

## Anomalies chromosomiques de l'œuf humain fécondé

M Plachot<sup>1</sup>, J de Grouchy<sup>1</sup>, J Cohen<sup>2</sup>, J Salat-Baroux<sup>3</sup>

<sup>1</sup> U173 INSERM, Groupe de Recherches sur la fécondation *in vitro*,  
Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15;  
<sup>2</sup> Service de Gynécologie-Obstétrique, CHI Jean-Rostand, 141, Grande-Rue, 92310 Sèvres;  
<sup>3</sup> Maternité Guy-Le-Lorier, Hôpital Tenon, 3, rue de la Chine, 75020 Paris, France

(28<sup>e</sup> Réunion de la Société Française pour l'Étude de la Fertilité; Paris, 19-21 octobre 1989)

**Résumé** — La fécondation *in vitro* a permis d'étudier les anomalies chromosomiques létales (parthénogénèse) ou sublétales (triploïdie, monosomie et trisomie) dans l'espèce humaine. Au stade préimplantatoire, 23 à 71% des embryons (selon les auteurs) sont porteurs d'une aberration chromosomique le plus souvent sévère. Certains facteurs, tels qu'un retard à la fécondation, une fragmentation précoce de l'embryon, ou un âge maternel élevé (> 35 ans), sont liés à une augmentation du taux d'anomalies chromosomiques. Ces observations reposent le problème de l'opportunité d'un diagnostic génétique avant l'implantation, de manière à pouvoir sélectionner pour le remplacement *in utero* les embryons viables et apparemment normaux.

### embryons humains / fécondation *in vitro* / anomalies chromosomiques

**Summary** — **Chromosomal abnormalities in human fertilized eggs.** *In vitro fertilization enabled the study of lethal (parthenogenesis) or sublethal (triploidy, monosomy and trisomy) chromosomal abnormalities in man. According to the literature, 23 to 71% of preimplantation embryos carry a chromosomal defect. Various factors, such as delayed fertilization, early embryo fragmentation or elevated maternal age (> 35 years) are related to an increase in the incidence of chromosomal aberrations. These data reinforce the debate on a preimplantation genetic diagnosis in order to select for transfer only viable and apparently normal embryos.*

### human embryo / *in vitro* fertilization / chromosomal abnormalities

Parmi toutes les causes d'échec du développement embryonnaire, les anomalies chromosomiques jouent un rôle primordial dans l'espèce humaine. Jusqu'à ces dernières années, seules étaient connues les anomalies cytogénétiques dans les fausses couches spontanées (60%) (Boué et Boué, 1973) ainsi que chez les enfants mort-nés (6%) (Machin et Crolla, 1974) ou vivants à la naissance (0.6%) (Nielsen, 1975).

La fécondation *in vitro* (FIV), en permettant l'examen des œufs quelques heures

après l'insémination — et donc avant la syngamie — a montré l'existence d'anomalies très précoces, telles que l'activation parthénogénétique et la triploïdie, avec la possibilité d'exclure ces œufs anormaux lors du transfert *in utero*. De plus, l'étude du caryotype des embryons de 2 à 8 cellules a montré que nombre d'entre eux sont aneuploïdes, et posent de manière cruciale le problème de la qualité embryonnaire, du choix des embryons à transférer, et de l'opportunité d'un diagnostic cytogénétique, voire génique au stade préimplantatoire (Plachot *et al*, 1987).

## LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DE L'EMBRYON HUMAIN

Il existe actuellement assez peu d'informations dans la littérature concernant le taux d'anomalies chromosomiques dans les embryons humains obtenus par fécondation *in vitro*. A cela deux raisons essentielles : 1) les embryons sains sont transférés *in utero* ou congelés au bénéfice des couples et ne servent pas à la recherche; 2) les embryons morphologiquement anormaux (probablement porteurs d'informations intéressantes) sont souvent dégénératifs, et dans ce cas ne permettent pas une analyse cytogénétique.

Malgré cela, sur une série de 363 embryons analysés dans la littérature, le taux d'anomalies chromosomiques varie de 23 à 71% selon les équipes (Angell *et al*, 1983, 1986; Plachot *et al*, 1987, 1988c; Veiga *et al*, 1987; Wimmers et Van der Merwe, 1988; Papadopoulos *et al*, 1989).

Sur une série de 252 embryons (inclus dans l'analyse bibliographique précédente) nous avons observé 29,2% d'anomalies chromosomiques (Plachot *et al*, 1987, 1988c). Toutes les anomalies cytogénétiques connues (monosomies, trisomies, triploidies...) ont été retrouvées dans l'embryon humain au stade préimplantatoire. D'autres anomalies semblent au contraire spécifiques de cette période embryonnaire: monosomies ou trisomies multiples avec perte ou gain de plusieurs chromosomes conduisant à des hypo- ou hyperdiploïdies sévères, ainsi que de nombreuses mosaïques dont le taux atteint en moyenne 10% (Plachot *et al*, 1987, 1988c).

Il existe un consensus sur le fait que le taux d'anomalies cytogénétiques dépend de l'aspect morphologique des embryons. Nous avons observé que 28% des embryons classiquement replacés *in utero*

(c'est-à-dire présentant des blastomères égaux et réguliers et peu ou pas de fragments cytoplasmiques) et 42% des embryons fragmentés (dégénératifs) sont chromosomiquement anormaux (non publié).

Les capacités de développement des embryons porteurs d'anomalies chromosomiques sont variables. Baranov (1983) montre chez la souris que : les embryons trisomiques se développent jusqu'au stade fœtal et quelquefois jusqu'à terme (trisomie 14 et 19) alors que les embryons monosomiques expriment une létalité plus précoce (morula ou blastocyste); le développement des embryons anormaux dépend du chromosome considéré : la monosomie ou la trisomie 17 conduisant à un arrêt très précoce des clivages; les anomalies des chromosomes sexuels 39,X ou 41,XYY sont compatibles avec la vie adulte (contrairement aux anomalies autosomiales) sauf pour les embryons 39,Y qui interrompent leurs divisions dès le stade 8 cellules.

Deux facteurs peuvent accroître le taux d'anomalies chromosomiques dans les conceptus humains : 1) un retard à la fécondation; dans 1% des ovocytes fécondés *in vitro* (FIV), la fécondation est spontanément retardée puisque les pronucléus n'apparaissent que 42 h après l'insémination et la première division 24 h plus tard. Dans ce cas, les embryons ne dépassent généralement pas le stade de 8 cellules et le taux d'anomalies chromosomiques atteint 87%. L'observation régulière du déroulement des événements de la FIV permet donc d'exclure les embryons à haut risque génétique (Plachot *et al*, 1988a); 2) l'âge maternel, dont le rôle est maintenant bien connu dans l'étiologie des anomalies chromosomiques et des échecs du développement embryonnaire (Gindoff et Jewelewicz, 1986). Elles sont la conséquence des anomalies chromosomiques obser-

vées dans les ovocytes humains : 38% chez les femmes de plus de 35 ans comparé à 24% chez les femmes plus jeunes (Plachot *et al*, 1988c).

## LA PARTHÉNOGÉNÈSE

La découverte d'embryons humains parthénogénétiques est contemporaine de l'avènement de la FIV (Angell *et al*, 1983) : aucun caryotype haploïde n'avait jusqu'alors été observé dans les fausses couches spontanées ou à la naissance. En revanche, cette anomalie n'est pas exceptionnelle au stade préimplantatoire puisque 1,6% des œufs humains inséminés pour FIV et examinés 17 h après l'insémination ont un seul pronucléus, témoin d'une activation parthénogénétique (probablement induite par les spermatozoïdes) qui aboutit à la mort précoce de l'œuf (Plachot *et al*, 1987).

En effet, lorsqu'on les cultive pendant 7 j dans les conditions classiques de la FIV, 77% d'entre eux se divisent et 20% atteignent le stade de blastocyste en culture. L'aspect morphologique de ces embryons, leur vitesse de division et leur capacité à se développer *in vitro* ne diffèrent pas de ceux des embryons fécondés diploïdes (Plachot *et al*, 1988b). La létalité de cette anomalie s'exprime donc pendant la période péri-implantatoire.

Le caryotype des embryons de 2 à 8 cellules qui résultent d'une activation parthénogénétique est variable : haploïdes (46%) ou diploïdes (29%) selon qu'il y ait eu ou non émission du 2<sup>e</sup> globule polaire, ou encore mosaïques  $n/2n$  ou  $2n/3n$  (25%). Ces œufs, le plus souvent initialement haploïdes, peuvent subir une diploïdisation spontanée précoce (conduisant à un caryotype homogène diploïde) ou tardive (conduisant à des mosaïques), comme cela a déjà été décrit chez cer-

taines espèces animales (Plachot *et al*, 1988b). Par ailleurs, aucune relation n'a été observée entre l'aspect morphologique de ces embryons et leurs différents caryotypes. La facilité du diagnostic d'une activation parthénogénétique le lendemain de l'insémination permet l'exclusion quasi-totale de ces œufs lors du transfert et augmente ainsi les chances de grossesse, directement liées au nombre d'embryons sains transférés.

## LA TRIPLOÏDIE

Plus grave que la précédente, la triploïdie est une anomalie bien connue puisque 1,5% de toutes les conceptions et 20% des produits de fausses couches spontanées d'origine chromosomique sont triploïdes. Qui plus est, quelques enfants triploïdes (le plus souvent mosaïques) sont nés dans le monde, porteurs de malformations multiples sévères (de Grouchy et Turleau, 1982).

La FIV a permis d'étudier plus précisément la triploïdie qui survient dans 6,4% des cas, c'est-à-dire environ 4 fois plus fréquemment qu'après fécondation *in vivo*.

Bien qu'il n'y ait pas toujours de consensus dans la littérature, plusieurs facteurs semblent néanmoins responsables de la survenue d'une triploïdie.

### **La fécondation in vitro elle-même**

Par le biais de plusieurs facteurs; le nombre élevé de spermatozoïdes inséminés (50 000/ml), le degré d'immaturité ou de postmaturité des ovocytes, lequel peut être lié à un échec du contrôle de l'ovulation ou à une préincubation inadéquate des ovocytes avant l'insémination (Wentz *et al*, 1983).

Certains facteurs physiques, tels que des fractures de la zone pellucide, peuvent également induire une polyspermie. Plusieurs spermatozoïdes peuvent s'engouffrer dans cette brèche sans qu'il y ait de possibilité de blocage de la polyspermie, lequel s'effectue au niveau de la zone pellucide et non de la membrane plasmique dans l'espèce humaine (Gordon *et al*, 1988).

### **Le vieillissement de l'ovocyte**

L'effet néfaste du vieillissement de l'ovocyte sur l'efficacité de la réaction corticale conduisant à une polyspermie est aujourd'hui bien connu. Dandekar et Fraser (1976) montrent chez le lapin que lorsque l'insémination *in vitro* d'ovocytes préincubés 2,5 ou 4 h est réalisée avec des spermatozoïdes recueillis dans l'utérus, le taux de triploïdie est de 3,8 et 5,8% respectivement et passe à 11 et 20% lorsqu'ils utilisent des spermatozoïdes vaginaux.

Ces résultats montrent que le retard à la fécondation lié à la durée de capacitation des spermatozoïdes vaginaux augmente le vieillissement de l'œuf, et, par voie de conséquence, la polyspermie.

### **Le traitement inducteur de l'ovulation**

Le rôle éventuel d'une stimulation ovarienne sur l'augmentation du taux d'anomalies chromosomiques en général et de la triploïdie en particulier est d'autant plus crucial qu'aujourd'hui toutes les tentatives de FIV se font après induction de l'ovulation.

Or il n'existe aucune série témoin d'œufs fécondés *in vitro* au cours d'un cycle naturel dans l'espèce humaine. La seule étude connue et déjà ancienne est celle de Boué et Boué (1973), qui mon-

trient sur une petite série que l'utilisation d'inducteurs de l'ovulation augmente le taux global d'anomalies chromosomiques observées dans les fausses couches spontanées (83%) ( $n = 47$ ) par rapport aux fausses couches survenant au cours de cycles naturels (61%) ( $n = 1374$ ) avec une annulation de l'effet délétère deux mois après l'arrêt du traitement. Des résultats identiques ont été rapportés chez le lapin (Fujimoto *et al*, 1974) et la souris (Takagi et Sasaki, 1976) mais pas chez le hamster (Sengoku et Dukelow, 1988).

### **L'environnement hormonal de la maturation ovocytaire**

Il est possible que des modifications hormonales inhabituelles survenant au cours de la maturation ovocytaire puissent avoir des conséquences néfastes sur le devenir de l'œuf.

Ainsi, des fécondations polyploïdes surviennent préférentiellement chez des ovocytes provenant d'un follicule dont le liquide folliculaire contient des concentrations élevées d'insuline (Webster *et al*, 1988) ou de progestérone (Ben Rafael *et al*, 1987).

Comme dans les cas de parthénogénèse, le caryotype des embryons qui résultent des œufs triploïdes est inattendu. Sur une série de 60 embryons, 5% sont haploïdes, 32% sont diploïdes (témoignant de l'exclusion de 2 ou 1 pronucléus respectivement, probablement liée à l'asynchronisme de développement des pronucléus), 34% sont triploïdes et 29% mosaïques  $2n/3n$ . Des résultats identiques ont été rapportés par Michelman *et al* (1986), et Veiga *et al* (1987).

L'aspect morphologique de ces embryons ne permet pas de reconnaître ceux qui ont retrouvé un caryotype diploïde, parmi lesquels se trouvent des embryons

gynogénétiques 46,XX (moins le pronucléus mâle), androgénétiques 46,XX ou XY (moins le pronucléus femelle) ou bien 46,YY (létaux) et, dans quelques cas, un embryon normal.

Vingt pour-cent des embryons triploïdes se développent *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste (Plachot *et al*, 1988b). La détection des œufs triploïdes après FIV et leur exclusion du transfert a considérablement diminué le taux de fœtus triploïdes dans les fausses couches spontanées d'origine chromosomique (5%) par rapport à la fécondation *in vivo* (20%) (Plachot, 1989).

## CONCLUSION

En permettant l'examen très précoce des œufs fécondés et des embryons humains, la FIV a montré un taux élevé d'aberrations chromosomiques avant l'implantation. Le taux faible de grossesses après fécondation *in vitro* ou *in vivo* (20–25%) ainsi que le taux élevé de fausses couches spontanées 25% (contre 18% après fécondation *in vivo*) témoignent de l'élimination de la quasi-totalité des embryons porteurs d'une anomalie chromosomique. Le taux identique de nouveau-nés porteurs d'une anomalie cytogénétique après fécondation *in vivo* ou *in vitro* (0,6%) montre que cette technique est sans conséquence néfaste sur la qualité du conceptus. Les résultats présentés reposent le problème de l'opportunité d'un diagnostic génétique préimplantatoire, qui, en permettant le choix des meilleurs embryons pour le transfert, accroîtrait l'efficacité globale de la FIV.

## RÉFÉRENCES

- Angell RR, Aitken RJ, Van Look PFA, Lumsden MA, Templeton AA (1983) Chromosome abnormalities in human embryos after *in vitro* fertilization. *Nature* 303, 336-338
- Angell RR, Templeton AA, Aitken RJ (1986) Chromosome studies in human *in vitro* fertilization. *Hum Genet* 72, 333-339
- Baranov VS (1983) Chromosomal control of early embryonic development in mice. I. Experiments on embryos with autosomal monosomy. *Genetica* 61, 165-177
- Ben Rafael Z, Meloni F, Strauss JF, Blasco L, Mastroianni L, Flickinger GL (1987) Relationship between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin treated women. *Fertil Steril* 47, 284-288
- Boué JG, Boué A (1973) Increased frequency of chromosomal anomalies in abortions after induced ovulation. *Lancet* i, 679-680
- Dandekar PV, Fraser LR (1976) A comparison of *in vitro* fertilization of rabbit eggs using spermatozoa recovered from the uterus or vagina. *J Reprod Fertil* 46, 77-81
- Fujimoto S, Pahlavan N, Dukelow WR (1974) Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil* 40, 177-181
- Gindoff PR, Jewelewicz R (1986) Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril* 46, 989-1001
- Gordon JW, Grundfeld L, Talansky BE, Garrisi GJ, Richards C, Wiczyc H, Rappaport D, Navot D, Laufer N (1988) The human oocyte blocks polyspermy at the zona pellucida. *Proc 44th Annual Meeting of the American Fertility Society*. Published by the American Fertility Society, Birmingham, AL, in the program supplement
- Grouchy J de, Turleau C (1982) *Atlas des maladies chromosomiques*. Expansion Scientifique Française, Paris
- Machin GA, Crolla JA (1974) Chromosome constitution of 500 infants dying during the perinatal period. *Humangenetik* 23, 183-198
- Michelman HW, Bonhoff A, Mettler L (1986) Chromosome analysis in polyploid human embryos. *Hum Reprod* 1, 243-246
- Nielsen J (1975) Chromosome examination of newborn children. Purpose and ethical aspects. *Humangenetik* 26, 215-222
- Papadopoulos G, Templeton AA, Fisk N, Randall J (1989) The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 4, 91-98
- Plachot M (1989) Chromosome analysis of spontaneous abortions after IVF. A European survey. *Hum Reprod* 4, 425-429

Angell RR, Aitken RJ, Van Look PFA, Lumsden MA, Templeton AA (1983) Chromosome ab-

- Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J, Grouchy J de, Salat-Baroux J, Cohen J (1987) Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2, 29-35
- Plachot M, Grouchy J de, Junca AM, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Cohen J (1988a) Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance. *Hum Reprod* 3, 125-127
- Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J, Cohen J, Salat-Baroux J (1988b) Les échecs du développement embryonnaire. *Reprod Nutr Dev* 28, 1781-1790
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, Grouchy J de, Calderon G, Lepretre S, Junca AM, Santalo J, Carles E, Mandelbaum J, Barri P, Degoy J, Cohen J, Egozcue J, Sabatier JC, Salat-Baroux J (1988c) Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life? A multicentric study. *Hum Reprod* 3, 627-635
- Sengoku K, Dukelow WR (1988) Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod* 38, 150-155
- Tagaki N, Sasaki M (1976) Digynic triploidy after superovulation in mice. *Nature* 264, 278-281
- Veiga A, Calderon G, Santalo J, Barri P, Egozcue J (1987) Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programme. *Hum Reprod* 2, 425-430
- Webster BW, Diamond MP, Osteen KG, Wentz AC (1988) Endocrine profile of follicles containing oocytes with subsequent polyploid fertilization. *Fertil Steril* 50, 727-731
- Wentz AC, Repp JE, Maxson WS, Pittaway DE, Torbit CA (1983) The problem of polyspermy in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 40, 748-754
- Wimmers MSE, Van der Merwe JV (1988) Chromosome studies on early human embryos fertilized *in vitro*. *Hum Reprod* 3, 894-900