélation lente en particulier pour ce qui concerne la congélation de blastocystes.

Pratiquée depuis plusieurs années en routine à l'étranger, la vitrification embryonnaire n'est appliquée que depuis décembre 2010 dans les laboratoires d'AMP français.

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

Parmi les évolutions observées ces dernières années dans le domaine de l'AMP, le nombre moyen des embryons transférés par transfert diminue progressivement. Cette évolution, si elle ne contribue pas à diminuer le nombre des embryons conservés, contribue largement à l'amélioration de la sécurité des pratiques au bénéfice premier des patients, de la santé de la mère et des enfants.

En l'état des connaissances, cette amélioration d'un procédé existant respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, la technique de vitrification des embryons et des zygotes peut faire l'objet d'une inscription sur la liste des améliorations des procédés biologiques d'AMP autorisés.

La maturation *in vitro* des ovocytes (MIV)

▪ Nature du procédé biologique d'AMP

Le procédé consiste à faire mûrir *in vitro* des ovocytes prélevés à l'état immature en vue de fécondation *in vitro* ou de cryoconservation.

▪ Données de la littérature / antériorité, enfants nés

La capacité des ovocytes immatures à mûrir lorsqu'ils sont placés dans certaines conditions au laboratoire, est connue depuis 1935 (Pincus). Leur maturation finale est possible *in vitro* en 48h. De nombreuses expérimentations ont validé chez l'animal le procédé de MIV (Edwards 65, Eppig 92).

Dans l'espèce humaine, les premières naissances conçues grâce à la MIV ont été rapportées dès 1983 (Veek 83, Cha 91).

Au cours d'un cycle de fécondation *in vitro*, le traitement d'hyperstimulation ovarienne préalable et l'injection déclenchante de l'ovulation induisent la maturation finale des ovocytes et permettent de prélever une cohorte d'ovocytes matures et fécondables.

Au cours d'un cycle de MIV, les ovocytes, prélevés à l'état immature en dehors de toute hyperstimulation ovarienne, acquièrent cette maturation finale *in vitro* (Cha 91, Trounson 94, Barnes 96, Russel 97).

La maturation *in vitro* totale des ovocytes issus de follicules très jeunes, follicules primordiaux ou primaires, n'a pas encore été obtenue dans l'espèce humaine.

▪ Procédure, modes opératoires, étapes critiques

Après une étape de stimulation ovarienne à très faibles doses, un prélèvement ovocyttaire est effectué.

Les étapes du procédé biologique de maturation des ovocytes *in vitro* consistent en :

- la mise en culture des ovocytes avec des milieux spécifiques pendant 1 à 2 jours après le prélèvement (le plus souvent la maturation est atteinte en moins de 36h - Trounson 94, Russel 97) ;
- l'observation des ovocytes afin de repérer l'apparition du globule polaire, signe de maturité de l'ovocyte.

On applique ensuite aux ovocytes matures les procédures habituelles de la fécondation *in vitro* avec ICSI.

▪ Données arguant de la sécurité, l'efficacité, l'innocuité du procédé

En France, la MIV est évaluée chaque année grâce aux données agrégées des rapports annuels d'activité transmis à l'Agence de la biomédecine par les centres d'AMP. Ces données permettent de décrire au niveau national l'activité de MIV.

La MIV est peu développée, exclusivement mise en place dans des indications rares (syndrome des ovaires polykystiques, contre-indication à l'hyperstimulation ovarienne du fait du risques cardiovasculaires, d'antécédents de tumeur hormono-dépendante, préservation de la fertilité avec cryoconservation des ovocytes immatures et maturation *in vitro* secondaire ou volonté de réduire les effets secondaires des traitements ou les coûts).

Ainsi en 2010, le recours à la MIV a concerné 130 tentatives (ICSI et TEC) et 13 enfants en sont nés (données préliminaires 2010 de l'Agence de la biomédecine).

Les chances de succès restent inférieures à celles des ICSI au cours desquelles sont prélevés des ovocytes matures.

Selon les publications, ce sont plus de 400 enfants qui ont été conçus grâce à la MIV dans le monde. Les chiffres sont vraisemblablement 3 fois plus importants (Suikkari 2008).

Les enfants sont a priori bien portants ; cependant, les études disponibles sur leur état de santé portent sur de petites séries ; elles sont rassurantes (Mikkelsen 2003, Shu-Chi 2006 ...).

Il n'y a pas eu de déclaration d'évènement indésirable lié à la MIV dans le dispositif d'AMP vigilance.

▪ **Impact sur le nombre d'embryons conservés**

La MIV n'est pas destinée à limiter le nombre des embryons conservés mais à limiter le recours et les effets néfastes de l'hyperstimulation ovarienne. Cependant, le nombre d'ovocytes matures obtenus et le nombre d'embryons conçus par ICSI est en général inférieur au nombre moyen d'embryons obtenus par les procédures conventionnelles.

En l'état des connaissances, le procédé respecte les principes fondamentaux de la bioéthique prévus aux articles 16 à 16-8 du code civil, l'efficacité, la reproductibilité du procédé ainsi que la sécurité de son utilisation pour la femme et l'enfant à naître.

Dans ces conditions, le procédé de maturation des ovocytes *in vitro* serait susceptible d'être inscrit sur la liste des procédés biologiques d'AMP régulièrement utilisés en application de l'article 3 du décret du 14 mars 2012.