

J. Mandelbaum

## Histoire de la fécondation *in vitro*

### Introduction

Le 25 juillet 1978 naissait, en Angleterre, Louise Brown, le premier enfant conçu par fécondation *in vitro* (FIV) et transfert embryonnaire dans l'utérus maternel. Ce jour-là, le biologiste Robert Edwards et le gynécologue Patrick Steptoe démontraient à la communauté scientifique sceptique, voire hostile, que les travaux réalisés depuis plus de 20 ans chez les petits mammifères étaient transposables à l'espèce humaine. Un espoir extraordinaire se levait pour toutes les femmes atteintes de stérilité tubaire définitive. Cet enfant était environ le soixante-quinzième être vivant (après quelques lapins et autres rongeurs) conçu par cette technique. Trente ans plus tard, on mesure le chemin parcouru. La FIV s'est enrichie de techniques collatérales : congélation d'embryons, d'ovocytes, de tissus gonadiques, ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*), DPI (diagnostic préimplantatoire), don d'ovocytes, etc. L'ICSI a révolutionné le traitement des stérilités masculines. La FIV et ses « dérivés » sont proposés dans bien d'autres indications (stérilités idiopathiques, endométriose, risque viral, risque de transmission d'une maladie génétique grave, etc.) et représentent le dernier recours lorsque les ovocytes font défaut ou lorsque l'on veut préserver une fertilité que des traitements agressifs vont altérer. Ce sont entre 1 et 3 % des enfants, en Europe, qui sont issus de cette technique et, pour l'année 2002, on pouvait estimer leur nombre dans le monde à 230 000 environ (1). La FIV a longtemps été déclinée au futur, puis au présent... elle a maintenant également un passé respectable sur lequel on peut se pencher.

### La préhistoire de la FIV

Seuls les auteurs qui publient ont une petite chance de passer à la postérité, leurs écrits représentant le

matériau de l'histoire qui s'écrira bien des années après. On peut ainsi penser que c'est vers 1880 que les premiers essais de culture *in vitro* de l'embryon de mammifères, conçu *in vivo*, eurent lieu à Vienne, grâce à Schenk (2). Il fut suivi par nombre de chercheurs variant les milieux, les conditions de culture, les espèces qui définirent, peu à peu, les prérequis indispensables au développement embryonnaire *in vitro* (3). Schenk s'essaya également, sans succès, à la fécondation *in vitro* dans le milieu extérieur.

Dès 1930, Grégory Pincus, médecin et biologiste américain, plus connu pour être le co-inventeur de la pilule contraceptive, tente les premières fécondations *in vitro* chez le lapin. Il se désole de voir qu'aucun des transferts dans la trompe, d'ovocytes exposés aux spermatozoïdes n'aboutit à une naissance. En 1934, avec Enzmann (4), dans le laboratoire de physiologie générale de l'université de Harvard, il découvre qu'il faut 12 heures de culture pour que des ovocytes, prélevés dans des follicules immatures, reprennent leur méiose et parviennent en métaphase 2. Aidé d'Enzmann et de Saunders, il recommence alors l'expérience de transfert intratubaire d'une mixture ovocyte-spermatozoïdes et pense avoir réussi la fécondation *in vitro*... en fait, sans doute, des fécondations *in vivo* dans la trompe, les premiers GIFT (*gamete intra fallopian transfer*) de l'histoire. Leurs travaux sont contemporains de la sortie du *Meilleur des Mondes* d'Aldous Huxley (1932), qui fait de la FIV la méthode labellisée de conception des êtres humains dans une société technologique et totalitaire, pour le moins inquiétante. Est-ce cette fiction et sa proximité avec Pincus qui ont amené, 10 ans plus tard, en 1944, John Rock, un célèbre gynéco-obstétricien de Harvard, à tenter avec Miriam Menkin (5) l'aventure de la FIV... humaine cette fois ? Toujours est-il qu'ils récupèrent plusieurs centaines d'ovocytes en péroopératoire et en inséminent 138 *in vitro*. Le recueil se fait le plus souvent en début de phase folliculaire et sans, bien sûr, aucun monitoring de l'ovulation. Ils pensent avoir obtenu les trois premiers

embryons humains conçus *in vitro*. Difficile cependant de leur attribuer ce crédit en l'absence de preuves évidentes de fécondation. D'autant que, se basant sur les travaux de Pincus, ils considèrent que l'ovocyte humain immature n'a besoin que de 12 heures pour atteindre la métaphase 2 et devenir fécondable. Sans doute ces « embryons » étaient-ils tout simplement des ovocytes fragmentés. Finalement, ils abandonnent ce projet, sans avoir été jusqu'au transfert *in utero*. C'est le lapin qui sera la première espèce de mammifère chez laquelle la fécondation *in vitro* sera réussie, scientifiquement documentée et attribuée, selon l'origine géographique des commentateurs, soit au Français Charles Thibault, soit à l'Américain MC Chang. En 1954, Charles Thibault et ses collègues, Louis Dauzier et Suzanne Winterberger-Torres, publiaient dans les Comptes rendus de l'Académie des Sciences l'image d'un ovocyte de lapine présentant, dans son cytoplasme, deux pronuclei mâle et femelle ainsi que des restes du flagelle. Cette image prouvait indubitablement que cet ovocyte, recueilli dans la trompe après son ovulation et mis en présence de spermatozoïdes capables *in utero*, avait bien été fécondé *in vitro* (6). Mais c'est la publication de Chang, en 1959, qui confirmait que cette FIV était bien capable d'aboutir à un développement embryonnaire normal et à la naissance de jeunes (7). Chang, après avoir quitté la Chine et sa province natale du Shanxi pour poursuivre son cursus de biologiste, avait travaillé à Edinburg puis Cambridge où il avait rencontré le virus de la biologie de la reproduction. Mais c'est à la Worcester Foundation of Experimental Biology, dans le Massachusetts qu'il sera finalement recruté par Grégory Pincus pour travailler sur la fécondation *in vitro*. Ses travaux, menés chez le lapin, sont parallèles à ceux de l'équipe de Thibault à l'INRA de Jouy-en-Josas. Chang décide de transférer des zygotes à 2 PN, issus de la FIV des gamètes d'un couple de lapins noirs, dans une femelle receveuse blanche et obtient des lapereaux dont la noirceur prouve l'origine : la FIV avait dès lors un avenir ! Chang restera, sans doute, plus associé, dans la mémoire scientifique, aux cinq années (1951-1956) passées à travailler avec Pincus sur l'administration par voie orale de la pilule contraceptive combinée, que pour ses autres activités de recherche. J'ai cependant le souvenir d'un monsieur de 80 ans, recevant en 1987, à Norfolk (Fifth World Congress on IVF), un prix pour l'ensemble de ses travaux : plus de 350 publications, essentiellement dans le domaine de la reproduction, dont les premières données sur la capacitation des spermatozoïdes, là encore, parallèlement à l'Australien Colin Austin (8). C'est dire si la recherche sur la reproduction chez les mammifères était mondiale et amenait pas à pas vers la FIV humaine.

En attendant, les découvertes sur la capacitation et la réaction acrosomique du spermatozoïde ouvrent la voie à la FIV avec des spermatozoïdes capables, non plus dans le tractus génital femelle, mais *in vitro* (in 9, 10). Et c'est la première FIV chez le hamster, grâce à Yanagimachi et... Chang, encore (11). Ruizo Yanagimachi deviendra le « maître » d'Hawaï, l'un des plus inventifs parmi les biologistes de la reproduction, celui qui obtint, (entre autres prouesses) des souriceaux normaux après lyophilisation des spermatozoïdes (12). Resté fidèle au modèle rongeur (hamster puis souris), il est encore, en 2009, co-auteur de publications dans PNAS dont l'une sur la régulation épigénétique durant le clonage. Lors d'un congrès international, je le rencontrai, très impressionné par ce talentueux chercheur, qui travaillait comme Michelle Plachot et moi, à l'époque, sur le hamster doré. Notre timidité céda rapidement devant ce petit monsieur simple et chaleureux, avide de discuter de données expérimentales et dont l'accent de citoyen américain d'origine japonaise transformait les « *in vitro* et *in vivo* », qui émaillaient souvent nos propos, en réjouissants « *in bibo* et *in bitro* », que nous n'oublierions pas de sitôt.

Après le hamster, c'est chez la souris que fut réussie la FIV (1968), grâce à David Whittingham (13), autre grand nom de la biologie de la reproduction, à qui l'on doit les premières congélations de morulae (1972) (14) et d'ovocytes de souris (1977) (15), avec naissance de jeunes. Il ouvrait ainsi la voie à la cryoconservation des gamètes et embryons de mammifères. Mais ne brûlons pas les étapes. Ce n'est qu'en 1969 que les premières preuves cytologiques de la fécondation *in vitro* de l'ovocyte humain furent apportées (16) et il fallut encore attendre une décennie pour que soient décrites les premières FIV chez les animaux de ferme : vache, porc, chèvre, mouton et deux décades pour qu'il en soit de même chez le cheval. De même, ce n'est que 4 ans après la naissance de Louise Brown que naît le premier veau éprouvette (1982) et il faut patienter jusqu'en 1990 pour célébrer le premier poulain FIV (17). La préhistoire de la FIV s'achève, entrons dans l'histoire.

## L'histoire de la FIV humaine commence en Angleterre

### La maturation ovocytaire

C'est comme généticien et spécialiste de la souris que Robert G, dit Bob, Edwards commença sa carrière de biologiste et obtint sa thèse de sciences. Quelques années plus tard, il s'intéresse à la maturation de l'ovocyte dans le but de réaliser

fécondation et développement embryonnaire *in vitro* jusqu'au stade blastocyste, fasciné déjà par les potentialités extraordinaires qu'il entrevoit dans les cellules dissociées du bouton embryonnaire, futures cellules souches (18). Il confirme que la maturation ovocytaire *in vitro* nécessite 12 heures chez les rongeurs pour passer du stade de vésicule germinative à celui de métaphase 2, mais découvre avec étonnement qu'il n'en va pas de même chez les ruminants et les primates où 37 heures semblent indispensables pour réaliser le même parcours et obtenir des ovocytes fécondables. Qu'en est-il chez la femme ? Ce même long délai semble nécessaire (19). Pour poursuivre ce travail, Bob Edwards a besoin d'ovocytes, beaucoup d'ovocytes et les quelques fragments d'ovaire que les docteurs Molly Rose, puis Victor Lewis, lui fournissent à Londres, ne suffisent pas. Lorsqu'il évoquait son envie de poursuivre jusqu'à la fécondation et au développement embryonnaire, les regards de nombre de gynécologues contactés se détournent et les espoirs de collaboration s'évanouissent. Grâce à l'entremise de Victor McKusick, chef du service de génétique médicale à l'hôpital Johns Hopkins de Baltimore, il obtient une bourse pour séjourner 6 mois dans le service de gynécologie-obstétrique où officient les Jones, Howard et Georgeanna, lui connu comme chirurgien de la stérilité, elle comme gynécologue et endocrinologue de la reproduction, tous les deux passionnés et vite enthousiastes devant le projet de FIV humaine. Ils fournissent à Bob des tranches d'ovaires polykystiques, obtenues lors de classiques résections cunéiformes (aujourd'hui abandonnées au profit du « drilling » ovarien) et qui contiennent nombre de follicules antraux. Le travail avance vite dans le petit laboratoire attenant au bloc opératoire et la chronologie de la maturation de l'ovocyte humain est confirmée (20). Il reste deux semaines avant le retour à Londres, délai que Bob met à profit pour tenter de féconder les ovocytes maturés *in vitro*. Difficile d'imaginer qu'en si peu de temps autant d'approches furent tentées : insémination des ovocytes avec des spermatozoïdes lavés, en présence de fragments de trompe, d'endomètre ou de mucus cervical, avec l'obsession de réussir la capacitation des spermatozoïdes humains pour laquelle le simple lavage était bien suffisant. Ils essaient d'incuber les gamètes dans la trompe de lapine mais les ovocytes sont rapidement entourés d'un manteau mucineux de sécrétions tubaires tandis qu'ils disparaissent dans celles du singe macaque (*cynomolgus*). Tout cela n'aboutit qu'à l'obtention de quelques ovocytes présentant bien deux pronuclei... mais pas de flagelle intracytoplasmique prouvant qu'il ne s'agit pas d'un artefact (21). Ce travail collaboratif anglo-américain fut donc publié en tant que « tentative d'obtenir la FIV humaine »

et non en tant que premier succès (22). Pourtant, des années plus tard, en revoyant les clichés pris à cette époque, Bob Edwards se dit que la technique de fixation utilisée pouvait avoir empêché la visualisation du flagelle et la reconnaissance de cette première avancée.

### Les premiers ovocytes humains fécondés

Revenu en Angleterre, il cherche toujours un gynécologue, prêt à se lancer avec lui dans l'aventure de la FIV humaine. Il a lu dans le *Lancet* un article d'un gynéco-obstétricien de l'hôpital général d'Oldham, Patrick Steptoe sur une nouvelle technique, la coelioscopie, que ce dernier a apprise au contact de Raoul Palmer à Paris et adoptée. Parmi toutes les possibilités qu'elle offre, le fait de ponctionner les follicules ovariens afin d'aspirer les ovocytes qu'ils contiennent, retient l'attention de Bob Edwards. En effet, lorsque MC Chang a voulu réitérer son expérience de fécondation *in vitro*, à partir d'ovocytes maturés *in vitro* cette fois, il n'obtint qu'un développement embryonnaire limité aux premiers stades de clivage et aucune naissance après transfert intratubaire. Bob Edwards est donc à la recherche d'ovocytes humains préovulatoires, mûris à l'abri de leur follicule dans l'ovaire et recueillis juste avant l'ovulation afin de réussir non seulement la fécondation *in vitro*, mais également le développement d'embryons viables. Il téléphone à Steptoe et lui expose son projet. La réponse n'est pas négative, ils conviennent de se recontacter. Mais Oldham est loin, à 200 miles de Cambridge et Bob hésite. Quelques semaines plus tard, ils sont tous deux orateurs lors d'une réunion de la Société Royale de Médecine à Londres. « Vous ne m'avez pas rappelé » remarque Steptoe ! C'est le début d'une longue collaboration qui amènera Bob Edwards à faire régulièrement 4 heures de route pour chercher à Oldham, les ovocytes qui serviront aux essais de fécondation *in vitro* dans le laboratoire de Physiologie de l'Université de Cambridge. À cette époque, Bob a toujours la même obsession : la capacitation des spermatozoïdes humains et Patrick demande à ses patientes, avant hystérectomie, d'avoir des rapports avec leur conjoint afin de placer des ovocytes maturés *in vitro* dans leur trompe pour une fécondation *in vitro*... intratubaire !

Mais rapidement, Bob maîtrise la maturation ovocytaire, utilise les milieux simples de fécondation décrits chez le hamster, contrôle les conditions de culture et, avec l'aide de Barry Bavister, un de ses doctorants qui invente de nouveaux milieux, plus adaptés, il réalise enfin la fécondation de l'ovocyte humain *in vitro*, de façon reproductible et efficace (23, 24).

La collecte percoelioscopique de l'ovocyte préovulatoire se développe et permet l'obtention d'ovocytes

ayant réalisé leur maturation *in vivo*. Edwards et Steptoe perfectionnent le système : des patientes, à cycle normal, reçoivent deux à trois injections de gonadotrophines hMG (*human menopausal gonadotrophins*), en phase folliculaire. Lorsque les cinq à six follicules, qui n'ont pas entamé leur processus d'atréxie, sécrètent une quantité suffisante d'œstrogènes, une injection d'hCG (*human chorionic gonadotrophin*) déclenche leur maturation. Une cœlioscopie permet le recueil d'ovocytes qui sont, 28 heures après l'hCG en métaphase 1 et à 35-36 heures, en métaphase 2, juste avant l'ovulation (25). On vérifie ainsi, pas à pas, que maturation *in vivo* et *in vitro* ont bien la même chronologie, chez l'humain. Dès lors, plus de pénurie d'ovocytes, plus de nécessité de réaliser une maturation *in vitro* préalable et l'étude du développement embryonnaire peut commencer, développement que l'on va aider en utilisant un milieu plus riche, surtout en pyruvate, le Ham's F10 auquel on va adjoindre du sérum ou de l'albumine. Et les résultats seront spectaculaires, permettant de décrire tous les stades de clivage de l'embryon humain, jusqu'au stade de blastocyste expansé puis éclos (26, 27).

### Les premiers transferts

Il est temps de passer au transfert dans l'utérus et à la phase clinique de l'aventure. Les risques d'anomalies des enfants nés de ces embryons conçus *in vitro* leur paraissent peu importants, au vu de la vaste expérimentation animale existante du développement comparée de l'embryon *in vivo* et *in vitro* chez diverses espèces. Tout étant à inventer, il faut définir les conditions du transfert, atraumatique, aseptique, avec le minimum de milieu possible... À partir de là, l'équipe commence à réaliser le transfert *in utero* des embryons clivés chez des femmes infertiles, atteintes de stérilité tubaire définitive, pour qu'il n'y ait aucun doute quant à la réalité d'un éventuel succès... mais échouent à obtenir la moindre grossesse. Parmi tous les problèmes qui auraient pu expliquer ces échecs, Bob Edwards désigne un responsable, le corps jaune. En effet, le traitement par hMG-hCG entraînant une phase lutéale courte de 8-9 jours, il semblait indispensable de réaliser une supplémentation en progestérone pour compenser ce déficit lutéal et favoriser l'implantation et le début de la grossesse. À l'époque, il n'existait pas encore de progestérone micronisée et pour éviter des injections intramusculaires quotidiennes douloureuses, un progestatif retard, le caproate d'hydroxyprogestérone ou dépôt Primolut®, fut choisi (250 mg tous les 5 jours). Edwards et Steptoe ne savent pas qu'il a un effet lutéolytique et délétère sur le développement de l'endomètre et se désespèrent. Heureu-

sement, les dosages plasmatiques de la  $\beta$ hCG sont devenus disponibles et se révèlent positifs, 8 jours après le transfert, chez plusieurs des patientes traitées. L'implantation avait donc bien eu lieu, mais la grossesse s'était rapidement interrompue, grossesse « biochimique » seulement, un concept et un vocable promus à un bel avenir.

Le moral de l'équipe remonte, on abandonne le Primolut et l'on essaie de varier les types de soutien de la phase lutéale, les types de stimulation. Cependant les temps sont difficiles. Les critiques ne manquent pas en Angleterre à l'encontre de ces tentatives d'apprenti sorcier. Elles émanent souvent de confrères et poussent Edwards et Steptoe à très tôt s'engager dans une réflexion éthique et sociétale (28). Par ailleurs, les rivalités pointent, la perspective de la FIV humaine tente d'autres équipes, en Amérique, et surtout en Australie où, en 1973 déjà, de Kretzer a rapporté deux grossesses biochimiques, dont la réalité est peut être contestable, mais qui prouvent que la course est engagée (29). En 1975, toujours après stimulation par gonadotrophines et transfert d'un blastocyste, survient une grossesse... tubaire cette fois (30), dont Steptoe pratique l'exérèse à 11 semaines. C'est une tragédie pour la patiente, une immense déception pour eux, mais ils tiennent la preuve, devant le jeune fœtus d'apparence normale que l'application clinique de la FIV est possible. Ils découvrent aussi, avec surprise qu'une grossesse, même après transfert *in utero* de l'embryon, peut être ectopique.

### Louise Brown, enfin !

Déprimés mais tenaces, ils décident de se tourner vers le cycle spontané avec un monitoring de la LH urinaire toutes les 4 heures pour déterminer le moment du pic spontané de LH, et cette fois le succès sera au bout du chemin. Il était temps, Patrick Steptoe, bientôt à la retraite, doit bientôt quitter Oldham. Le 10 novembre 1977, il prélève un ovocyte à Lesley Brown et deux jours et demi plus tard, il lui transfère un embryon de 8 cellules. Cette fois, la grossesse est évolutive. Heureusement, c'était la deuxième patiente prise en charge en cycle spontané ! Au printemps 1978, a lieu à Paris, à l'hôpital Necker, la réunion annuelle de la Société Nationale pour l'Étude de la Stérilité et de la Fécondité (l'actuelle SFEF). Le thème du colloque est l'implantation de l'œuf. Bob Edwards a été invité à y présenter ses travaux. Il nous parlera de toutes les étapes, des difficultés, des grossesses précocement interrompues, de la grossesse extra-utérine. Nous sommes fascinés mais un peu déçus que tout cela n'aboutisse toujours pas. Le mardi 25 juillet 1978, peu avant minuit, Louise Brown, 2 700 grammes, naissait par césarienne à l'hôpital

général d'Oldham, consacrant 10 ans de travail et introduisant dans la reproduction humaine une quatrième dimension (31). Charles Thibault a difficilement pardonné à Bob Edwards d'avoir tu cette grossesse, proche du terme, lors de sa venue à Paris et ce dernier n'a jamais compris que l'on puisse imaginer qu'il annoncerait en France et à l'avance un événement de cette importance, qui demeura secret jusqu'au bout pour permettre à Lesley et John Brown de vivre tranquillement cette naissance, tandis que 3 000 journalistes avaient élu domicile à Oldham, traquant le « scoop ». Des 32 transferts en cycle spontané, réalisés à cette époque, résultèrent trois autres grossesses dont une FCS triploïde, un accouchement prématuré à 20 semaines d'un enfant qui ne survécut pas. La mère, au grand dam de Bob Edwards, avait décidé de faire un week-end de randonnée, peu après son amniocentèse. Enfin, l'accouchement d'un garçon cette fois, parfaitement normal, achevait la saga d'Oldham (32-33). Laissons la parole à Charles Thibault : « Les succès de la fécondation *in vitro* sont le résultat, on ne le soulignera jamais assez, de recherches cliniques poursuivies avec une admirable persévérance. Il faut avoir à l'esprit cette véritable traversée du désert qu'ont été pour Edwards les dix années écoulées avant que ne soit obtenue, en 1978, la première naissance d'un bébé humain résultant d'une fécondation *in vitro*. Une telle ténacité ne s'observe pas pour les études chez l'animal. Les chercheurs sont pressés de publier, les décideurs sont impatients. Ce fait est à mon sens regrettable, car de nombreuses questions difficiles mériteraient d'être étudiées chez l'animal. Ce n'est que de cette sorte de va-et-vient entre l'animal et l'homme et de cette confrontation réitérée que peuvent être attendus de nouveaux progrès. Mais il faut savoir que les fruits mûrissent lentement. »

## La FIV en France

### Un terrain propice

Pour que la FIV humaine réussisse, il fallait une collaboration entre des biologistes de la reproduction ayant l'habitude de la fécondation *in vitro* animale, des gynécologues revenus des succès très relatifs de la chirurgie tubaire et rompus à la cœlioscopie, des endocrinologues et des biochimistes de la reproduction. La France était particulièrement bien placée dans cette configuration.

Charles Thibault, l'un des principaux fondateurs de l'école de biologie de la reproduction dans notre pays, avait été le premier à obtenir la fécondation *in vitro* d'un ovocyte de mammifère, il dirigeait

le laboratoire de physiologie animale de l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) et la Chaire de physiologie de la reproduction de l'Université Paris 6. Il entretenait des liens privilégiés avec les gynécologues et médecins de la reproduction comme Albert Netter et René Musset puis Jean Cohen, Jacques Salat-Baroux et tant d'autres. Passionné par sa discipline, avide d'échanger, de transmettre, de créer des opportunités, il fonda en 1981 le Club fécondation, une « auberge espagnole », comme il l'appelait lui-même, où se retrouvaient des chercheurs travaillant tant sur la reproduction humaine que sur celle des animaux de ferme, des rongeurs, des poissons et crustacés... où chacun amenait ses questions, ses problèmes, ses avancées dans une stimulante discussion qui nous faisait rejoindre Jouy-en-Josas avec enthousiasme malgré la distance. Charles Thibault savait la grandeur et la servitude de la recherche : s'il avait été le premier à féconder l'ovocyte de lapin *in vitro*, il faudra 25 ans pour que son équipe arrive à faire de même chez le bovin. Les premiers qui se lancèrent dans l'aventure de la FIV humaine du côté de la biologie étaient ses élèves.

Les traitements de l'infertilité du couple avaient été développés depuis les années 1940 en France par quelques écoles phares comme celle de l'hôpital Broca à Paris avec Raoul Palmer, celle de l'hôpital Necker où Albert Netter et son équipe d'endocrinologue de la reproduction et de gynécologues médicaux formaient tandem avec le chirurgien René Musset installé lui à l'Hôtel-Dieu, et bien d'autres encore... Tous les ingrédients étaient réunis pour que la FIV humaine ait une histoire française.

### L'émergence de deux équipes

Dès 1973, Albert Netter dont je venais de devenir l'une des chefs de clinique me proposa comme objectif de recherche : la fécondation *in vitro* dans l'espèce humaine. Lasse d'annoncer des diagnostics de stérilité définitive à des couples désespérés, j'acceptais sans hésitation. Pour y parvenir, l'expérimentation animale s'imposait. C'est finalement en binôme que nous démarrâmes avec Michelle Plachot, jeune biologiste Inserm qui travaillait dans le laboratoire du service. Charles Thibault accepta de nous encadrer et nous proposa d'étudier la fécondation de l'ovocyte du hamster doré de Syrie (*Mesocricetus auratus*), après maturation *in vivo* ou *in vitro*. Nous avons décrit une particularité de l'ovocyte du hamster dont la maturation devait être nucléaire, mais aussi membranaire pour pouvoir être fécondé. De même que la maturation cytoplasmique, ces modifications de la zone pellucide ne s'obtenaient qu'*in vivo*, juste avant l'ovulation. Nous tentions d'en comprendre

les mécanismes dans le laboratoire de l'hôpital Necker que nous avons installé, grâce à l'aide bienveillante de Pierre Mauvais-Jarvis qui était devenu mon chef de service, de Jean de Grouchy, directeur INSERM de l'unité, dont dépendait Michelle, et de Pierre Royer. La naissance de Louise Brown nous rappela que là était notre objectif.

Peu de temps après, Charles Thibault nous fit part de la demande de Jean Cohen qui cherchait des biologistes pour mettre en place un programme de FIV humaine. Lui aussi s'intéressait à la FIV depuis quelques années, mais ses essais chez le singe, avec A. Psychoyos à Saint-Antoine, avaient échoué (34). Il s'était alors adressé à Émile Papiernik, chef du service de gynécologie-obstétrique de l'hôpital Antoine Béchère de Clamart. Émile souhaitait développer un secteur de recherches multidisciplinaires avait constitué une unité INSERM originale de « physiologie et psychologie de la reproduction humaine » où, entre autre, une équipe de biologistes avec Ondine Bomsel, Alain Gougeon et Jacques Testart, arrivé de l'INRA en 1977, travaillaient sur le follicule ovarien humain. Au printemps 1978, sous l'impulsion d'un chef de clinique dynamique, René Frydman, Jacques Testart avait accepté de quitter la culture du follicule pour s'engager dans la fécondation *in vitro* (35). Jean Cohen attendait une réponse de Clamart quand Charles Thibault lui parla des « biologistes de Necker ». Nous apprenions ainsi qu'une équipe française s'était déjà investie dans la FIV humaine et nous n'avons pas hésité une seconde pour accepter à notre tour ce pari. La première phase fut expérimentale et nous fixions les ovocytes que nous estimions fécondés pour apporter la preuve que nous étions dans la bonne voie. Je me souviens de cette image, caractéristique d'un zygote à deux pronuclei que Charles Thibault avait décrété être, sans conteste, un œuf humain fécondé et non une parthénogenèse, quelle émotion ! Peu après, Jacques Salat-Baroux nous faisait la même demande de collaboration et nous devenions le laboratoire central où arrivaient les ovocytes, recueillis par Jean Cohen à l'hôpital de Sèvres et par Jacques Salat-Baroux à l'hôpital Tenon.

### Le cauchemar du cycle spontané

Bien que l'usage des gonadotrophines et du citrate de clomifène ait été très familier aux cliniciens des deux équipes, les déboires d'Edwards et Steptoe ne pouvaient être ignorés et tout le monde s'engagea dans la voie épineuse du cycle spontané : dosages urinaires toutes les 4 heures à la recherche du pic de LH. Les contraintes étaient grandes pour les patientes et rendaient notre vie imprévisible. Lorsqu'une femme entrait en surveillance, chaque fin d'après-midi était marquée par l'attente du

résultat des dosages qui décidait si le programme de la soirée pouvait se dérouler normalement. Nous découvriions que l'ovulation avait volontiers lieu en seconde partie de nuit. Il fallait, passé minuit, rejoindre le bloc opératoire ou le laboratoire, selon son statut de clinicien ou de biologiste. Pour notre part, c'était à Necker que nous guettions le conjoint portant le précieux thermos contenant le flacon de fluide folliculaire aspiré à Sèvres ou à Tenon et maintenu à 37° C. L'envie de réussir cette aventure, de répondre à l'attente anxieuse que nous lisions dans les yeux de nos patients, d'approcher ce miracle de la vie que nous observions sous nos microscopes nous permettait sans doute de supporter les contraintes et la fatigue de cette période. L'arrivée des dosages plasmatiques de LH et la description du LH SIR (*LH surge-initiating rise*) par l'équipe de Clamart améliorait les choses (36). Il devenait possible de repérer, non pas l'acmé du pic de LH, mais son début qui se situait 38-40 heures avant la rupture folliculaire. On disposait de plus de temps pour s'organiser et les échecs de recueil se faisaient moins fréquents. Si l'étape de fécondation ne nous posait plus de problèmes, les clivages étaient rares. Nos relations étaient très amicales avec l'équipe de Clamart et les échanges scientifiques habituels. C'est donc tout naturellement que nous discutâmes de ce problème. Quelle en était la cause ? Nos procédures étaient très proches et nous utilisions le même milieu. Mis au point à partir de la composition des fluides folliculaires, tubaires et utérins de la lapine, la brebis et la femme par Yves Ménézo, le fameux B2 fut appelé plus tard le « French milieu » car toute la FIV française l'adopta (37). Une différence de taille, cependant, notre configuration géographique imposait le transport des ovocytes et des embryons entre le bloc opératoire et le laboratoire; le transport était-il en cause ? Pour le savoir, nous bâtissions dans l'enthousiasme un protocole expérimental dans lequel pour dix patientes, le transport se ferait de Sèvres à Clamart et retour. Si des embryons étaient obtenus, c'est que le transport n'était pas en cause. C'est ce qui arriva, dès le premier essai, prenant tout le monde par surprise. Lorsque je vins chercher les embryons à Clamart pour aller faire avec Jean Cohen le transfert à Sèvres, je compris que nous n'avions pas réfléchi aux conséquences. Nous venions d'entrecroiser cliniciens et biologistes de deux équipes amies... mais néanmoins concurrentes<sup>1</sup>.

La première grossesse française qui en résulta était au centre d'un imbroglio tragi-comique, que Jacques Testart a déjà raconté (35) : Jean Cohen était heureux, les biologistes ennuyés, René Frydman en

1. Un nouvel « échange » entre les équipes aurait lieu, un peu plus tard, quand Joëlle Bélaïsch-Allart, quitte Clamart pour rejoindre Sèvres où elle succèdera à Jean Cohen, dans la responsabilité de l'AMP et à Vincent Lofredo en tant que chef du service de gynécologie-obstétrique.

colère. Le protocole expérimental s'arrêta là, les clivages avaient désormais lieu également à Necker, sans que nous ayons modifié nos pratiques.

Le transport des ovocytes et des embryons, dans de bonnes conditions de température et de pH fut largement utilisé par la suite, faute de mieux, par nombre d'équipes clinique et biologique n'ayant pas la même localisation géographique.

Quant à nous, l'interruption spontanée de cette grossesse au terme de 10 semaines remit la balle au centre. Que se passait-il à cette époque dans le monde ?

### La FIV marque une pause avant la généralisation de ses succès

Après les deux naissances d'Oldham, Edwards et Steptoe, désormais à la retraite, mirent 2 ans et

deux ans de pouvoir fonder ce qui allait devenir la célèbre clinique d'AMP de Bournhall, près de Cambridge. D'autres groupes s'étaient constitués dans plusieurs pays et continents mais les quelques grossesses obtenues n'étaient pas évolutives. Il en allait de même en France : FCS à Clamart, FCS à Tenon, FCS à Montpellier où s'était formée une nouvelle équipe réunissant Bernard Hédon, Olivier Flandres, Claude Humeau et Françoise Arnal. Le doute s'installait, quant à la reproductibilité de la FIV. Allait-on renouveler l'exploit anglais ? Ces incertitudes favorisaient échanges et discussions amicales lors de colloques, comme celui de Kiel en Allemagne de l'Ouest en septembre 1980 (38). On avait les mêmes problèmes, on tentait les nouvelles « recettes » en désespoir de cause, on cherchait... C'est dire si la naissance de Candice Reed en juin 1980 en Australie (39), troisième bébé FIV dans le monde, obtenue elle aussi en cycle naturel, rassura



**Fig. 1** — Photographie des participants à la troisième réunion de Bournhall (1997). *Premier rang (de gauche à droite)* : Bruce Lessey, Jan Tesarik, Georgeanna Jones, Howard Jones, Jacqueline Mandelbaum, Michelle Plachot. *Deuxième rang (de gauche à droite)* : Scott Chappell, Carlos Simon, Klaus Diedrich, Basil Tarlatzis, Karen Leib. *Troisième rang (de gauche à droite)* : J Russell, Arnaud Ythier, Anne Chandley, Renato Fanchin, Jean Cohen, Ernest Loumaye, Steve Smith. *Quatrième rang (de gauche à droite)* : Carol Warner, Marku Seppala, Lars Hamberger, Matts Wikland, Bart Fauser. *Dernier rang (de gauche à droite)* : Colin Howles, Kay Elder, David Gardner, Jack Cohen, André Van Steirteghem, Paul Devroey, Sergio Oehninger, Jacques Salat-Baroux, Bob Edwards, Peter Brinsden, Alan Trounson.

Plus de trente ans se sont écoulés depuis la naissance de Louise Brown ; plusieurs des « pionniers » de la FIV ont disparu, leur mémoire est vivante.

tout le monde, bientôt suivie par la reprise d'activité d'Edwards et Steptoe et les premières naissances de Bournhall. La FIV n'était pas une illusion.

La première réunion organisée à Bournhall, le 6 septembre 1981, rassembla les « pionniers » de la FIV qui avaient déjà eu des grossesses. Une des sujets le plus débattu fut celui de la stimulation ovarienne : Alan Trouson et John Leeton, les Australiens, plaidaient pour l'usage du clomifène qui permettait d'obtenir un peu plus d'ovocytes et de déclencher l'ovulation par hCG lorsque l'œstradiol plasmatique atteignait ou dépassait 300 pg/mL et par follicule (40). Georgeanna et Howard Jones, les Américains, rapportaient leur expérience malheureuse du cycle naturel : 41 cœlioscopies, 13 transferts, aucune grossesse. Ils étaient revenus à leur stimulation habituelle, les hMG-hCG et le treizième essai aboutissait à une grossesse évolutive (41).

Les deux années suivantes virent se succéder les faire-parts de naissances en France : février 1982, naissance d'Amandine à Clamart ; juin 1982 naissance d'Alexia à Sèvres ; mars 1983 naissance de Wilfrid à Tenon ; juillet 1983 naissance à Montpellier. En Suède, à Göteborg la première naissance FIV dans un pays nordique était rapportée en 1982 par Hamberger (42) et Feichtinger et Kemeter obtenaient les premiers jumeaux autrichiens (43). À partir de là, il devient impossible de citer tout le monde, les centres de FIV se multiplient de pays en pays, de ville en ville. La fécondation devient un traitement de routine de l'infertilité du couple, les indications s'étendent, les techniques dérivées ou associées se multiplient qui seront déclinées dans d'autres chapitres. Pour qu'il en soit ainsi, il fallut adapter la FIV des débuts. On peut difficilement imaginer un usage large de la FIV en cycle spontané, nécessitant la disponibilité des équipes cliniques et biologiques 24 heures sur 24 pour le recueil du seul ovocyte préovulatoire. La réintroduction de la stimulation ovarienne contrôlée et la qualité du monitoring de la croissance folliculaire ont facilité le développement de la fécondation *in vitro*. Le recueil ovocytaire sous cœlioscopie aurait été également une contrainte limitante, que la mise au point de la ponction échographique transvaginale a levée (44-46). Cependant, disposer de nombreux embryons sans avoir la possibilité de les transférer *in utero* n'était guère satisfaisant. Enfin, l'application à l'humain de la congélation embryonnaire (47-50) a rendu une cohérence à la stratégie de recrutement multifolliculaire en évitant la destruction des embryons surnuméraires et en augmentant l'efficacité globale de la FIV. Difficile de prévoir de quoi demain sera fait. Peut-être retournera-t-on vers une démarche plus naturelle, adaptée aux préoccupations de la société moderne, mais en ayant trouvé les moyens d'en accroître l'efficacité.

## Références

1. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART), de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KJ *et al.* (2009) World Collaborative Report on Assisted Reproductive Technology 2002. *Hum Reprod* 24: 2310-20
2. Schenk SL (1880) Das Säugethierei künstlich befruchtet ausserhalb des Mutterthieres. *Mitt Embr Inst K K Univ Wien* 1: 107-18
3. Brinster RL (1974) Embryo development. *J Anim Sci* 38: 1003-12
4. Pincus G, Enzmann EV (1934) Can mammalian oocytes undergo normal development *in vitro*? *Proc Natl Acad Sci USA* 20: 121-2
5. Menkin MF, Rock J (1948) *In vitro* fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Am J Obstet Gynecol* 55: 440-52
6. Dautzier L, Thibault C, Wintenberger S (1954) La fécondation *in vitro* de l'oeuf de la lapine. *C R Acad Sci, Paris* 238: 844-45
7. Chang MC (1959) Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 184: 466-67
8. Austin CR (1951) Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4: 581-92
9. Bavister BD (2002) Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124: 181-96
10. Clarke GN (2006) ART and history, 1678-1978. *Hum Reprod* 21: 1645-50
11. Yanagimachi R, Chang MC (1963) Fertilisation of hamster eggs *in vitro*. *Nature* 200: 281-82
12. Wakayama T, Yanagimachi R (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 16: 639-41
13. Whittingham DG (1968) Fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Nature* 220: 592-3
14. Whittingham D, Leibo S, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science* 178: 411-14
15. Whittingham DG (1977) Fertilization and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J Reprod Fertil* 49: 89-94
16. Bavister BD, Edwards RG, Steptoe PC (1969) Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* 20:159-60
17. Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G (1991) *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil (suppl)* 44: 375-84
18. Fauser BC, Edwards RG (2005) The early days of IVF. *Hum Reprod* 11: 437-38
19. Edwards RG (1965) Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-51
20. Edwards RG (1965) Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet* 2: 926-29
21. Edwards RG (2002) Tribute to Georgeanna and Howard Jones. *Reprod Biomed Online* 6: 352-60
22. Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HW Jr (1966) Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol* 96: 192-200
23. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969) Early stages of fertilization *in vitro* in human oocytes matured *in vitro*. *Nature* 221: 632-35
24. Bavister BD, Edwards RG, Steptoe PC (1969) Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* 20 159-60
25. Steptoe PC, Edwards RG (1970) Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1: 683-89



26. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1970) Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulatory human oocytes. *Nature* 227: 1307-9
27. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM (1971) Human blastocyst grown in culture *Nature* 229: 132-3.
28. Edwards RG, Sharpe J (1971) Social values and research in human embryology. *Nature* 231: 87-91
29. De Kretser D, Dennis P, Hudson B *et al.* (1973) Transfer of a human zygote. *Lancet* 2: 728-29
30. Steptoe PC, Edwards RG (1976) Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1: 880-82
31. Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366
32. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 737-56
33. Edwards RG (1996) Patrick Steptoe. *Hum Reprod* 11 suppl 215-234
34. Cohen J, Trounson A, Dawson K *et al.* (2005) The early days of IVF outside the UK. *Hum Reprod Update* 11: 439-59
35. Testart J (1986) De l'éprouvette au bébé-spectacle. In: *L'œuf transparent*. Flammarion (Ed) p 39-95
36. Testart J, Frydman R, Feinstein MC *et al.* (1981) Interpretation of plasma LH assay for the collection of mature oocytes from women; definition of an LH surge initiating rise (LH S.I.R). *Fertil Steril* 36: 50-54
37. Menezo Y (1976) Synthetic medium for gamete survival and maturation and for culture of fertilized eggs. *C R Acad Sci Paris* 282: 1967-70.
38. Hafez ESE, Semm K (1982) *In Vitro fertilization and Embryo transfer*. MTP Press limited, Lancaster, England
39. Lopata A, Johnston I, Hoult I, Speirs A (1980) Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by *in vitro* fertilization of a preovulatory oocyte. *Fertil Steril* 33: 117-20
40. Trounson A, Leeton J, Wood J, Webb J, Wood C (1981) Pregnancies in the human by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 212: 681-2
41. Jones HR (2002) IVF: Past and future. *Reprod Biomed Online* 6: 375-81
42. Hamberger L, Wikland M, Nilsson L *et al.* (1982) Methods for aspiration of human oocytes by various techniques. *Acta Med Rom* 20: 370-8
43. Feichtinger W, Szalay S, Kemeter P *et al.* (1982) Twin pregnancy after laparoscopic oocyte recovery, *in-vitro* fertilization and embryo transfer Geburtshilfe Frauenheilkd. 1982 42: 197-9
44. Lenz S, Lauritsen JG (1982) Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anaesthesia: a new method of collecting oocytes for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 38: 673-7
45. Dellenbach P, Nisand I *et al.* (1984) Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle puncture for oocyte retrieval. *Lancet* 1: 1467
46. Wikland M, Hamberger L (1984) Ultrasound as a diagnostic and operative tool for *in vitro* fertilization and embryo replacement (IVF/ER) programs. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1: 213-16.
47. Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305:707-9
48. Zeilmaker G, Alberda A, van Gent I *et al.* (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 42: 293-96
49. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J *et al.* (1986) High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 46: 268-72
50. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M *et al.* (1987) Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 2: 709-15

