

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur J. Lansac*

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

—
**tome XXIX
publié le 30.11.2005**



*VINGT-NEUVIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2005*

La maturation ovocytaire in vitro : intérêts, indications, résultats

T. FORGES, P. MONNIER-BARBARINO*
(Nancy)

INTRODUCTION

Lors de la différenciation de l'ovogonie en ovocyte, la première division méiotique est mise en route pour s'arrêter ensuite au stade diplotène de la prophase. L'ovocyte reste donc bloqué en prophase I, aussi bien au cours de la période de quiescence que pendant la phase de croissance, jusqu'au stade pré-ovulatoire, si tant est qu'il y parvienne, puisque seuls 300 à 400 follicules ovariens arriveront à ce stade ultime de leur développement au cours de la vie génitale d'une femme.

La survenue de la décharge pré-ovulatoire de gonadotrophines au milieu du cycle menstruel déclenche alors un ensemble de modifications morphologiques et biochimiques concernant à la fois le noyau et le cytoplasme de l'ovocyte et regroupées sous le terme de maturation ovocytaire. La reprise et la terminaison de la première division de la méiose constituent le phénomène le plus évident morphologiquement, puisque l'enveloppe nucléaire, formant la « vésicule germinale » visible au microscope jusqu'alors, va disparaître et que le premier globe polaire va être expulsé. Puis l'ovocyte va progresser jusqu'au

* Centre d'Assistance Médicale à la Procréation – Maternité Régionale Universitaire –
10 rue Dr Heydenreich – 54042 NANCY CEDEX

stade de métaphase de la deuxième division méiotique, dans lequel il restera de nouveau bloqué jusqu'à la fécondation.

Mais en plus de cette maturation nucléaire, d'autres modifications doivent survenir à la fois dans le cytoplasme ovocytaire qui deviendra celui du zygote et au niveau de la membrane ovocytaire dont les différenciations devront permettre la fixation d'un spermatozoïde et la fusion des gamètes. Au cours de cette maturation cytoplasmique, l'ovocyte va réorganiser la distribution de certains organites cellulaires et poursuivre les synthèses d'ARN qui serviront pendant les 2 à 3 premiers jours de vie de l'embryon, jusqu'à ce que le génome de ce dernier soit activé.

Ainsi, bien plus que de réduire simplement son matériel chromosomique et d'opérer les échanges entre chromosomes homologues, pour devenir un gamète haploïde génétiquement unique, l'ovocyte doit également acquérir au cours de cette maturation sa compétence au développement embryonnaire ultérieur. L'acquisition de cette compétence nécessite une collaboration étroite entre l'ovocyte et les cellules somatiques du follicule et en particulier celles du *cumulus oophorus*. Mise en route sous le contrôle endocrine des gonadotrophines, cette collaboration repose d'une part sur l'existence de systèmes de jonctions communicantes permettant l'échange de molécules-signal de petite taille (1), et d'autre part sur l'installation d'un dialogue biochimique, moyennant la sécrétion de facteurs auto- et paracrines (2-4). Le rôle des différents médiateurs intervenant dans le maintien, puis la suppression du blocage méiotique a fait l'objet de plusieurs revues récentes (5-7).

La compétence méiotique de l'ovocyte est acquise progressivement au cours de la croissance folliculaire : les ovocytes extraits de follicules antraux de lapine passent spontanément du stade de vésicule germinale au stade de métaphase II, alors que des ovocytes extraits de follicules pré-antraux ne reprennent pas leur méiose (8). Ainsi, dès 1935, la possibilité de recueillir des ovocytes immatures et de les amener *in vitro* à compléter leur méiose a été évoquée. L'idée de la maturation ovocytaire *in vitro* (MIV) était née.

Soixante-dix ans plus tard, la MIV n'en est toujours qu'à ses débuts. L'avènement de la fécondation *in vitro* (FIV) a permis de développer nos connaissances sur les mécanismes de la maturation ovocytaire. Cependant, si les débuts de la FIV faisaient appel à des cycles spontanés, l'efficacité supérieure des protocoles associant une inhibition des gonadotrophines hypophysaires par des agonistes ou des antagonistes de la GnRH et une stimulation ovarienne par de l'hMG ou de la FSH, a mis un frein considérable au développement

de la MIV. Ce n'est qu'à partir de la fin des années quatre-vingt que la MIV a connu un regain d'intérêt, notamment devant une plus grande sensibilisation des médecins et du public aux problèmes liés à la stimulation ovarienne, ainsi qu'à l'apparition du concept de traitements moins agressifs (« *patient-friendly stimulation* ») en assistance médicale à la procréation (AMP). En effet, le principe de la MIV repose sur le recueil d'ovocytes immatures chez des patientes qui n'ont été exposées à aucun traitement de stimulation ovarienne ou, éventuellement, à un traitement de courte durée et de faible dose. Le présent article fait le point sur les récentes évolutions dans le domaine de la MIV, et précise les indications et la mise en œuvre pratique dans l'état actuel de nos connaissances.

ÉVOLUTION DES PRATIQUES

Les premières tentatives de MIV de l'ovocyte humain ont été réalisées en 1965 par R. Edwards, le pionnier de la FIV, 13 ans avant la conception in vitro de Louise Brown. Il était alors possible de cultiver des ovocytes issus de biopsies d'ovaires non stimulés dans un milieu de culture additionné de sérum humain, pendant plus de 60 heures. La progression des ovocytes depuis le stade de vésicule germinale jusqu'au stade de métaphase II nécessitait au moins 40 heures dans ce modèle (9, 10). Quelques années plus tard, le même auteur réussit à féconder des ovocytes humains maturés in vitro et à obtenir des embryons (11).

La première naissance après MIV a été décrite en 1983 par l'équipe de L. Veeck. Ces auteurs ont recueilli, au cours de protocoles de FIV, des ovocytes restés immatures malgré la stimulation ovarienne et le déclenchement préalable à la ponction folliculaire par l'hCG. Sur les 74 ovocytes avec une vésicule germinale intacte, 86,5 % ont mûri jusqu'à l'expulsion du premier globule polaire, dans un milieu Ham F10 contenant 15 % de sérum fœtal humain. Après fécondation in vitro, deux grossesses ont été obtenues à partir des ovocytes maturés in vitro et un enfant normal est né (12).

En 1991, dans le cadre d'un don d'ovocytes, Cha rapporta la première naissance obtenue après MIV d'ovocytes recueillis délibérément à un stade immature. En effet, cette équipe ponctionnait les follicules de petite taille visibles à la surface de biopsies ovariennes ou de pièces d'ovariectomie. Après maturation dans un milieu Ham F10 additionné de 50 % de liquide folliculaire provenant de ponctions folliculaires pour

FIV, les taux de maturation et de fécondation étaient respectivement de 56 % et 81 %. Le transfert de 5 embryons chez une receveuse atteinte d'une défaillance ovarienne prématurée aboutit à une grossesse triple et à la naissance de 3 enfants sains (13).

Ces premières réussites ont encouragé d'autres auteurs à tenter le recueil d'ovocytes immatures chez des patientes qui présentent un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), dans lesquels de nombreux follicules de 2 à 10 mm de diamètre se trouvent en permanence sur les ovaires. Une équipe australienne a prélevé des ovocytes chez de telles patientes non stimulées, par ponction transvaginale échoguidée. Après 48 heures de culture dans un milieu supplémenté en sérum de veau fœtal, gonadotrophines et œstradiol, 81 % des ovocytes immatures avaient mûri, mais le taux de fertilisation n'était que de 35 %. Néanmoins, une grossesse a été obtenue et un enfant normal est né à partir de cette technique (Trounson et al. 1994). Le taux de fécondations a été amélioré grâce au recours à la micro-injection intracytoplasmique et c'est à partir de la deuxième naissance survenue dans cette même équipe (14) que la MIV a connu un essor grandissant dans la prise en charge des patientes porteuses d'un SOPK.

AVANTAGES ATTENDUS DE LA MIV

Les principaux avantages de cette technique découlent de l'absence de traitements hormonaux qui tout d'abord représentent un coût très important, correspondant à 34 % du coût total de la FIV en présence de gonadotrophines urinaires, et 46 % en utilisant des gonadotrophines recombinantes (15). Ensuite, la MIV annule le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO) qui reste la principale complication des protocoles de FIV, allant parfois jusqu'à mettre en jeu le pronostic vital de la patiente (16). Il en est de même des éventuels risques à long terme des stimulations ovariennes, notamment sur le plan carcinologique, étant donné que la possibilité d'un risque accru de cancer de l'ovaire ou du sein a été évoquée, mais non encore confirmée, chez les patientes ayant eu recours à des traitements d'AMP (17-19). De plus, l'absence de stimulation permet de simplifier le protocole, en supprimant les injections répétées et en réduisant le monitoring échographique et hormonal.

D'autres avantages résultent du fait que la MIV constitue une alternative thérapeutique dans certaines situations cliniques dans lesquelles

les protocoles conventionnels peuvent être pris en défaut. Ainsi, en cas d'annulation du protocole de FIV en raison d'un risque important de SHO, la MIV permet de récupérer les ovocytes immatures qui, autrement, auraient été perdus. De même, la MIV pourrait avoir une place dans la prise en charge de patientes dont la réponse aux gonadotrophines est constamment inadéquate, que ce soit par excès (hyper-répondeuses) ou par défaut (mauvaises répondeuses).

Enfin, la perspective de pouvoir cryoconserver des ovocytes immatures permettrait de compléter les possibilités qui sont actuellement à notre disposition pour tenter de préserver la fertilité de femmes jeunes devant subir un traitement potentiellement stérilisant.

L'ensemble de ces avantages ne pourra cependant être mis à profit tant que la MIV n'aura pas fait la preuve d'une efficacité et d'une fiabilité constantes d'une équipe à l'autre, ainsi que de son innocuité quant à l'état de santé des enfants à naître. Ainsi, la standardisation des pratiques et leur évaluation devront faire l'objet d'études prospectives et contrôlées.

INDICATIONS POTENTIELLES

Les indications de la MIV découlent des avantages théoriques précédemment décrits.

Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

Ce syndrome d'expression hétérogène associe des troubles menstruels et/ou une hyperandrogénie à des signes échographiques qui ont été redéfinis récemment: présence d'au moins 12 follicules de 2 à 9 mm de diamètre ou un volume ovarien supérieur à 10 ml (20). Cette situation constitue une des causes d'infertilité les plus fréquentes: la prévalence d'ovaires polykystiques à l'échographie a été estimée à 17-22 % des femmes en âge de procréer (21). Les patientes atteintes d'un SOPK montrent fréquemment une anovulation chronique, mais présentent également un risque élevé de développer un SHO (22). De ce fait, et en raison de la présence de nombreux follicules antraux, elles représentent une indication théorique idéale de MIV. Toutefois, après les deux naissances obtenues dans ce contexte (cf. supra), les premières (petites) séries montraient des résultats plutôt décevants, avec

des taux de fécondations, de clivages et d'implantations relativement bas (23, 24). Cependant, après un certain nombre de modifications (déclenchement par hCG avant la ponction, recours systématique à l'ICSI), des études plus récentes font état de résultats nettement plus encourageants, avec des taux de grossesses allant de 20 à 35 % par cycle et des taux d'implantations de 7 à 15 % (25-27).

Dans une étude cas-témoins comparant 107 cycles de MIV et 107 cycles de FIV avec stimulation ovarienne chez des patientes ayant des ovaires polykystiques, les auteurs ont montré une efficacité tout à fait acceptable en termes de taux de grossesses (26,2 % contre 38,3 % en FIV) et de taux d'implantations (9,5 % contre 17,1 % en FIV). Le principal bénéfice, outre l'absence d'utilisation de gonadotrophines, était l'éviction complète de tout SHO, alors que dans le groupe FIV, 11,2 % des patientes avaient présenté cette complication (28). Les mêmes auteurs ont montré que les résultats de la MIV étaient identiques chez les patientes atteintes d'un SOPK et celles qui présentaient simplement des ovaires polykystiques à l'échographie tout en ayant des cycles ovulatoires (29).

Ovaires normaux

Les avantages théoriques de la MIV devraient également profiter aux patientes présentant des ovaires normaux. Dans la littérature cependant, les résultats de la MIV sont discordants dans cette indication. Ainsi, dans l'étude canadienne déjà citée (29), la comparaison entre patientes avec ovaires normaux et patientes avec ovaires polykystiques a montré des valeurs similaires pour les taux de maturations, de fécondations et de clivages. En revanche, le taux de grossesses cliniques est très significativement inférieur chez les patientes avec ovaires normaux (3,6 % par ponction, contre 29,4 % chez les patientes SOPK), de même que le taux d'implantations (1,5 %, contre 9,6 % chez les patientes SOPK). Les auteurs expliquent ces différences en partie par le plus faible nombre d'ovocytes recueillis chez les patientes avec ovaires normaux qui, par définition, ont moins de follicules antraux sur leurs ovaires (5,1, contre 11,3 chez les patientes SOPK). De ce fait, il y a moins d'embryons disponibles pour le transfert. Toutefois, dans cette étude, le rang de la tentative et l'âge moyen étaient plus élevés chez ces patientes normo-ovulantes, ce qui a pu contribuer également à la différence de résultats. Une équipe danoise a elle aussi rapporté un taux de grossesses relativement faible après MIV chez des femmes réglées régulièrement, avec un taux de grossesses de 11 à 12,6 % par cycle, mais un taux d'implantations de 8,8 % (30, 31).

D'autres équipes, au contraire, ont obtenu de bons résultats chez ce type de patientes: une équipe coréenne a réussi à recueillir en moyenne 9 ovocytes immatures et obtenu un taux de grossesses de 17,6 % par ponction (32), tandis que des Finlandais ont rapporté des taux de grossesses de 19 % par cycle chez des patientes avec ovaires normaux et 39 % chez des patientes SOPK (33).

Immaturité ovocytaire après stimulation ovarienne pour FIV

Si la plupart des ovocytes recueillis après stimulation ovarienne par hMG ou FSH et déclenchement de l'ovulation par hCG se trouvent au stade de métaphase II, un pourcentage variable d'ovocytes immatures, au stade de vésicule germinale ou métaphase I, est régulièrement observé. En moyenne, la proportion de ces ovocytes immatures ne dépasse pas 10 à 16 % (5, 34), mais dans certains cas elle peut atteindre 50 % (35), voire 100 % des ovocytes recueillis (36). La technique de MIV peut venir au secours de ces ovocytes immatures (« *rescue IVM* ») et donner lieu à des grossesses et à la naissance d'enfants en bonne santé, comme l'a démontré la première naissance d'un enfant issu d'un ovocyte mûré in vitro en 1983. D'autres grossesses obtenues dans ce contexte et suivies de naissance ont été publiées (35-37).

Sur le plan biologique, ces ovocytes immatures au moment du recueil se caractérisent par leur capacité de reprendre leur méiose dans des délais très brefs, entre 6 et 12 heures, voire moins, par rapport à des ovocytes provenant de patientes non stimulées. En revanche, la comparaison entre les ovocytes matures et immatures au moment du recueil a montré que ces derniers présentaient un taux de fécondations plus faible (38, 39). Même en se limitant à des ovocytes qui, au moment du recueil, se trouvaient déjà en métaphase I et qui ont mûré en moins de 4 heures, une équipe bruxelloise (40) a pu observer un taux de fécondations significativement inférieur (52,7 %) à celui obtenu avec les ovocytes matures dès le recueil (70,8 %). De plus, ce travail portant sur 1210 ovocytes immatures, comparés à 8803 ovocytes matures a également mis en évidence un taux d'implantations nettement plus bas pour les embryons issus des ovocytes mûrés in vitro (5,5 %, contre 20 % pour les embryons issus d'ovocytes matures au départ).

Les raisons de cette faible efficacité sont encore débattues. Certains évoquent des anomalies folliculaires (vascularisation insuffisante, problèmes de récepteurs aux gonadotrophines) ou ovocytaires qui empêcheraient l'ovocyte de répondre normalement aux stimuli

hormonaux exogènes (41). D'autres insistent sur les différences chronologiques entre l'acquisition de la maturité nucléaire, la plus précoce, et celle du cytoplasme, volontiers retardée et non détectable morphologiquement (42).

Hyper-répondeuses

Parmi les patientes candidates à une FIV, certaines présentent une réponse fortement excessive à la stimulation ovarienne. Ces patientes sont à haut risque de développer un SHO (43), d'autant qu'il s'agit majoritairement, mais non exclusivement, de patientes atteintes d'un SOPK. Étant donné le rôle primordial de l'hCG dans le déclenchement du SHO (44), l'attitude la plus commune devant une réponse excessive consiste à arrêter la stimulation et à ne pas administrer de l'hCG à la patiente. Dans de telles situations, une équipe saoudienne a proposé de réaliser néanmoins une ponction folliculaire et de tenter une MIV avec les ovocytes obtenus. Une première grossesse a ainsi été obtenue chez une patiente présentant 40 follicules et un taux plasmatique d'œstradiol de 14 000 pmol/l au 8^e jour de la stimulation (45). Après l'arrêt du protocole, suivi de ponction folliculaire, 10 ovocytes ont été recueillis, 9 ont mûri *in vitro* et 4 embryons ont été transférés, donnant lieu à une grossesse unique. Celle-ci s'est cependant terminée par un accouchement prématuré, après rupture des membranes, suivi du décès néonatal de l'enfant. Par la suite, la même équipe a publié une série de 18 patientes hyper-répondeuses chez lesquelles 21 cycles de FIV ont été annulés et transformés en MIV (46, 47). Une grossesse supplémentaire a pu être obtenue, avec une issue favorable, ce qui correspond à un taux de grossesses cliniques de 9,5 % par cycle, avec un taux d'implantations de 4,5 %. Dans cette série, le nombre d'ovocytes recueillis était très faible par rapport au nombre de follicules présents (18 %), en relation avec l'absence d'injection d'hCG ou d'un matériel de ponction inadapté (cf. *infra*). Une situation similaire peut se présenter quand l'administration d'hCG a été omise : ainsi, dans un cas où la patiente s'est injecté seulement le solvant, la ponction d'ovocytes immatures suivie d'une MIV a permis de recueillir 5 ovocytes au stade de vésicule germinale qui ont tous mûri *in vitro*, donnant lieu à un embryon qui a été cryoconservé. Après décongélation ultérieure, une grossesse a été obtenue, se terminant par la naissance d'un enfant sain (48).

Récemment, une équipe coréenne a proposé une stratégie différente chez des patientes connues comme hyper-répondeuses. La stimulation a été arrêtée dès qu'un follicule de 12 à 14 mm était détecté.

Le même jour, une dose standard d'hCG a été administrée et une ponction était réalisée 36 heures plus tard, en vue d'une MIV. Ce procédé a permis d'obtenir des ovocytes parmi lesquels 11,6 % étaient déjà matures, tandis que 76 % des ovocytes immatures ont mûri in vitro. Ainsi, parmi 17 patientes, toutes ont bénéficié d'un transfert d'embryons et 8 ont été enceintes (49). L'issue des grossesses n'est pas précisée dans cette publication, mais les auteurs soulignent qu'aucun cas de SHO n'a été recensé, malgré l'injection d'hCG.

Mauvaises répondeuses

Les patientes mauvaises répondeuses au traitement de stimulation ovarienne posent au clinicien de l'AMP des problèmes de prise en charge qui sont loin d'être résolus (50). Plusieurs définitions ont été proposées, mais il est généralement admis que cette situation associe une faible réponse à la fois hormonale (œstradiolémie < 1 000 pg/ml le jour du déclenchement par hCG) et exocrine (moins de 5 ovocytes matures à la ponction). Plusieurs méta-analyses ont récemment mis en doute la valeur prédictive du dosage de FSH au profit du compte échographique des petits follicules antraux en début de cycle (51, 52). Pour ces patientes, chez lesquelles les gonadotrophines exogènes ne permettent pas d'obtenir de réponse, la MIV en cycle spontané a été proposée, sous réserve qu'il reste quelques follicules visibles à l'échographie en début de cycle. Cependant, jusqu'à présent, les données de la littérature se limitent à quelques cas isolés de patientes pour lesquelles, après échec de plusieurs tentatives de FIV conventionnelle, la MIV a permis d'obtenir une grossesse et une naissance (53, 54). Dans une petite série de 6 patientes mauvaises répondeuses, la MIV a donné des résultats identiques à ceux des sujets contrôles, en ce qui concerne les taux de maturations, de fécondations et de formation de blastocystes. Il faut préciser cependant que toutes les patientes avaient au moins 5 follicules antraux visibles en début de cycle, ce qui semble être une condition sine qua non pour pouvoir espérer un bénéfice de la MIV chez les mauvaises répondeuses (55).

Cycles naturels: combinaison de FIV et MIV

Au cours des dernières années, la FIV en cycle naturel a connu un certain regain d'intérêt, car elle n'entraîne pas de risque de SHO et la probabilité de survenue d'une grossesse multiple est quasiment

nul. Le traitement est également plus simple, moins contraignant et moins cher. Il est aussi moins efficace. Le principal problème est le taux d'annulations élevé et le risque de ne pas obtenir d'ovocyte à la ponction. Ainsi une revue récente de la littérature portant sur un total de 1800 cycles fait état d'un transfert d'embryons dans moins de la moitié des cycles commencés, ce qui aboutit à un taux de grossesses de 7,2 % par cycle et 15,8 % par transfert (56). Or, outre le follicule dominant, l'ovaire contient en milieu de phase folliculaire également des follicules antraux non dominants qu'il serait intéressant de recueillir afin de les faire maturer *in vitro*, de manière à augmenter le rendement de ces cycles spontanés (57). C'est ce que propose une équipe canadienne en réalisant l'injection d'hCG dès que le follicule dominant a atteint 12 à 14 mm de diamètre, suivie 36 heures plus tard de la ponction. La majorité des ovocytes provenant des follicules dominants étant déjà matures, le gain dû à la MIV des autres a permis à ces auteurs d'obtenir, dans une étude pilote, une grossesse et une naissance chez 3 patientes (58).

Cryoconservation d'ovocytes immatures

Depuis la première naissance après cryoconservation d'ovocytes matures (59), les résultats en termes de grossesses et de naissances sont restés très modestes. Les problèmes liés à la faible survie et à la capacité diminuée au développement embryonnaire de ces ovocytes cryoconservés ont été attribués entre autres à la présence du fuseau méiotique, susceptible d'être endommagé par le froid, et à la nécessité de les féconder rapidement après la décongélation, alors qu'ils n'ont peut-être pas encore récupéré des effets de la congélation (60). D'où l'idée de congeler des ovocytes immatures qui, au stade de vésicule germinative, n'ont pas encore mis en place de fuseau et qui ne seront fécondés que 24 à 36 heures après la décongélation, le temps de maturer *in vitro*. Bien que cette idée soit intéressante sur le plan conceptuel, elle se heurte aux réalités expérimentales acquises au cours des dernières années et revues récemment (61) : d'une part, les risques d'anomalies chromosomiques et de perturbations du fuseau après congélation d'ovocytes matures semblent nettement moins importants que ne le suggéraient les études plus anciennes, et d'autre part, ces mêmes risques ne sont pas moindres après congélation d'ovocytes immatures. Jusqu'à récemment, la congélation d'ovocytes immatures n'a donné que des taux de survies faibles (62, 63) ou acceptables, mais alors avec des taux de clivages et de blastocystes très bas (64, 65). Néanmoins, cette approche a été tentée pour

une patiente chez laquelle un protocole de FIV conventionnel avait permis de recueillir 61 ovocytes dont 29 ont été congelés (16 matures et 13 au stade de vésicule germinale). Après décongélation de tous les ovocytes, seuls 3 ovocytes immatures ont survécu, 2 ont mûri in vitro et donné lieu à la formation de 2 embryons qui ont permis la naissance d'un enfant sain (66). Plus récemment, une équipe chinoise a rapporté son expérience avec 79 ovocytes immatures qui après vitrification-décongélation ont donné un taux de survie à 59 %, un taux de maturations à 64 % et un taux de fécondations à 70 % (67). Quinze embryons se sont formés, un seul a progressé jusqu'au stade de blastocyste. La même équipe a appliqué cette technique pour son programme de don d'ovocytes: une patiente a bénéficié d'un transfert d'embryons qui a été suivi d'une grossesse biochimique.

MISE EN ŒUVRE PRATIQUE DE LA MIV : ASPECTS CLINIQUES

Quelle place pour les traitements adjuvants par hCG ou FSH ?

En 1999, une équipe canadienne a proposé l'utilisation d'hCG dans les protocoles de MIV en cycle non stimulé dans le but de favoriser la mise en route de la maturation ovocytaire. Cette approche a été appliquée avec succès tout d'abord dans deux cas de patientes en échec des traitements antérieurs, et a permis de constater que la MIV était acquise plus rapidement que dans les cycles naturels (68). Par la suite, les mêmes auteurs ont publié une étude randomisée, comparant les résultats de la MIV avec ou sans prétraitement par hCG (10000 UI) chez des patientes avec un SOPK (69). Ils ont ainsi confirmé l'accélération du processus de MIV, puisque 24 heures après le recueil, 78 % des ovocytes exposés in vivo à l'hCG avaient atteint le stade de métaphase II, contre 5 % seulement des ovocytes provenant d'un cycle naturel. Après 48 heures, ces pourcentages étaient respectivement de 85 % et 68 %. Le prétraitement par hCG améliorerait donc non seulement la cinétique de la maturation, mais également le taux de maturations final. De plus, le taux de grossesses cliniques était de 38,5 % par cycle avec hCG, contre 27 % sans hCG, mais cette différence n'était pas statistiquement significative. Le bénéfice de l'hCG a été confirmé par d'autres équipes, que ce soit chez des patientes avec des ovaires polykystiques ou normaux (29), y compris en ce qui

concerne le taux de naissances qui était de 26 % par cycle avec hCG, contre 16 % sans hCG (28). Les mécanismes qui sous-tendent ces effets de l'hCG ne sont pas parfaitement compris: un effet potentiel sur l'endomètre a été évoqué. Cependant, une étude randomisée n'a pas détecté de différences entre cycles avec ou sans hCG en ce qui concerne l'épaisseur de l'endomètre au moment de la ponction, le Doppler des artères utérines ou le Doppler endométrial (70).

Actuellement, l'intérêt d'une administration d'hCG dans l'amélioration des résultats de la MIV paraît assez consensuel et de ce fait elle est utilisée par une large majorité d'équipes. Cependant, d'excellents résultats (taux de grossesses 20,5 % par ponction et 26,6 % par transfert, taux d'implantations 18,5 %) ont été rapportés récemment par une équipe finlandaise en absence de tout prétraitement (33).

Le nombre d'ovocytes recueillis étant un paramètre important dans le pronostic de la MIV, il a été proposé d'augmenter le nombre de follicules disponibles en administrant à la patiente de faibles doses de FSH pendant une durée courte. La première étude comparative analysant les effets d'une dose de 600 UI de FSH répartie sur 5 jours (du 2^e au 6^e jour) a montré un nombre de follicules plus important que chez les patientes en cycle naturel, mais le nombre d'ovocytes recueillis n'était pas significativement différent (71). Néanmoins, le taux de maturations était très supérieur après traitement par FSH (71,1 % contre 43,5 %), mais il faut préciser que dans cette étude le milieu de maturation ne contenait pas de sérum, contrairement à la majorité des autres études. Une équipe danoise a proposé une stimulation avec 37,5 UI de FSH par jour, depuis la phase lutéale tardive, jusqu'à obtention de follicules de 9 à 11 mm, avec de bons résultats (72). Actuellement, ces mêmes auteurs en sont revenus au cycle naturel qui leur donne des résultats aussi bons, sinon meilleurs (33). Plusieurs études randomisées ont été consacrées à l'intérêt éventuel de la FSH, mais les effectifs étaient toujours très faibles et les résultats contradictoires (24, 73, 74). Enfin, une étude randomisée a analysé l'intérêt d'un prétraitement par FSH chez des patientes qui bénéficiaient par ailleurs d'une injection d'hCG 36 heures avant la ponction. Les résultats portant sur 60 patientes, 68 cycles et 1 528 ovocytes n'ont montré aucun bénéfice supplémentaire de la FSH en termes de nombre d'ovocytes, de taux de maturations, de fécondations, de grossesses ou d'implantations (75). Par conséquent, contrairement à l'hCG, la FSH ne semble pas avoir de place dans les protocoles de MIV, d'autant qu'elle en ferait perdre certains de ses avantages.

Comment choisir le jour de la ponction ?

La capacité de l'ovocyte à reprendre sa méiose et à progresser au stade de métaphase II est acquise progressivement au cours du développement folliculaire et dépend à la fois de sa taille et de celle du follicule. En effet, il a été montré que l'aptitude à la MIV est significativement supérieure pour les ovocytes qui mesurent entre 106 et 125 μm de diamètre par rapport à ceux qui font entre 86 et 105 μm (76). De même, la MIV de plus de 500 ovocytes provenant de 3 catégories de follicules, mesurant 3-4 mm, 5-8 mm ou 9-15 mm de diamètre, prélevés sur des biopsies ovariennes en phase folliculaire, a permis d'atteindre un taux de maturations de 8,8 %, 15,2 % et 34,5 %, respectivement (77). En ce qui concerne les follicules ponctionnés par voie transvaginale, la taille minimale permettant une MIV a été estimée à 5 mm (71), celle compatible avec un développement embryonnaire au stade de blastocyste à 6 mm (6).

Quant à la taille maximale des follicules, deux théories s'affrontent. En effet, il est couramment admis qu'au cours de la phase folliculaire d'un cycle naturel, une fois le follicule dominant sélectionné, les autres follicules de la cohorte folliculaire recrutée au début du cycle évoluent vers l'atrésie (78). Ainsi, certains auteurs ont montré qu'après MIV, les taux de maturations, de fécondations et de transferts sont moindres quand la ponction folliculaire a eu lieu en présence d'un follicule dominant de plus de 14 mm (79). De même, chez des donneuses d'ovocytes, l'aptitude au développement embryonnaire des ovocytes immatures maturés in vitro serait plus faible, avec un taux de blastocystes de 35,7 % en cas de ponction faite après l'émergence d'un follicule de plus de 10 mm, contre 56,5 % en absence de follicule dominant (80). De ce fait, de nombreuses équipes réalisent une échographie pelvienne au 7^e ou 8^e jour du cycle, de manière à annuler ce dernier si un follicule de plus de 10 mm est déjà présent (26, 75, 81, 82).

À l'inverse, d'autres auteurs ont montré que malgré la présence d'un follicule dominant, des ovocytes immatures recueillis au cours de cycles non stimulés, 36 heures après l'injection d'hCG, sont capables de donner lieu, après MIV, à des grossesses évolutives et à des naissances (83, 84). De plus, une étude comparative n'a pas révélé de différence en ce qui concerne le potentiel évolutif des embryons issus d'un follicule dominant et ceux provenant de follicules de la cohorte non dominants (6). Ces auteurs précisent qu'un follicule dominant est présent entre le 8^e et le 13^e jour du cycle chez 79 % des patientes réglées régulièrement, alors que tel est rarement le cas chez les patientes avec un SOPK. Par ailleurs, dans l'étude de Chian, déjà

citée, l'efficacité de la MIV des ovocytes provenant de follicules non dominants chez des patientes normo-ovulantes, candidates à une FIV en cycle non stimulé, a illustré davantage les compétences méiotiques et évolutives de ces ovocytes (58). Devant leurs résultats, ces auteurs ont remis en question le concept d'atrésie des follicules de la cohorte, dès l'apparition du follicule dominant, et conseillé de ce fait de ne plus annuler les cycles de MIV lorsque cette situation se présente. Une équipe coréenne a elle aussi conclu à l'absence d'effet du follicule dominant sur le potentiel évolutif des ovocytes immatures après MIV chez des patientes présentant des ovaires polykystiques (85). Cependant, des études randomisées seraient nécessaires pour trancher définitivement cette question.

Enfin, il faudra probablement tenir compte également des traitements adjuvants (hCG et/ou FSH, cf. supra) qui risquent de modifier la cinétique évolutive des follicules, ainsi que du statut ovulatoire ou non de la patiente, puis que les patientes normo-ovulantes sont généralement ponctionnées plus tôt, vers le 8^e ou 9^e jour du cycle, alors que le recueil chez les patientes anovulatoires avec un SOPK a lieu en moyenne vers le 12^e ou 13^e jour après l'hémorragie de privation induite par des progestatifs (33). En pratique, le monitoring comprendra une échographie au 3^e jour du cycle, pour vérifier l'absence de kyste et faire un compte de follicules antraux, puis une échographie tous les deux jours à partir du 6^e ou 7^e jour du cycle.

Quel type d'anesthésie ?

Plusieurs modalités d'anesthésie peuvent être proposées pour l'aspiration folliculaire. Dans la plupart des études, une anesthésie générale utilisant du propofol est mise en œuvre, étant donné que la ponction de follicules immatures est techniquement plus difficile (petite taille folliculaire, ovaires non stimulés plus mobiles...) et plus douloureuse (plusieurs réintroductions de l'aiguille) que pour une FIV conventionnelle. L'usage du propofol a suscité un certain nombre de questions quant à ses effets éventuels sur l'ovocyte. En effet, il a été montré qu'au cours de la ponction, la concentration de cet agent augmente régulièrement dans le liquide folliculaire (86, 87). Des expériences avec des ovocytes de souris exposés à différentes concentrations de propofol ont donné des résultats contradictoires, avec tantôt une diminution des taux de fécondations et de blastocystes (88), tantôt uniquement une baisse du taux de maturations (89). Cependant, une étude en FIV humaine incluant 130 patientes n'a

montré aucune différence entre des ovocytes exposés ou non au propofol (90). De plus, les résultats très encourageants obtenus en MIV par des équipes qui ont recours systématiquement au propofol confortent l'idée d'une absence d'effets délétères de cet anesthésique (75).

D'autres auteurs préfèrent recourir à une prémédication associant une benzodiazépine (midazolam, triazolam) et un morphinique (alfentanil, fentanyl) avec, pour certains, une anesthésie locale par bloc paracervical (28, 82). Dans une étude récente, 50 patientes candidates à une MIV ont évalué la douleur de la ponction après prémédication à l'aide d'une échelle analogique visuelle. Globalement la douleur ressentie était moins importante que la douleur attendue par les patientes. Quinze patientes ont reçu des antalgiques dans les suites de la ponction et toutes ont pu quitter le service deux heures après la ponction (91).

Comment réaliser l'aspiration folliculaire ?

Alors que les premières tentatives de MIV ont été réalisées avec des ovocytes prélevés sur des tissus ovariens ex vivo, le recueil se fait, depuis les travaux de Trounson, presque toujours par ponction folliculaire transvaginale échoguidée avec une aspiration continue, selon les mêmes principes que pour la FIV conventionnelle, avec quelques adaptations techniques (92).

- L'aiguille est introduite avec le biseau en bas ;
- La pression d'aspiration est réduite de moitié par rapport à une ponction de follicules matures (7,5 kPa au lieu de 15 kPa) ;
- L'aiguille de ponction est plus courte et plus rigide, avec un biseau plus court, adapté à la taille des follicules ;
- Le calibre de l'aiguille est plus fin (17 ou 18 gauge) ;
- L'usage d'aiguilles à double lumière est préconisé par les équipes qui pratiquent un rinçage folliculaire (*flushing*) avec un milieu adapté, éventuellement additionné d'héparine (2 UI/ml) ;
- Certains auteurs conseillent un mouvement de « curetage intrafolliculaire » pour les follicules de plus de 6 mm, censé faciliter le décollement du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) de la paroi folliculaire (93).

Les liquides de ponction sont recueillis dans des tubes stériles contenant un milieu habituel additionné d'héparine à 2 UI/ml et maintenus à 37 °C.

La préparation de l'endomètre

Dans un cycle naturel, la ponction des follicules antraux vient interrompre l'activité endocrine de l'ovaire. De ce fait l'endomètre n'aura pas été soumis à des concentrations croissantes d'œstrogènes, d'où la nécessité de le préparer dans un intervalle de temps relativement court par l'apport d'œstradiol exogène. De même, après la ponction, l'absence de formation d'un corps jaune fonctionnel rendra nécessaire une supplémentation de la phase lutéale par de la progestérone. Différents schémas thérapeutiques ont été proposés. Le plus souvent, une administration par voie orale de 17β -œstradiol est débutée le jour de la ponction folliculaire. La dose est soit fixe (74), soit adaptée à l'épaisseur de l'endomètre: si ce dernier est supérieur ou égal à 5 ou 6 mm, elle sera de 6 mg par jour, contre 10 mg par jour si la muqueuse est inférieure à 5 ou 6 mm (26, 28, 69, 75). Si l'endomètre est toujours trop fin le jour du transfert d'embryons (< 7 mm), la cryoconservation des embryons est proposée au couple, en vue d'un transfert ultérieur (69). L'intérêt d'un début plus précoce de la supplémentation œstrogénique (au 3^e jour du cycle) a fait l'objet d'une étude comparative, randomisée, qui a démontré que dans ce cas, les taux de maturations, de fécondations et de clivages étaient significativement diminués (94). En cas de grossesse, ce traitement est poursuivi généralement jusqu'à 12 semaines de gestation.

MISE EN ŒUVRE PRATIQUE DE LA MIV: ASPECTS BIOLOGIQUES

Identification des complexes cumulo-ovocytaires (CCO)

Les liquides de ponction sont généralement examinés directement sous une loupe binoculaire, par petites quantités (en raison de la contamination sanguine inévitable) dans une boîte de Pétri stérile. Alternativement, il est possible de passer les liquides recueillis à travers un filtre avec des mailles de 50 à 75 μm , afin d'éliminer les globules rouges et une partie des cellules folliculeuses (92, 95). Les filtres sont alors rincés dans une boîte de Pétri pour récupérer les CCO. Quelle que soit la méthode, cette étape d'identification est très longue (jusqu'à 2 heures) par rapport au recueil des CCO matures chez une patiente ayant suivi un protocole de FIV conventionnelle. La difficulté

tient principalement au fait que les CCO sont plus petits et que le cumulus oophorus n'est pas expansé comme c'est le cas pour les CCO matures. Afin de diminuer le risque que certains CCO passent inaperçus, il peut être utile de faire examiner les liquides de ponction successivement par 2 opérateurs.

Les CCO recueillis sont ensuite placés dans le milieu de maturation, soit individuellement, dans des gouttes de 25 µl, soit à plusieurs dans des gouttes de 50 à 100 µl, contenues dans une boîte de culture et recouvertes d'une huile minérale. L'incubation se fait dans une étuve à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Il semble important que les ovocytes soient entourés de leur cumulus, comme le montre une étude sur plus de mille ovocytes immatures prélevés chez des patientes en cours de césarienne (96). Dans ce travail, le taux de maturations était de 57 % pour les ovocytes inclus dans leur cumulus, contre 29 % seulement pour les ovocytes décoronés avant d'être mis en culture.

Les milieux de maturation

Le milieu de maturation des ovocytes immatures se compose d'un milieu de culture cellulaire de base avec différents additifs selon les auteurs. Le milieu le plus souvent utilisé est le TCM 199, un milieu qui existe depuis le début des années cinquante et comprend entre autres des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines, du glucose. Ce milieu nécessite l'adjonction de protéines qui, dans les publications anciennes, étaient apportées surtout par du sérum de veau fœtal (23, 92), du liquide folliculaire provenant de follicules matures d'une autre patiente (13) ou du sérum de cordon fœtal (12, 13). Actuellement, la plupart des équipes ont recours à du sérum décomplémenté de la patiente à une concentration de 10 à 20 %. La supplémentation en sérum donne en effet de meilleurs résultats en termes de maturation, de chances de grossesses et de taux d'implantations par rapport à la simple adjonction d'albumine sérique (97).

Si les pionniers de la MIV n'ont pas utilisé d'autres additifs que le sérum (12, 13), dans la plupart des études ultérieures des gonadotrophines ont été ajoutées au milieu de maturation. En effet, une étude comparative déjà ancienne avait montré des taux de maturations et de fécondations nettement améliorés en présence d'hMG (75 UI/l) dans le milieu de culture (73,5 % et 64 % respectivement, contre 35,6 % et 36,4 % en l'absence d'hMG). Des résultats similaires, y compris sur le taux de clivages, ont été obtenus en présence d'hMG (150 UI/l) par d'autres (98). Plus récemment, la FSH recombinante à forte concentration (1 UI/ml) s'est avérée capable

d'augmenter les taux de maturations et de fécondations d'ovocytes immatures cultivés *in vitro*, par rapport à ceux cultivés en absence de gonadotrophines. Cependant, seuls les ovocytes cultivés en présence à la fois de FSH (1 UI/ml) et de LH recombinante (10 UI/ml) ont donné lieu à des embryons évoluant jusqu'au stade de blastocyste (99). Cette étude a montré également que les ovocytes cultivés en l'absence de gonadotrophines présentaient une teneur en protéines très diminuée. Actuellement, la plupart des auteurs supplémentent leur milieu avec 75 UI/l de FSH et 500 UI/l d'hCG. Certains ont tenté d'élaborer des milieux définis, sans sérum, en ajoutant différents facteurs de croissance, tels que l'EGF (85) ou l'IGF-I (71), avec des résultats très encourageants. Cependant, il n'existe à ce jour pas d'étude comparative permettant d'évaluer ces différents milieux les uns par rapport aux autres, mis à part un travail récent qui ne trouve aucune différence significative entre le milieu classique (TCM 199) et un milieu commercialisé (33).

Le temps de maturation

Au moment de la mise en fécondation, entre 70 et 80 % des ovocytes cultivés ont atteint le stade de métaphase II, dans la plupart des études récentes (28, 69, 72, 75), avec une amplitude de variation allant de 44 à 96 % (71, 74). Cette maturation est obtenue au terme d'un temps d'incubation très variable dans le milieu de maturation, entre 20 et 72 heures. Plusieurs auteurs ont établi des cinétiques de maturation : ainsi, après 20 heures de maturation, Wynn observe que 48,2 % des ovocytes ont déjà repris leur première division méiotique (GVBD), mais seulement 3,7 % d'entre eux ont atteint le stade de métaphase II. La proportion de ces derniers augmente ensuite rapidement, avec 53,8 % d'ovocytes en métaphase II à 28 heures, 76,9 % à 36 heures et 96,2 % à 44 heures (71). Cependant, la prolongation systématique de la culture au-delà de 36 heures ne semble pas présenter d'intérêt, étant donné que dans ce cas les ovocytes ayant mûri rapidement auront dépassé le stade optimal pour la fécondation. Cette hypothèse vient d'être confirmée par une étude récente montrant que le taux de clivages et surtout le pourcentage d'évolutions jusqu'au stade de blastocyste sont significativement diminués lorsque les ovocytes n'ont mûri que le surlendemain de la ponction par rapport aux embryons issus d'ovocytes matures le jour même ou le lendemain de la ponction (100).

Une étude randomisée a comparé deux groupes de patientes normo-ovulantes candidates à une MIV en cycle spontané pour lesquelles le temps de maturation ovocytaire était soit de 28, soit de

36 heures (95). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes en ce qui concerne les taux de maturations, de fécondations, de clivages et de grossesses. Les auteurs recommandent de ce fait une durée optimale de maturation de 28 heures, ce qui présente l'avantage supplémentaire d'être compatible avec des horaires de travail raisonnables pour le personnel du laboratoire (ponction le matin, fécondation des ovocytes maturés le lendemain après-midi).

La mise en fécondation

Même si les premières grossesses après MIV ont été obtenues par FIV classique, le taux de fécondations était relativement faible. Un éventuel durcissement de la zone pellucide dû aux conditions de culture a été évoqué comme explication possible. Nagy, en 1996, a réussi à obtenir un taux de fécondations de 78 % (et une naissance !) chez une patiente dont tous les ovocytes étaient immatures à l'issue d'un protocole de stimulation conventionnel, en réalisant une micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Dès lors, cette technique s'est imposée tout naturellement dans les cycles de MIV, même en présence d'un sperme normal. Une étude comparative a conforté ses auteurs dans le choix de l'ICSI comme technique de référence, en montrant un taux de fécondations, après MIV, de 84 % en ICSI, contre 57 % en FIVclassique (96).

Il est intéressant de rapporter l'expérience d'une équipe finlandaise qui réalisait systématiquement une ICSI jusqu'en 2002 et qui, depuis, a réintroduit la FIV classique dans les protocoles de MIV, selon les paramètres spermio-logiques (33). Si le taux de fécondations est effectivement plus faible en FIV classique (37,7 %, contre 69,3 % en ICSI), le moindre nombre d'embryons obtenus est compensé par un meilleur taux d'implantations (24,2 % en FIV classique, contre 14,8 % en ICSI), ce qui aboutit à un taux de naissances en faveur de la FIV classique (16,4 % par ponction, contre 13,7 % en ICSI). Ces résultats devront être confirmés par d'autres équipes, mais ils montrent déjà que l'ICSI n'est pas une obligation stricte.

Les embryons et le transfert in utero

Les taux de clivages des zygotes obtenus après MIV sont généralement supérieurs à 80 % et comparables à ceux observés après FIV conventionnelle (101). Le transfert est habituellement effectué au 2^e ou 3^e

jour des embryons. De rares équipes prolongent la culture jusqu'au 5^e ou 6^e jour, avec des taux d'obtentions de blastocyste de 20 à 40 % (85), et même jusqu'à 58 % (100). Le nombre moyen d'embryons transférés est presque toujours supérieur à 3, parfois plus et jusqu'à 8 (25), en raison des taux d'implantations moindres qu'en FIV conventionnelle (28). Seule une équipe se limite actuellement à des transferts de moins de deux embryons (en moyenne 1,6), avec des résultats très satisfaisants (33).

LES RÉSULTATS DE LA MIV

Quels facteurs de pronostic en MIV ?

Comme pour toutes les autres techniques d'AMP, l'âge de la femme détermine le pronostic en termes de grossesse et de naissance. En ce qui concerne la MIV, cette influence a été signalée dès les premiers travaux de R. Edwards. En comparant des ovaires de patientes âgées de 16 à 43 ans, il avait constaté que le nombre d'ovocytes recueillis par ovaire variait en sens inverse, de 62 à zéro (9). D'autres auteurs ont confirmé cette notion (13, 102). De plus, dans 71 % des ovocytes provenant de patientes de plus de 35 ans et maturés *in vitro*, des anomalies de l'organisation du fuseau et de l'alignement des chromosomes ont été mis en évidence, alors que chez des patientes plus jeunes 11 % seulement des ovocytes présentent ce type d'anomalies qui ont pour conséquence des phénomènes de non-disjonction chromosomique, sources d'aneuploïdies (103). L'impact de ces anomalies se situe vraisemblablement au cours du développement embryonnaire précoce, puisque les taux de maturations et de fécondations ne semblent pas corrélés avec l'âge (104).

Dans une étude portant sur 189 cycles de traitement au cours desquels plus de 1600 ovocytes ont été cultivés, Tan a cherché à définir des critères prédictifs échographiques (81). Tout d'abord il s'agissait d'établir une relation entre les chances de réussite et le nombre d'ovocytes immatures recueillis : en divisant les patientes en 3 catégories selon le nombre d'ovocytes obtenus, 1 à 5, 6 à 10 et plus de 10, il a trouvé des taux de grossesses cliniques de 10,2 %, 16,6 % et 26,8 %, respectivement. Cette corrélation était significative. Après une analyse multivariée, le seul critère échographique corrélé au nombre d'ovocytes recueillis était le compte des follicules antraux (*antral follicle count, AFC*). Cette mesure peut être effectuée indifféremment en début

de cycle (2^e ou 3^e jour) ou lors du premier contrôle échographique (6^e ou 8^e jour). En moyenne, le nombre d'ovocytes obtenus représente 46 % du nombre de follicules antraux comptés. Autrement dit, le pronostic est le meilleur en présence d'un AFC supérieur à 20, tandis que pour un AFC inférieur à 5 l'indication devient discutable (55).

Les grossesses et les enfants de la MIV

En considérant uniquement les études qui font état de plus de 20 naissances, les taux de grossesses cliniques se situent actuellement entre 17 et 36 % par cycle (28, 33, 75, 82, 105). La proportion des grossesses qui se terminent par une fausse couche est souvent élevée et varie entre 13 et 37 %. Le fait que la MIV s'adresse principalement à des patientes atteintes d'un SOPK, connues pour présenter un taux de fausses couches spontanées de 30 à 50 % (106), pourrait expliquer ces chiffres. Les taux d'accouchements varient entre 13 et 30 % selon les études. La proportion de grossesses multiples reste acceptable (17 à 23 % des grossesses), malgré un nombre important d'embryons transférés, en moyenne plus de 3 (cf. supra). Ceci reflète les taux d'implantations qui sont le plus souvent inférieurs à ceux obtenus en FIV conventionnelle (28), ce qui incite les cliniciens à transférer davantage d'embryons.

Il n'existe à ce jour que peu d'études sur l'issue obstétricale et néonatale des grossesses après MIV. En totalisant les données de 5 études rapportant ces issues (28, 33, 75, 82, 107), il apparaît que sur 149 enfants nés, 1 enfant est mort-né (terme dépassé, autopsie sans particularités), 3 enfants sont décédés en période néonatale suite à des accouchements prématurés (24 et 27 semaines), 2 enfants présentaient une fente labio-palatine isolée. Dans cette série, la proportion d'accouchements gémellaires était de 17 %; une seule naissance de triplés est rapportée, deux autres grossesses triples ayant été réduites. Les poids de naissance, si précisés, étaient dans les normes habituelles, en moyenne 3250 g dans l'étude coréenne de Cha (82) et 3650 g dans l'équipe danoise de Mikkelsen (108). Quant au développement des enfants, aucun problème n'a été signalé jusqu'à présent; au contraire, l'équipe danoise qui a instauré un suivi régulier des enfants signale des scores supérieurs à la moyenne au test de Denver, test qui évalue le développement psychomoteur, ce qu'ils attribuent à un probable surinvestissement de la part des parents (107).

Enfin, sur le plan obstétrical, dans la série de Cha (82), 24 grossesses évolutives ont été suivies. Trois d'entre elles ont été incidentées

par une menace d'accouchement prématuré, deux par le diagnostic d'un placenta praevia, une par la mort fœtale in utero d'un jumeau porteur d'une omphalocèle et d'une mosaïque chromosomique 45X/46XY, et une par le diagnostic d'une anasarque ayant conduit à la réalisation d'une interruption médicale de grossesse.

La MIV est-elle risquée ?

Il s'agit, dans le cas du jumeau mort in utero porteur d'une mosaïque, du seul cas d'anomalie chromosomique rapporté jusqu'à présent après MIV, une information importante devant les résultats très discordants obtenus par hybridation fluorescente in situ (FISH) sur des embryons humains issus de la MIV. En effet, si certains auteurs n'ont trouvé aucune différence entre des embryons provenant d'ovocytes maturés in vitro et ceux développés à partir d'ovocytes matures (109), d'autres avancent des taux d'aneuploïdies de 78,5 % dans les embryons obtenus après MIV (110). Dans ce dernier cas, il s'agissait cependant d'ovocytes restés immatures au terme d'un protocole de FIV conventionnelle, dont on connaît le faible potentiel évolutif (cf. supra).

Une incidence accrue d'anasarque, associée à un poids de naissance anormalement élevé ainsi qu'à d'autres anomalies (développement de certains organes et du placenta, malformations des membres...), caractérise le syndrome dit « du gros veau » (*large offspring syndrome, LOS*) qui a été décrit chez des ruminants (bovins et ovins) nés après FIV et culture embryonnaire in vitro (111). Ce type d'anomalies est actuellement mis sur le compte d'altérations épigénétiques survenues pendant la culture embryonnaire : ainsi, chez le mouton, le poids de naissance excessif est en rapport avec un défaut de méthylation d'un gène qui intervient dans l'organogenèse (112). Dans d'autres modèles animaux, il a été montré que des anomalies de la méthylation de l'ADN sont en rapport avec la composition du milieu de culture des embryons (113). Étant donné que des phénomènes de reprogrammation épigénétiques surviennent non seulement pendant le développement embryonnaire précoce, mais également au cours de la maturation gamétique (114), la question du risque éventuel d'anomalies de la méthylation dans des ovocytes immatures, maturés in vitro, a été posée. Aucun élément en faveur de l'existence d'un syndrome de type LOS dans l'espèce humaine n'a été publié à ce jour, que ce soit après FIV conventionnelle ou après MIV. Toutefois, certains auteurs ont émis l'hypothèse que le poids de naissance légèrement plus faible après FIV avec ou sans ICSI, tel qu'il est constaté

dans les grandes séries (115), pourrait correspondre à des modifications épigénétiques de certains gènes intervenant dans la croissance embryo-fœtale survenues au cours de la culture in vitro (116). Pour ces raisons, il est indispensable de suivre tous les enfants issus de l'AMP, qu'ils soient nés après des procédés encore très récents, tels que la MIV, ou après des techniques établies depuis plus longtemps déjà, telles que la FIV classique et l'ICSI.

CONCLUSION

Depuis la naissance du premier enfant issu de la fécondation d'un ovocyte mûri in vitro, la MIV a été constamment améliorée et évaluée. Même si le nombre d'enfants nés après cette technique reste relativement faible, quelques centaines de par le monde, la MIV est considérée comme une option thérapeutique à part entière dans plusieurs pays déjà. Elle constitue en effet une alternative qui tient sa place parmi les traitements de l'infertilité, face à une remise en question de l'usage intensif et, dans certains cas, à haut risque des stimulations ovariennes dont elle permet d'éviter l'ensemble des inconvénients. En France, jusqu'à présent, seules quelques équipes ont commencé à proposer la MIV, le principal frein à son développement étant son caractère expérimental, nécessitant la mise en place d'un protocole de recherche clinique après avis d'un CCPPRB. Mais au-delà des formalités médico-légales, la mise en place de la MIV nécessite un certain nombre d'investissements du centre d'AMP, notamment des formations spécifiques pour les cliniciens et les biologistes, une parfaite coordination clinico-biologique, ainsi qu'un suivi très rigoureux des enfants nés.

Résumé

La maturation ovocytaire in vitro (MIV) consiste à cultiver au laboratoire des ovocytes immatures se trouvant au stade de vésicule germinale, de manière à leur faire reprendre leur méiose, évoluer jusqu'au stade de métaphase II et acquérir la compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. Cette maturation comprend ainsi un versant nucléaire et un versant cytoplasmique. Actuellement, il est possible de recueillir ces ovocytes immatures en ponctionnant des follicules antraux de 5 à 12 mm

de diamètre, entre le 8^e et le 13^e jour d'un cycle spontané. Une fois mures, les ovocytes seront fécondés, généralement par micro-injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI), et un ou plusieurs embryons obtenus seront transférés dans l'utérus de la patiente deux ou trois jours plus tard, comme dans un protocole de fécondation in vitro (FIV) conventionnel. À la différence de ce dernier, la MIV ne nécessite pas de stimulation ovarienne et permet ainsi d'éviter les inconvénients de celle-ci, notamment le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne dont les formes sévères peuvent mettre en jeu le pronostic vital. De ce fait, la MIV s'adresse en premier lieu à des patientes qui présentent une prédisposition pour ce syndrome, notamment celles qui ont des ovaires micropolykystiques, mais d'autres indications peuvent être envisagées. Plusieurs centaines d'enfants sont déjà nés grâce à cette technique, mais les taux d'implantations et de grossesses restent inférieurs à ceux observés après une fécondation in vitro conventionnelle. L'utilisation systématique de l'ICSI et d'un déclenchement par la gonadotrophine chorionique 36 heures avant la ponction semble améliorer les résultats, mais d'autres progrès restent à faire, surtout en ce qui concerne la composition du milieu de maturation. Malgré son caractère encore expérimental, la MIV constitue, dans plusieurs pays déjà, une alternative thérapeutique à la FIV en cycle stimulé.

Bibliographie

1. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002; 123: 613-20.
2. Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK. Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity Between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport. *Biol Reprod* 2005.
3. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2890-4.
4. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 2002; 296: 2178-80.
5. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 103-20.
6. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.
7. Smith GD. In vitro maturation of oocytes- *Curr Womens Health Rep* 2001; 1: 143-51.
8. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro : I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62: 655-675.
9. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; 2: 926-9.
10. Edwards RG. Maturation in vitro of mouse sheep cow pig rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208: 349-51.
11. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969; 221: 632-5.
12. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594-602.
13. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles their culture in vitro and

their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-13.

14. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995; 10: 3243-7.

15. de Mouzon J, Allavena E, Schmitt C, Frappe M. [In vitro fertilization in France: economic aspects and influence of the gonadotropin choice (urinary vsrecombinant) on cost]. *Gynecol Obstet Fertil* 2004; 32: 508-18.

16. Beerendonk CC, van Dop PA, Braat DD, Merkus JM. Ovarian hyperstimulation syndrome: facts and fallacies. *Obstet Gynecol Surv* 1998; 53: 439-49.

17. Venn A, Watson L, Bruinsma F, Giles G, Healy D. Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet* 1999; 354: 1586-90.

18. Brinton LA, Lamb EJ, Moghissi KS, Scoccia B, Althuis MD, Mabie JE, Westhoff CL. Ovarian cancer risk after the use of ovulation-stimulating drugs. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 1194-203.

19. Kashyap S, Davis OK. Ovarian cancer and fertility medications: a critical appraisal. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 65-71.

20. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 505-14.

21. Balen A, Michelmore K. What is polycystic ovary syndrome? Are national views important? *Hum Reprod* 2002; 17: 2219-27.

22. Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 275-89.

23. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A. Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 1151-6.

24. Trounson A, Anderiesz C, Jones G, MKausche A, Lolatgis N, Wood C. Oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3: 52-62; discussion 71-5.

25. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WSKo JJ, Yoon TK. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and

embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978-83.

26. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005; 20: 420-4.

27. Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 148-66.

28. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 665-70.

29. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries polycystic ovaries and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76: 936-42.

30. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod* 2000; 15: 1685-90.

31. Mikkelsen AL, Andersson AM, Skakkebaek NE, Lindenberg S. Basal concentrations of oestradiol may predict the outcome of in-vitro maturation in regularly menstruating women. *Hum Reprod* 2001; 16: 862-7.

32. Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Lee SW, Park SPIm KS, Lim JH. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes collected from women with regular menstrual cycle. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 325-9.

33. Soderstrom-Anttila V, Makinen S, Tuuri T, Suikkari AM. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod* 2005; 20: 1534-40.

34. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061-6.

35. Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL. Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 1056-8.

36. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufer A, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65: 1047-50.
37. Check ML, Brittingham D, Check JH, Choe JK. Pregnancy following transfer of cryopreserved-thawed embryos that had been a result of fertilization of all in vitro matured metaphase or germinal stage oocytes. Case report. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2001; 28: 69-70.
38. Junca AM, Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Salat-Baroux J, Plachot M, Antoine JM, Mayenga JM, Delafontaine D, Cohen J. [Oocyte maturity and quality: value of intracytoplasmic sperm injection. Fertility of microinjected oocytes after in vitro maturation]. *Contracept Fertil Sex* 1995; 23: 463-5.
39. Bonada M, Cremades N, Alvarez C. ICSI on metaphase I oocytes matured in vitro. *Hum Reprod* 1996; 11: Abstract book p 90.
40. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1859-63.
41. Salha O, Abusheikha N, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 816-32.
42. Lopata A, Leung PC. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541: 324-36.
43. Smitz J, Camus M, Devroey P, Erard P, Wisanto A, Van Steirteghem AC. Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist/HMG superovulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1990; 5: 933-7.
44. Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. Diagnosis prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 767-72.
45. Jaroudi KA, Hollanders JM, Sieck UV, Roca GL, El-Nour AM, Coskun S. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes. *Hum Reprod* 1997; 12: 857-9.
46. Coskun S, Jaroudi KA, Hollanders JM, Atared AM, Roca GL. Recovery and maturation of immature oocytes in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 372-7.
47. Jaroudi KA, Hollanders JM, Elnour AM, Roca GL, Atared AM, Coskun S. Embryo development and pregnancies from in-vitro matured and fertilized human oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1749-51.
48. Liu J, Katz E, Garcia JE, Compton G, Baramki TA. Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction resulting in pregnancy. *Fertil Steril* 1997; 67: 566-8.
49. Lim KS, Son WY, Yoon SH, Lim JH. IVM/F-ET in stimulated cycles for the prevention of OHSS. *Fertil Steril* 2002; 78: Suppl 1 S10.
50. Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Baroni E, Sapienza F, Cobellis L, Greco E. Management of poor responders in IVF. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 235-46.
51. Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, Te Velde ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2003; 79: 1091-100.
52. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005; 83: 291-301.
53. Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y, Ding W. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 447-9.
54. Friden B, Hreinsson J, Hovatta O. Birth of a healthy infant after in vitro oocyte maturation and ICSI in a woman with diminished ovarian response: Case report. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2556-8.
55. Requena A, Neuspiller F, Cobo AC, Aragonés M, Remohi J, Simon C, Pellicer A. The potential use of maturation in vitro of human oocytes in low responder patients. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 239-44.
56. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 129-39.
57. Chian RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16: 211-9.

58. Chian RC, Buckett WM, Abdul Jalil AK, Son W, YSylvestre C, Rao D, Tan SL. Natural cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 1675-8.
59. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-6.
60. Gosden RG. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 60-3.
61. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, de Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113 Suppl 1: S17-23.
62. Mandelbaum J, Junca A, MPlachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 117-9.
63. Toth TL, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, Hodgen GD. Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. *Fertil Steril* 1994; 61: 1077-82.
64. Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher S, Lanzendorf SE. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril* 1994; 61: 891-4.
65. Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril* 1996; 66: 995-9.
66. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril* 1998; 70: 578-9.
67. Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001; 121: 389-93.
68. Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1999; 72: 639-42.
69. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165-70.
70. Buckett WM, Chian RC, Tan SL. Human chorionic gonadotropin for in vitro oocyte maturation: does it improve the endometrium or implantation? *J Reprod Med* 2004; 49: 93-8.
71. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 1998; 13: 3132-8.
72. Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2000; 15: 747-51.
73. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847-51.
74. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587-92.
75. Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY, Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1632-6.
76. Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* 1995; 63: 404-6.
77. Tsuji K, Sowa M, Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod* 1985; 32: 413-7.
78. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 1997; 18: 71-106.
79. Russell JB. Immature oocyte retrieval combined with in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3: 63-70; discussion 71-5.
80. Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragon M, Mercader A, Navarro J, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. *Hum Reprod* 1999; 14: 1864-8.

81. Tan SL, Child TJ, Gulekli B. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 684-9.
82. Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, Choi DH, Yoon TK. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 83: 1461-5.
83. Paulson RJ, Sauer MV, Francis MM, Macaso T, Lobo RA. Factors affecting pregnancy success of human in-vitro fertilization in unstimulated cycles. *Hum Reprod* 1994; 9: 1571-5.
84. Thornton MH, Francis MM, Paulson RJ. Immature oocyte retrieval: lessons from unstimulated IVF cycles. *Fertil Steril* 1998; 70: 647-50.
85. Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod* 2005; 20: 2097-103.
86. Christiaens F, Janssenswillen C, Verborgh C, Moerman I, Devroey P, Van Steirteghem A, Camu F. Propofol concentrations in follicular fluid during general anaesthesia for transvaginal oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1999; 14: 345-8.
87. Coetsier T, Dhont M, De Sutter P, Merchiers E, Verschelen L, Rosseel MT. Propofol anaesthesia for ultrasound guided oocyte retrieval: accumulation of the anaesthetic agent in follicular fluid. *Hum Reprod* 1992; 7: 1422-4.
88. Tatone C, Francione A, Marinangeli F, Lottan M, Varrassi G, Colonna R. An evaluation of propofol toxicity on mouse oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 430-5.
89. Alsalili M, Thornton S, Fleming S. The effect of the anaesthetic Propofol on in-vitro oocyte maturation fertilization and cleavage in mice. *Hum Reprod* 1997; 12: 1271-4.
90. Ben-Shlomo I, Moskovich R, Golan J, Eyal V, Tabak A, Shalev E. The effect of propofol anaesthesia on oocyte fertilization and early embryo quality. *Hum Reprod* 2000; 15: 2197-9.
91. Hildebrandt NB, Host E, Mikkelsen AL. Pain experience during transvaginal aspiration of immature oocytes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80: 1043-5.
92. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.
93. Papanikolaou EG, Platteau P, Albano C, Nogueira D, Cortvrindt R, Devroey P, Smits J. Immature oocyte in-vitro maturation: clinical aspects. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 587-92.
94. Russell JB, Knezevich K, MFabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
95. Smith SD, Mikkelsen A, Lindenberg S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. *Fertil Steril* 2000; 73: 541-4.
96. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. In vitro maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 39-43.
97. Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 112-116.
98. Zhang X, Zerafa A, Wong J, Armstrong DT, Khamsi F. Human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. *Fertil Steril* 1993; 59: 850-3.
99. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, Jones GM, Trounson AO. Effect of recombinant human gonadotrophins on human bovine and murine oocyte meiosis fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 1140-8.
100. Son WY, Lee SY, Lim JH. Fertilization cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles*. *Hum Reprod* 2005; Jul 21.
101. Poirot C, Abirached F, Vauthier-Brouzes D, Lefebvre G, Raccach J, Hugues JN, Martin-Pont B, Wolf JP, Cedrin-Durnerin I. [Oocytes in vitro maturation: results and future in humans]. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31: 803-12.
102. Shea BF, Baker RD, Latour JP. Human follicular oocytes and their maturation in vitro. *Fertil Steril* 1975; 26: 1075-82.
103. Volarcik K, Sheehan L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is

influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod* 1998; 13: 154-60.

104. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Tan SL. Embryo morphology cumulative embryo score and outcome in an oocyte in vitro maturation program. *Fertil Steril* 2002; 77: 424-5.

105. Mikkelsen AL. Strategies in human in vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 593-9.

106. Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 524-9.

107. Mikkelsen AL, Ravn SH, Lindenberg S. Evaluation of newborns delivered after in vitro maturation. *Hum Reprod* 2003; 18: (Suppl 1) 5.

108. Mikkelsen AL. In vitro maturation of human ova. *International Congress Series* 2004; 1266: 160-166.

109. DeScisciolo C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ, Lanzendorf SE. Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 284-92.

110. Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2000; 74: 295-8.

111. McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmot I, Robinson JJ. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)* 2000; 3: 238-246.

112. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmot I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27: 153-4.

113. Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; 62: 1526-35.

114. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-93.

115. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002; 346: 731-7.

116. De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 2002; 17: 2487-94.