

Le diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies est-il justifié pour permettre de limiter la vitrification embryonnaire ?

Is PGT-a justified to limit embryo freezing?

Clément Jimenez

Service de biologie de la reproduction, Cecos, CHU de Bordeaux et université de Bordeaux
<Clement.jimenez@chu-bordeaux.fr>

Résumé. Dans le contexte de la fécondation *in vitro* avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde, le diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies (DPI-A) sur ovocytes ou embryons est très controversé. Des études randomisées et contrôlées montrent pourtant que le DPI-A peut être bénéfique. Le transfert monoembryonnaire (eSET), qui s'est imposé en permettant d'éviter les grossesses multiples, conduit à l'élimination de tous les embryons dont le potentiel est jugé insuffisant. Ce procédé fait désormais consensus ; s'il ne permet pas nécessairement d'augmenter le taux de grossesse cumulé par tentative, il permet de réduire significativement les grossesses multiples et la durée de la prise en charge en assistance médicale à la procréation. L'application de l'eSET demande d'identifier et de sélectionner le meilleur embryon ; plusieurs méthodes existent, à cette fin, qui ne s'excluent pas les unes les autres ; le DPI-A en fait partie. Sa mise en œuvre, dans certaines indications, doit permettre non seulement d'améliorer la prise en charge des couples en AMP, mais également de limiter de manière significative le nombre d'embryons vitrifiés, par l'élimination des embryons aneuploïdes dont le pourcentage varie de 50 à plus de 75 %.

Mots clés : diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies (DPI-A), vitrification, aneuploïdie, monoembryonnaire (eSET)

Abstract. In the context of IVF/ICSI, preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) on oocytes or embryos is highly controversial. Yet, there are randomized controlled studies that show that PGT-A can be beneficial. Elective Single Embryo Transfer (eSET) becoming the rule to avoid multiple pregnancies leads to the elimination of all embryos whose potential is considered insufficient. There is a broad consensus on this policy, and while it does not necessarily increase the cumulative pregnancy rate per attempt, it can significantly reduce multiple pregnancies and the duration of ART management. To enable eSET, we need to identify and select the best embryo. For this purpose, there are several methods that do not exclude each other and PGT-A is one of them. Its implementation, in certain indications, should not only make it possible to improve the use of ART couples but also significantly reduce the number of vitrified embryos by eliminating aneuploid embryos, the percentage of which varies from 50% to more than 75%.

Key words: PGT-A, vitrification, aneuploidy, eSET

Depuis les débuts de la fécondation *in vitro* (FIV), les grossesses multiples et leurs cortèges de complications constituent un sujet de préoccupation majeur. Devenues un problème de santé publique, il en a souvent été fait grief aux spécialistes de la FIV. La stratégie du transfert monoembryonnaire (eSET) permet d'éviter les grossesses multiples, mais suppose que l'on soit en mesure d'identifier les embryons présentant le meilleur potentiel de développement, pour maintenir des taux de

grossesse satisfaisants. Il importe donc d'améliorer les méthodes de prédiction des naissances vivantes. Aujourd'hui, les marqueurs de qualité embryonnaire disponibles ne permettent qu'un choix imparfait du « bon embryon ». Par ailleurs, la congélation embryonnaire – qui, grâce à la vitrification, est devenue fiable – est consommatrice de temps, et a un coût important ; il est donc logique de la réserver aux embryons dont le potentiel est jugé suffisant. Dans ces conditions, l'application de

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : C. Jimenez

toute technique de sélection des embryons permettant de ne congeler que ceux dont le potentiel est réel et d'éliminer les autres, serait parfaitement justifiée. Le diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies (DPI-A), s'il était efficace, serait un outil d'amélioration de la sélection des embryons. Dans ce contexte, le DPI-A des ovocytes et des embryons est très controversé. Ses partisans sont les médecins et les scientifiques qui utilisent la technique, quand ses opposants ne sont parfois pas même impliqués dans les âpres débats publics internationaux. Ce différend dure depuis des années et les discussions opposant défenseurs et contempteurs du DPI-A sont presque des standards dans les conférences internationales de spécialistes sur le sujet. En France, le débat ne peut être que théorique, puisque le DPI-A est interdit et qu'il est fort peu probable qu'il soit autorisé lors de la prochaine révision de la loi de bioéthique.

Efficiences du diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies

Le DPI-A est dérivé du diagnostic génétique préimplantatoire (DPI). Le DPI a été introduit à la fin des années 1980 pour les couples fertiles à risque de transmission de maladies récessives liés à l'X [1, 2]. Les embryons cultivés *in vitro* étaient analysés pour une maladie monogénique et seuls les embryons indemnes étaient transférés. Le développement du DPI, dans les années 1990, a été rendu possible par trois facteurs clés :

- la FIV, qui permet l'accès aux embryons *in vitro*,
- la PCR, qui permet l'amplification de l'ADN extrait d'une seule cellule,
- la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), qui permet la détection des anomalies chromosomiques.

Au cours des dernières décennies, les techniques génétiques ont évolué depuis le diagnostic des maladies monogéniques jusqu'à un large éventail d'indications incluant les maladies génétiques héréditaires, les remaniements chromosomiques et les aneuploïdies [3].

En ce qui concerne le dépistage des aneuploïdies, la biopsie du globule polaire a été initialement proposée par Verlinsky *et al.* [4]. Le contenu chromosomique du deuxième globule polaire est en effet en miroir de celui de l'ovocyte. Cette analyse ne permet donc le dépistage que des aneuploïdies d'origine maternelles.

En 2012, La Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE) a promu un essai clinique randomisé multicentrique international, en vue d'évaluer l'analyse du globule polaire par puce à ADN. L'étude a consisté, lors d'une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) réalisée chez des femmes de 36 à 40 ans, à faire l'analyse des chromosomes du premier et

du deuxième globule polaire, puis à sélectionner les embryons considérés comme euploïdes pour les transférer, et ce afin de vérifier si cela permettait d'augmenter les chances de naissance par rapport à l'ICSI réalisée sans analyse chromosomique. Entre juin 2012 et décembre 2016, 205 ICSI ont constitué le groupe d'étude et 191 le groupe contrôle. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence statistiquement significative, avec un taux de naissances vivantes équivalent dans les deux groupes : 24 *versus* 23,6 %. Cette étude a conduit à conclure que l'analyse chromosomique des globules polaires par puce d'ADN pour la sélection des embryons euploïdes ne permettait pas d'augmenter les chances de succès. Néanmoins, le résultat obtenu dans le groupe DPI-A l'avait été avec moins d'embryons transférés et moins de fausses couches (FCS), ce qui constitue un bénéfice clinique non négligeable [5].

La première étude de DPI-A réalisée sur un embryon de J3 avec la technique FISH a été publiée au milieu des années 1990 [6]. Par la suite, bien que de nombreux articles aient souligné le bénéfice du DPI-A [7-10], d'autres publications [11, 12] ont mis en évidence des erreurs de diagnostic rendant cette approche difficile et l'associant à un risque d'erreur élevé. Finalement en 2007, une étude multicentrique randomisée en double aveugle comparant trois cycles de FIV avec ou sans DPI-A chez des femmes âgées de 35 à 41 ans a démontré que le DPI-A réalisé avec la technique FISH n'était pas efficace [13]. Pire encore, cette étude a révélé que le DPI-A avait un effet délétère, puisque le taux de naissances vivantes était plus faible dans le groupe qui en avait bénéficié que dans le contrôle (24 *versus* 35 %). Cette observation a reçu confirmation quelques années après, avec la publication d'une méta-analyse d'essais contrôlés randomisés [14]. À la suite de l'étude de 2007, la Société américaine de médecine de la reproduction (ASRM) et l'ESHRE ont publié des avis formels contre le DPI-A [15, 16]. Ces résultats plutôt décourageants trouvaient une explication dans le fait que les analyses d'embryon étaient réalisées au stade de clivage, où il existe un taux très élevé de mosaïcisme [17, 18]. Scott *et al.* [19] ont ainsi rapporté qu'environ 30 % des embryons analysés au stade du clivage sont mosaïques ; ils ont également montré que la biopsie réalisée au stade de clivage est délétère, alors qu'elle ne l'est pas au stade de blastocyste [20]. Par ailleurs, la technique FISH réalisée sur seulement quelques chromosomes ne permet pas le diagnostic de toutes les aneuploïdies. À partir de ce constat, les scientifiques ont développé d'autres techniques d'analyse permettant d'évaluer le statut d'euploïdie des vingt-trois paires de chromosomes comme par exemple la puce d'hybridation génomique comparative (CGH-array), la PCR quantitative en temps réel (qPCR), la technique du polymorphisme du nucléotide simple (SNP) ou encore le séquençage de nouvelle génération (NGS). Les essais randomisés utilisant

ces nouvelles techniques, ainsi que la biopsie du trophoblaste au stade de blastocyste, se sont révélés être en faveur du DPI-A, et ce non seulement chez les femmes âgées de plus de 35 ans [21-23] mais également chez les patientes plus jeunes de bon pronostic [20, 24]. Enfin, une méta-analyse incluant sept essais, dont quatre randomisés, a montré des taux d'implantations, de grossesses et de naissances vivantes plus importants dans le groupe DPI-A [25]. Une autre, comportant huit essais dont trois randomisés, a également montré des taux d'implantations supérieurs dans le groupe DPI-A [26].

Les objectifs d'une prise en charge en assistance médicale à la procréation, la place de la vitrification

La politique de sélection des embryons obtenus en FIV/ICSI est désormais la règle dans pratiquement tous les centres d'AMP du monde. L'eSET, qui s'est également imposé pour éviter les grossesses multiples, conduit à l'élimination de tous les embryons dont le potentiel est jugé insuffisant. Cette politique fait l'objet d'un large consensus et, si elle n'entraîne pas nécessairement une augmentation du taux de grossesses cumulé par tentative, elle permet de réduire significativement les grossesses multiples et la durée de la prise en charge en AMP. La mise œuvre de l'eSET implique d'identifier et de sélectionner le meilleur embryon. Plusieurs méthodes sont disponibles, qui le permettent, telles que la culture prolongée jusqu'au stade de blastocyste, le *time lapse*, grâce à l'intégration des critères de cinétiques, et le DPI-A.

Quels doivent être les objectifs de la prise en charge en fécondation *in vitro* avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde ?

Le premier objectif recherché est d'augmenter le taux de grossesses. Sa réalisation implique que la probabilité de sélectionner un « bon » embryon soit suffisante. Ainsi, lors d'une tentative de FIV, si trois embryons sont au stade de blastocyste et que deux d'entre eux sont euploïdes (67 %), le DPI-A permet de sélectionner ces deux embryons et de disposer ainsi de 100 % d'embryons euploïdes. L'un sera transféré et l'autre congelé ; cela suppose cependant que le DPI-A soit réalisé rapidement, pour connaître son statut chromosomique avant de réaliser la vitrification. Dans ce cas, le DPI-A est parfaitement justifié, en ce qu'il permet d'augmenter les chances de succès et de limiter le nombre d'embryons vitrifiés. Dans l'hypothèse où un seul embryon évolué au stade de blastocyste est disponible, le DPI-A n'a plus beaucoup d'intérêt. Dans la situation où les trois

embryons sont euploïdes, le DPI-A n'apporte rien non plus. Même si le temps nécessaire pour parvenir au succès est plus long, les chances de réussite sont possiblement plus grandes après utilisation de tous les embryons non sélectionnés obtenus (transfert frais et après décongélation) qu'avec le transfert frais d'un embryon ayant fait l'objet d'un DPI-A. En effet, si cette idée est très controversée, il n'existe pas de données permettant de trancher définitivement le débat. Il reste que, chez une femme de 36 ans qui a bien répondu au traitement, avec de nombreux ovocytes, il est préférable pour elle que la probabilité de succès au premier transfert soit élevée, plutôt que subir un transfert frais « en aveugle » puis, en cas d'échec, ceux, plus ou moins nombreux, d'embryons décongelés. Dans ce contexte, le DPI-A a bien tout son sens et permet de réduire le nombre d'embryons vitrifiés. En 2017, Coates *et al.* [27] ont réalisé une étude randomisée et contrôlée comparant le transfert frais d'embryons sélectionnés par DPI-A avec NGS au transfert après *freeze all* des embryons biopsiés pour le DPI-A, également par NGS. Ils ont constaté que le taux de naissances vivantes est statistiquement plus important lorsque le transfert est réalisé sur un cycle non stimulé après décongélation. Cette étude ne remet pas en cause le fait que la connaissance des résultats du test génétique avant la décision de congélation des embryons, permet de diminuer le nombre d'embryons vitrifiés en éliminant tous les embryons aneuploïdes sans modifier les chances de succès.

– Un deuxième objectif est de diminuer le taux de FCS. Ce taux augmente avec l'âge, et sa cause principale est l'aneuploïdie de l'embryon. Le taux de grossesse diminue de façon drastique après 40 ans. Deux cas de figure peuvent se présenter :

- celui d'une femme de 37 ans qui a une bonne réponse ovarienne et qui a déjà fait trois FCS. Elle veut un enfant mais ne souhaite plus s'exposer au risque de FCS. Dans ce cas, le DPI-A a tout son intérêt et permet de limiter le nombre d'embryons vitrifiés,
- celui d'une femme âgée de 41 ans, dont la réserve ovarienne est diminuée, et chez qui le facteur temps est essentiel. Dans ce cas, le DPI-A peut permettre de gagner du temps en évitant notamment les FCS qui sont extrêmement fréquentes à cet âge.

– Un troisième objectif est d'éviter les grossesses multiples, déjà très largement évoquées. Limiter ce risque sans perdre trop de temps est possible, en associant la culture prolongée et le DPI-A qui limitera également le nombre d'embryons vitrifiés.

– Un dernier objectif est d'épargner à la femme des traitements inutiles. Le taux d'euploïdie embryonnaire est en moyenne de 50 % pour les patientes de moins de 35 ans, de 33 % entre 35 et 40 ans, de 25 % à 40 ans et de moins de 25 % après 40 ans. Le DPI-A peut donc permettre d'orienter le couple vers le don d'ovocyte, lorsqu'il y a eu de nombreux échecs d'implantation et que le DPI-A met

en évidence que la totalité des embryons obtenus sont aneuploïdes. Le DPI-A permet alors de limiter et le nombre d'embryons vitrifiés et les traitements inutiles.

Conclusion

Un médecin change sa pratique lorsque des méta-analyses avec des études randomisées contrôlées démontrent qu'une autre approche est plus efficace que la sienne, ou encore pour se conformer aux usages d'une grande majorité de ses collègues. Ce n'est pas encore le cas pour le DPI-A, mais, en fin de compte, une décision peut être parfaitement acceptable sur le plan éthique sans qu'elle s'appuie sur une méta-analyse ou même une étude, qui n'existent pas toujours. Il n'en demeure pas moins que plusieurs études cliniques randomisées indiquent qu'il est très probable que le DPI-A apporte un bénéfice aux patientes, si son indication est bien posée. Dans le même temps, la réalisation plus large du DPI-A conduira nécessairement à une diminution du nombre d'embryons vitrifiés dès l'instant que l'on est capable de connaître le statut chromosomique des embryons avant de procéder à leur vitrification.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Braude P, Pickering S, Flinter F, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet* 2002 ; 3 : 941-53.
2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990 ; 344 : 768-70.
3. Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, *et al.* Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011 ; 17 : 620-7.
4. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, *et al.* Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 1998 ; 15 : 285-9.
5. Verpoest W, Staessen M, Bossuyt P, *et al.* Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Hum Reprod* 2018 ; 33 : 1767-76.
6. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, *et al.* Pregnancies following preconception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in situ hybridization. *Hum Reprod* 1995 ; 10 : 1923-7.
7. Kahraman S, Bahçecı M, Sıamlı H, *et al.* Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000 ; 15 : 2003-7.
8. Milan M, Cobo AC, Rodrigo L, *et al.* Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010 ; 21 : 649-57.
9. Munne S, Fischer J, Warner A, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006 ; 85 : 326-32.
10. Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, *et al.* FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005 ; 11 : 497-506.
11. Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, *et al.* Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 1994 ; 11 : 132-43.
12. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, *et al.* The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009 ; 24 : 1221-8.
13. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, *et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 9-17.
14. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, *et al.* Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011 ; 17 : 454-66.
15. [No authors listed]. ACOG Committee Opinion No. 430: preimplantation genetic screening for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2009 ; 113 : 766-7.
16. Harper JC, Coonen E, De Rycke M, *et al.* What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : 821-3.
17. Mertzaniadou A, Wilton L, Cheng J, *et al.* Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70 % of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013 ; 28 : 256-64.
18. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, *et al.* Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009 ; 15 : 577-83.
19. Scott Jr RT, Upham KM, Forman EJ, *et al.* Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 624-30.
20. Scott Jr RT, Upham KM, Forman EJ, *et al.* Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 697-703.
21. Forman EJ, Hong KH, Ferr KM. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 100-7.
22. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 1400-7.
23. Schoolcraft WB, Surrey E, Minjarez D, *et al.* Comprehensive chromosome screening (CCS) with vitrification results in improved clinical outcome in women >35 years: a randomized control trial. *Fertil Steril* 2012 ; 98 : 1.

24. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, *et al.* Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012 ; 5 : 24.

25. Chen M, Wei S, Hu J, Quan S. Can comprehensive chromosome screening technology improve IVF/ICSI outcomes? A meta-analysis. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0140779.

26. Dahdouh EM, Balayla J, García-Velasco JA, *et al.* Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2015 ; 104 : 1503-12.

27. Coates A, Kung A, Mounts A, *et al.* Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017 ; 107 : 723-30.