

Place de la maturation ovocytaire *in vitro* dans la stratégie de préservation de la fertilité féminine

Place of *in vitro* maturation of oocytes in female fertility preservation strategy

Louise Adjiman
Badria Bennani-Smires
Charlène Herbemont
Christophe Sifer

Hôpital Jean-Verdier, avenue du
14-Juillet, 93140 Bondy
<christophe.sifer@aphp.fr>

Résumé. Initialement proposée aux femmes porteuses d'un syndrome des ovaires polykystiques, particulièrement à risque d'hyperstimulation ovarienne, la maturation ovocytaire *in vitro* (MIV) a récemment vu ses indications s'ouvrir à de nouvelles perspectives. La technique de MIV constitue une option pour la préservation de la fertilité (PF), notamment chez des femmes atteintes de cancer hormonodépendant, contre-indiquant la stimulation ovarienne, ou lorsque la prise en charge thérapeutique du cancer doit être engagée en urgence. En effet, la MIV peut être proposée quelle que soit la phase du cycle et sans traitement préalable, permettant un recueil d'ovocytes quasi-immédiat après le diagnostic du cancer. De plus, elle peut être combinée à la cryopréservation de cortex ovarien afin d'optimiser le nombre d'ovocytes vitrifiés, et ainsi les chances de grossesse après guérison. Dans cette revue, nous ferons un état des lieux des données publiées concernant la MIV, et discuterons de sa place dans la stratégie de PF.

Mots clés : maturation *in vitro*, vitrification ovocytaire, préservation de la fertilité, cancer

Abstract. Initially offered to women with polycystic ovary syndrome, particularly at risk of ovarian hyperstimulation, *in vitro* maturation (IVM) of oocytes has recently seen new indications. The IVM technique is an option for fertility preservation (FP), especially in women with hormone-dependent cancer, representing a contraindication for ovarian stimulation, or when the therapeutic management of cancer must be urgently initiated. Indeed, IVM can be proposed whatever the phase of the cycle and without prior treatment, thus allowing an oocyte collection almost immediately after the cancer diagnosis. In addition, it can be combined with ovarian tissue cryopreservation for optimizing the number of vitrified oocytes, and consequently the chances of future pregnancy after cancer recovery. This review is aiming to report the published data upon IVM thus far, and to discuss its position in female FP strategy.

Key words: *in vitro* maturation, oocyte vitrification, fertility preservation, cancer

La problématique de la préservation de la fertilité (PF) féminine est une question essentielle. Dans le cadre de l'oncologie, l'amélioration de la prise en charge a permis d'augmenter de manière significative l'espérance de vie des patientes, pour qui le sujet de la qualité de vie après cancer, et plus spécifiquement de la reproduction, est une préoccupation fondamentale et doit faire partie intégrante du projet thérapeutique. Ainsi, en raison de l'utilisation de traitements antitumoraux potentiellement gonadotoxiques, les techniques de PF occupent désormais une place majeure dans la prise en charge multidisciplinaire du cancer.

En parallèle, la loi de bioéthique du 6 août 2004 (art. L.2141-11) modifiée le 7 juillet 2011, prévoit que « toute personne dont la prise en charge médicale est susceptible d'altérer la fertilité, ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de ses tissus germinaux, [...] en vue de la préservation et de la restauration de sa fertilité ». Parmi l'arsenal thérapeutique que constituent les différentes techniques de PF féminine, la maturation *in vitro* (MIV), technique encore à ce jour expérimentale, occupe une place toute particulière.

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : C. Sifer

Historique de la maturation ovocytaire *in vitro*

Le concept de maturation *in vitro* est ancien, puisque la première MIV d'ovocytes chez le mammifère a été décrite dans les années trente, par Pincus [1]. Par la suite, sur le modèle d'ovocytes immatures obtenus après stimulation ovarienne pour fécondation, les premières grossesses chez l'humain ont été rapportées à partir des années quatre-vingt, d'abord par fécondation *in vitro* (FIV) et maturés *in vitro* [2]. En 1991, Cha *et al.* ont été les premiers à décrire, chez l'humain, une grossesse issue d'une maturation complète de vésicules germinatives (VG) jusqu'au stade métaphase II à partir d'une donneuse d'ovocytes [3]. Enfin, une grossesse obtenue à partir du modèle de MIV a été rapportée en 1994 chez une patiente atteinte d'un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) [4].

La maturation ovocytaire *in vitro* : pour qui et quand ?

La vitrification ovocytaire, principale technique de PF féminine, est indiquée dans toute pathologie nécessitant un traitement gonadotoxique (chimiothérapie ou maladies auto-immunes), mais aussi dans le cadre de maladies entraînant une diminution de la réserve ovarienne (syndrome de Turner, insuffisance ovarienne prématurée) ou pour des raisons sociétales (interdit en France). Cependant, la stimulation ovarienne n'est accessible qu'aux patientes pubères sans contre-indication aux traitements hormonaux, et ayant le temps nécessaire à la stimulation ovarienne. La technique de MIV peut ainsi être une modalité de PF pour les femmes en urgence de prise en charge thérapeutique de leur cancer, ou lorsque ce dernier est hormonodépendant (comme souvent dans le cas du cancer du sein). Ainsi, initialement et classiquement issus de cycles avec stimulation ovarienne, les ovocytes peuvent provenir de cycles non stimulés, secondairement maturés *in vitro* pendant 24 à 48 h au laboratoire avec obtention d'ovocytes au stade métaphase II vitrifiables et/ou fécondables.

D'abord explorée chez les patientes présentant un SOPK, pour qui la stimulation expose à un risque accru de syndrome d'hyperstimulation ovarienne [5], la MIV a vu ses indications s'élargir : patientes porteuses de mutations des récepteurs de l'hormone folliculostimulante (FSH) et résistantes à la stimulation ovarienne, donneuses d'ovocytes et, enfin, en cas de prise en charge en onco-fertilité [6, 7]. Cette technique présente l'avantage d'être réalisable en urgence, sans délai – puisque ne nécessitant pas de traitement préalable – et pouvant être proposée quelle que soit la phase du cycle. En effet, différentes études ont comparé les résultats des cycles de MIV en

phase folliculaire et en phase lutéale chez des patientes cancéreuses en demande de PF. Ces études n'ont montré aucune différence statistiquement significative concernant le nombre d'ovocytes ponctionnés, les taux de maturation (de l'ordre de 50-60 %) et de fécondation, ni le nombre total d'ovocytes et d'embryons cryopréservés [7, 8]. D'autre part, en évitant à la patiente toute surexposition hormonale liée à la stimulation ovarienne, les valeurs d'œstradiolémie sont maintenues à des niveaux physiologiques, ce qui rend cette technique, au même titre que le prélèvement chirurgical de tissus ovariens, parfois couplé à la MIV, parfaitement adaptée aux femmes atteintes d'un cancer hormonodépendant. Enfin, la vitrification ovocytaire, quelle que soit la source des ovocytes, ne nécessite pas la participation d'un partenaire masculin, évitant les difficultés éthiques, religieuses et culturelles de la congélation embryonnaire.

Cependant, la question des seuils d'éligibilité à la technique de MIV sur le plan de la réserve ovarienne reste débattue. En effet, notre équipe a montré qu'il fallait un compte de follicules antraux à vingt et un et une AMH à 3,8 ng/mL pour obtenir, avec une bonne sensibilité/spécificité, un nombre d'ovocytes vitrifiés égal à dix [9]. Aussi, un bilan de réserve ovarienne pourra être utile pour renseigner sur la pertinence de l'indication de MIV dans le contexte de la PF avant traitement gonadotoxique.

La maturation ovocytaire *in vitro* : comment ?

Cette technique consiste en un recueil de complexes cumulo-ovocytaires à partir de follicules antraux de petit diamètre (≥ 4 mm) en dehors de toute stimulation ovarienne.

Le recueil ovocytaire est effectué par ponction transvaginale échoguidée, à l'aide d'aiguilles de gauge 17 à 19, reliées à une pompe d'aspiration constante (85 mmHg). Le liquide folliculaire, très souvent sanglant, est récupéré dans des tubes héparinés préchauffés. Les complexes cumulo-ovocytaires sont isolés sous loupe binoculaire et incubés dans un milieu de culture (IVM[®], Origio), supplémenté avec 20 % de sérum décomplémenté de la patiente, et additionné de 0,75 à 1 UI/mL de FSH et 0,75 à 1 UI/mL d'hormone lutéinisante (LH) (Menopur[®], Ferring). Après 24 h de maturation, les complexes cumulo-ovocytaires sont décoronés et la maturité ovocytaire appréciée sous microscope inversé. Les ovocytes matures sont soit vitrifiés, soit mis en fécondation par *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Les ovocytes immatures restants sont laissés en culture pendant 24 h supplémentaires. Après 48 h, les ovocytes ayant mûri sont également soit vitrifiés, soit micro-injectés.

Afin d'améliorer les résultats de la MIV en termes de récupération d'ovocytes matures, certaines équipes ont proposé un *priming* par hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) 36 h avant la ponction [10]. Cette administration semblerait avoir un impact sur les follicules antraux de petit diamètre puisqu'elle améliorerait de manière significative les taux de maturation chez des patientes SOPK [11]. En effet, il a été montré que ce syndrome était associé à une expression prématurée des récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa des follicules préantraux [12]. Les résultats de cette étude sont à relativiser concernant les taux de fécondation et de grossesse, puisqu'ils étaient comparables chez les patientes ayant reçu un *priming* et chez celles n'en ayant pas eu. Récemment, une méta-analyse a rapporté l'absence de bénéfice d'un *priming* par hCG sur le taux de naissance, de grossesse et de fausse couche [13]. Dans le modèle du cancer, ce *priming* en MIV est sujet à caution. En effet, il semblerait que des récepteurs à la LH soient exprimés sur les cellules tumorales mammaires, laissant craindre une aggravation du processus cancéreux [14].

Sur le plan biologique, la vitrification des ovocytes est classiquement réalisée au stade métaphase II après 24, 30 ou 48 h d'incubation, selon les équipes. Elle pourrait également être proposée au stade VG, en prophase I, reportant la MIV immédiatement après la dévitrification de celles-ci afin de réduire les effets théoriquement délétères de la congélation sur le fuseau méiotique [15]. Même si les taux de survie après vitrification/dévitrification des VG et des ovocytes MII semblent comparables, les taux de maturation, de fécondation et de blastoformation sont significativement plus élevés lorsque la MIV est effectuée avant vitrification [15]. Dans le même sens, notre équipe a montré que congeler les ovocytes à un stade de maturation intermédiaire, au stade métaphase I à J1, impactait négativement leur compétence méiotique après décongélation avec un taux de maturation significativement plus bas que le groupe témoin (ovocytes non congelés), après 24 h supplémentaires d'incubation [16]. Ainsi, en MIV, il est préférable de faire mûrir les ovocytes d'abord puis de congeler en vue d'une PF plutôt que l'inverse.

Résultats de la maturation ovocytaire *in vitro*

Les résultats publiés concernant la technique de MIV, quasiment tous à partir du modèle SOPK, restent inférieurs à ceux de la FIV conventionnelle (FIVc), tant sur le plan biologique que clinique. En effet, la plus large série publiée rapporte des taux d'implantation (12,9 *versus* 19,4 %), de grossesses (19,6 *versus* 50,5 %) et de naissances vivantes (16,5 *versus* 44,3 %) significativement plus bas après MIV que par FIVc [17]. Pour tenter de compren-

dre ces moins bons résultats, une équipe a publié une étude originale [18], analysant par hybridation génomique comparative (CGH-array) des embryons au troisième jour de développement, donnés à la recherche biomédicale et obtenus soit après micro-injection d'ovocytes maturés *in vitro* (n = 18) ou après maturation *in vivo* (n = 14). Ainsi, cette équipe a montré que le taux d'aneuploïdie était statistiquement comparable dans les deux groupes (44,4 % d'embryons considérés comme transférables dans le groupe MIV *versus* 42,9 % dans le groupe ICSI conventionnelle) [18]. Ainsi, le déficit de viabilité dans les conditions de culture *in vitro* des ovocytes issus de MIV pourrait être dû à des défauts de maturation cytoplasmique plutôt qu'à des défauts nucléaires.

Aujourd'hui, on estime à plus de 5 000 le nombre de naissances issues de la technique de MIV, essentiellement chez des patientes SOPK dans le cadre de leur prise en charge en assistance médicale à la procréation (AMP). Au total, à notre connaissance, seules quatre naissances ont à ce jour été rapportées après MIV pour PF : trois après congélation/décongélation d'embryons issus d'ovocytes prélevés *ex vivo* à partir de fragments ovariens et une, plus récente, suite à la décongélation d'un zygote issu d'ovocytes maturés par MIV [19].

Dans notre centre d'AMP, très actif dans le champ de la PF féminine, 453 cycles de MIV (groupe MIV), 746 vitrifications ovocytaires après stimulation ovarienne (groupe STIM) et 149 congélations de tissu ovarien ont été effectués de septembre 2013 à avril 2017. Concernant les cycles de MIV, l'indication principale était le cancer du sein (92 %). L'âge moyen était de 31,9 ans. Le nombre moyen d'ovocytes récupérés dans les groupes STIM et MIV à la ponction était respectivement de 10,3 et 11,4, pour un nombre d'ovocytes vitrifiés de 7,6 et 6,3. À ce jour, seules trois décongélation d'ovocytes issus de MIV dans le cadre de la PF ont été réalisées dans le service, aboutissant à une grossesse, suivie d'une interruption thérapeutique de grossesse chez une femme de 40 ans pour diagnostic anténatal non invasif, confirmé par amniocentèse, de trisomie 18 (résultats personnels non publiés).

Concernant le devenir des enfants nés après MIV, les données sont rassurantes. Le devenir obstétrical et périnatal des grossesses issues de MIV était comparable à celles issues d'une FIV-ICSI après maturation ovocytaire *in vivo*. Il ne semble pas y avoir plus d'anomalies fœtales ou néonatales ni d'augmentation des anomalies génétiques soumises à l'empreinte [20-23]. Cependant, un poids et une taille à la naissance plus élevés ont été observés chez les enfants nés après MIV, probablement attribuables au fait que le SOPK est un facteur prédisposant au diabète gestationnel et à la macrosomie [24].

Même si la compétence des ovocytes congelés après MIV ou maturation *ex vivo* est incertaine, voire inconnue, l'obtention du plus grand nombre d'ovocytes vitrifiés est souvent la position principale des équipes investies dans

la prise en charge de la PF féminine. Ainsi, la question se pose de l'intérêt que présenterait d'utiliser en un seul temps toutes les techniques disponibles, à savoir : préservation de cortex ovarien et d'ovocytes vitrifiés issus de MIV ou prélevés *ex vivo* à partir de fragments de cortex. Dans ce contexte, Hourvitz *et al.* ont publié en 2015 une étude ayant pour but de mesurer l'efficacité « quantitative » de la vitrification ovocytaire après ponction ovarienne pour MIV combinée à la cryopréservation de cortex ovarien et recueil *ex vivo* d'ovocytes à partir de ces fragments [25]. Au total, trois groupes de patientes ont été comparés : (1) cryopréservation de fragment ovarien suivie d'une maturation *in vitro* des ovocytes issus *ex vivo* du fragment, (2) MIV seule et (3) association des trois techniques précédentes. L'étude montre que le nombre d'ovocytes recueillis, le nombre d'ovocytes en métaphase II, le taux de maturation et le nombre total d'ovocytes vitrifiés étaient significativement supérieurs pour le dernier groupe, en faveur de la combinaison des trois techniques. Ainsi, un des intérêts de la MIV est qu'elle peut être associée à une congélation de cortex ovarien, permettant de diversifier le panel des différentes techniques de PF qui peuvent être proposées à une même patiente. Cependant, et avant un traitement oncologique, la seule technique envisageable de PF chez la patiente prépubère est la cryopréservation de tissu ovarien, à laquelle peut être associée la MIV d'ovocytes prélevés *ex vivo* sur la pièce d'ovariectomie [26, 27].

Conclusion

Les avancées de la prise en charge du cancer ont permis d'augmenter la survie des patientes. Assurer leur fonction de reproduction après un traitement gonadotoxique est devenu un enjeu majeur. Parmi les stratégies de PF, la MIV d'ovocytes apparaît comme une technique séduisante puisqu'elle ne requiert pas une stimulation ovarienne. En conséquence, elle représente une option intéressante dans le cas d'une PF urgente, ou de cancers hormonodépendants. Le recul nécessaire pour apprécier son efficacité en termes de grossesse est encore trop faible, mais les nombreuses avancées cliniques et biologiques laissent à croire que la MIV, technique encore expérimentale à ce jour, pourrait offrir un avenir prometteur dans le champ de la PF.

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

Références

1. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. *J Ext Med* 1935 ; 62(5) : 665-75.
2. Veeck LL, Wortham Jr. JW, Witmyer J, *et al.* Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1983 ; 39(5) : 594-602.
3. 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(1) : 109-13.
4. Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994 ; 62(2) : 353-62.
5. Chian RC. *In vitro* maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online* 2004 ; 8 : 547-52.
6. Huang JY, Chian RC, Gilbert L, *et al.* Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by *in vitro* maturation and vitrification: a novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surg* 2010 ; 200(1) : 177-83.
7. Shalom-Paz E, Almog B, Shehata F, *et al.* Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo vitrification. *Reprod Biomed Online* 2010 ; 21(4) : 566-71.
8. Creux H, Monnier P, Son WY, Tulandi T, Buckett W. Immature oocyte retrieval and *in vitro* oocyte maturation at different phases of the menstrual cycle in women with cancer who require urgent gonadotoxic treatment. *Fertil Steril* 2017 ; 107(1) : 198-204.
9. Sonigo C, Simon C, Boubaya M, *et al.* What threshold values of antral follicle count and serum AMH levels should be considered for oocyte cryopreservation after *in vitro* maturation? *Hum Reprod* 2016 ; 31(7) : 1493-500.
10. Chian RC, Gülekli B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999 ; 341(21) : 1624-6.
11. Zheng X, Wang L, Zhen X, Lian Y, Liu P, Qiao J. Effect of hCG priming on embryonic development of immature oocytes collected from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biol Endocrinol* 2012 ; 10 : 40.
12. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86(3) : 1318-23.
13. Reavey J, Vincent K, Child T, Granne IE. Human chorionic gonadotrophin priming for fertility treatment with *in vitro* maturation. *Cochrane Database Syst Rev* 2016 ; 16 : 11.
14. Meduri G, Charnaux N, Loosfelt H, *et al.* Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer. *Cancer Res* 1997 ; 57(5) : 857-64.
15. Kasapi E, Asimakopoulos B, Chatzimeletiou K, *et al.* Vitrification of human germinal vesicle oocytes: before or after *in vitro* maturation? *Int J Fertil Steril* 2017 ; 11(2) : 85-92.
16. Sifer C, Sellam-Chokron O, Sermondade N, *et al.* Should meta-phase 1 and 2 stages oocytes be vitrified in the same time for fertility preservation? *Future Oncol* 2016 ; 12(20) : 2297-305.
17. Gremeau A-S, Andreadis N, Fatum M, *et al.* *In vitro* maturation or *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril* 2012 ; 98(2) : 355-60.
18. Spits C, Guzman L, Mertzaniidou A, *et al.* Chromosome constitution of human embryos generated after *in vitro* maturation including

3-isobutyl-1-methylxanthine in the oocyte collection medium. *Hum Reprod* 2015 ; 30(3) : 653-63.

19. Creux H, Monnier P, Son WY, Buckett W. Thirteen years experience in fertility preservation for cancer patients after *in vitro* fertilization and *in vitro* maturation treatments. *J Assist Reprod Genet* 2018 ; 35 : 583-92.

20. Foix-L'Hélias L, Grynberg M, Ducot B, *et al.* Growth development of French children born after *in vitro* maturation. *PLoS One* 2014 ; 26(9(2)) : e89713.

21. Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T, *et al.* Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from *in vitro* or *in vivo* matured oocytes in *in vitro* maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. *Hum Reprod* 2012 ; 27(12) : 3601-8.

22. Anckaert E, De Rycke M, Smits J. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Hum Reprod Update* 2013 ; 19(1) : 52-66.

23. Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK. *In vitro* maturation of human oocytes: its role in infertility treatment and new possibilities. *Clin Exp Reprod Med* 2014 ; 41(2) : 41-6.

24. Chian R-C, Huang JYJ, Gilbert L, *et al.* Obstetrics outcomes following vitrification of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes in *in vitro* maturation cycles. *Fertil Steril* 2007 ; 87 : 1491-3.

25. Hourvitz A, Yerushalmi GM, Maman E *et al.* Combination of ovarian tissue harvesting and immature oocyte collection for fertility preservation increases preservation yield. *Reprod Biomed Online* 2015 ; 31 : 497-505.

26. Prasath EB, Chan ML, Wong WH *et al.* First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from *in vitro* matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod* 2014 ; 29 : 276-8.

27. Fasano G, Dechène J, Antonacci R *et al.* Outcomes of immature oocytes collected from ovarian tissue for cryopreservation in adult and prepubertal patients. *Reprod Biomed Online* 2017 ; 34 : 575-82.