

## Étude cytogénétique de l'embryon humain

Le développement de la pratique de la fécondation humaine *in vitro* a permis une étude cytogénétique des embryons les plus précoces. Il apparaît que les aberrations chromosomiques — aneuploïdie, le plus souvent — sont extrêmement fréquentes au niveau des embryons considérés comme « de mauvaise qualité » d'après des critères morphologiques. Il semble probable que certaines techniques utilisées dans la fécondation *in vitro* (hyperstimulation ovarienne, manipulations de l'ovocyte) puissent être à l'origine d'une augmentation, par rapport à la situation *in vivo*, des anomalies chromosomiques empêchant le développement embryonnaire.

---

Franck Pellestor

---

**L**es anomalies chromosomiques constituent la première cause d'échec de la fécondation humaine, ainsi que l'attestent les études cytogénétiques des produits d'avortement spontané [1] et de manière plus directe, les récentes données tirées de l'analyse chromosomique des gamètes humains [2, 3]. En effet, l'essor des techniques de fécondation *in vitro* humaine a eu pour conséquence le développement d'une cytogénétique appliquée aux cellules mises en jeu dans la période de périconceptologie, c'est-à-dire les gamètes, les zygotes et les embryons préimplantatoires. Ce nouveau type d'investigation a ouvert la voie à l'analyse directe de la genèse, de la transmission et de l'étiologie des anomalies chromosomiques. D'importants travaux ont d'ores et déjà été réalisés, d'une part sur les spermatozoïdes humains, par

le biais de la technique de fécondation *in vitro* homme-hamster, d'autre part sur les ovocytes ayant fait l'objet d'un échec de fécondation *in vitro*. Ainsi, une estimation précise de la fréquence des anomalies chromosomiques dans les gamètes des deux sexes a pu être réalisée (10 % chez l'homme, 25 % chez la femme), et diverses notions fondamentales ayant trait à la distribution et à l'origine de ces anomalies, restées jusqu'alors hypothétiques, ont pu être directement vérifiées [4, 5]. Cependant, les résultats de la fécondation *in vitro*, en termes de taux de fécondation, de nidation et de grossesses, ont rapidement mis en évidence que l'incidence des anomalies portées par les embryons produits *in vitro* était largement supérieure à la somme des anomalies répertoriées dans les gamètes. Il a été établi que l'échec le plus fréquent des fécondations *in vitro* se

---

### ADRESSE ET TIRÉS À PART

---

F. Pellestor : chargé de recherche au Cnrs. Centre de recherches de biochimie macromoléculaire (CRBM), Cnrs-UPR 9008, route de Mende, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

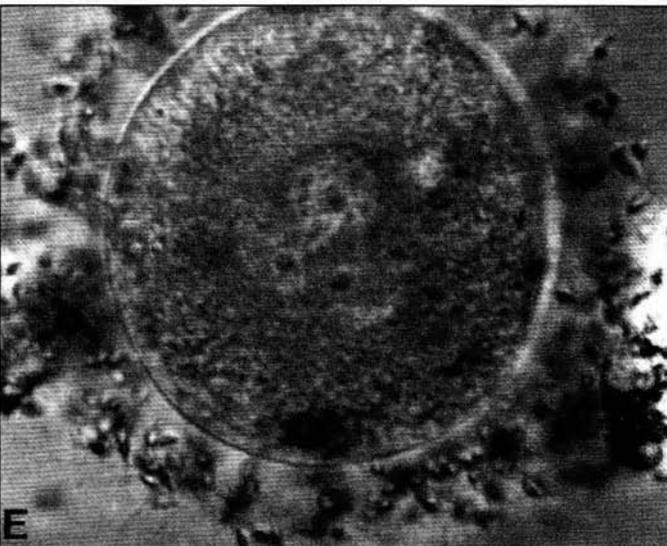
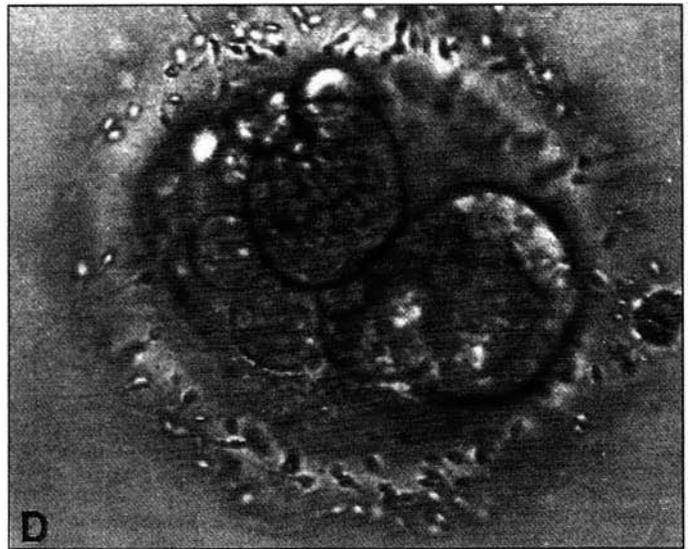
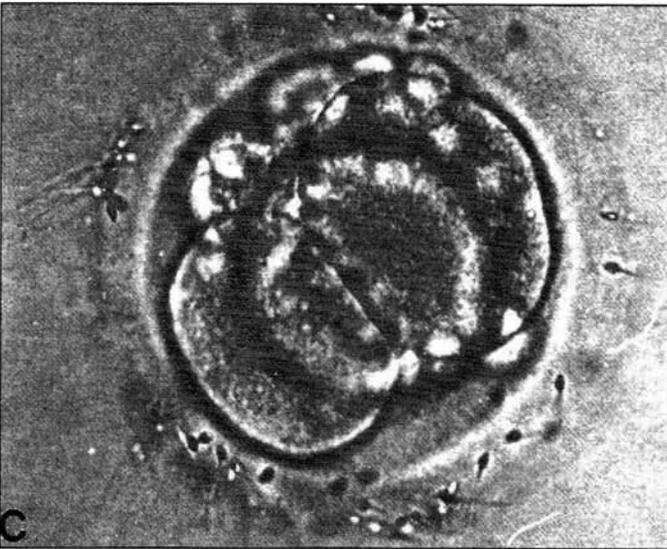
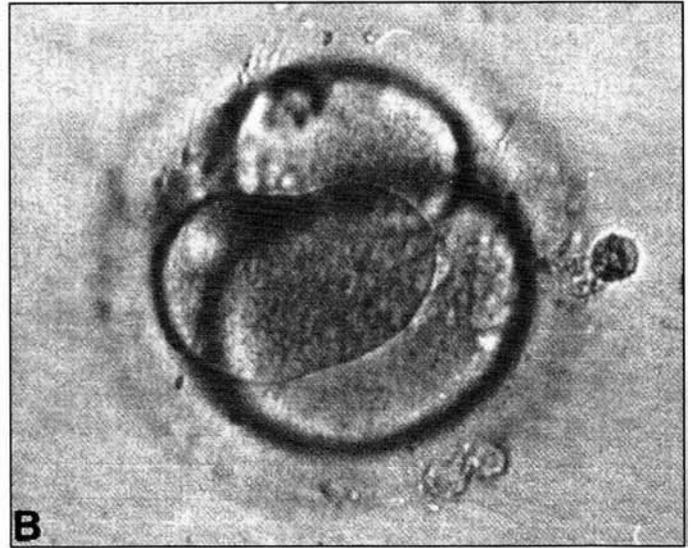
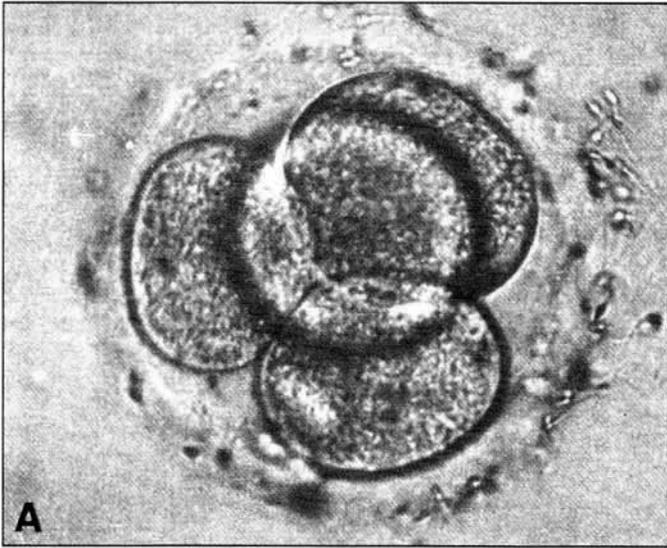


Figure 1. **Classification morphologique des embryons humains issus de fécondation in vitro.** (A) type I : blastomères réguliers et égaux ; (B) type II : blastomères réguliers, quelques fragments dans l'espace périvitellin ; (C) type III : blastomères irréguliers et granuleux, fragments cytoplasmiques ; (D) type IV : nombreux fragments cytoplasmiques, aspect dégénératif ; (E) zygote triploïde, avec trois pronuclei visibles au centre.

## RÉFÉRENCES

1. Andrews T, Dunlop W, Roberts DF. Cytogenetic studies in spontaneous abortions. *Hum Genet* 1984 ; 66 : 77-84.
2. Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 1987 ; 77 : 108-14.
3. Pellestor F. Étude cytogénétique de l'ovocyte humain. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 966-71.
4. Martin RH, Rademaker AW. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet* 1987 ; 41 : 484-92.
5. Pellestor F. Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 1991 ; 86 : 283-8.
6. Bilan FIVNAT 1989. *Contracept Fertil Sex* 1990 ; 18 : 588-600.
7. Puissant F, Rysselberge MV, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987 ; 2 : 705-11.
8. Ma S, Kalousek DK, Zouves C, Yuen BH, Gomel V, Moon YS. The chromosome complements of cleaved human embryos resulting from *in vitro* fertilization. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1990 ; 7 : 16-21.
9. Plachot M, Veiga A, Montagut J, Grouchy de J, Calderon G, Lepêtre S, et al. Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life : a multicentric study. *Hum Reprod* 1988 ; 3 : 627-35.
10. Van Blerkom J, Bell H, Henry G. The occurrence, recognition and developmental fate of pseudo-multipronuclear eggs after *in vitro* fertilization of human oocytes. *Hum Reprod* 1987 ; 2 : 217-25.

situait à l'étape de l'implantation *in utero*, et que seuls 15 à 20 % des embryons transférés donnaient lieu à une grossesse clinique [6]. Dès lors, la constitution d'anomalies chromosomiques, au cours de l'amphimixie\* ou des premières divisions de segmentation, est apparue comme un facteur important d'échecs de reproduction, que seule l'analyse du statut chromosomique des embryons pouvait permettre de quantifier. Par ailleurs, l'intérêt suscité par l'examen cytogénétique des embryons humains a été renforcé par le développement de nouvelles techniques de détection génétique *in situ*, potentiellement applicables aux embryons humains et donc susceptibles de permettre la mise au point de diagnostics ultra-précoces d'affections génétiques.

### La fécondation *in vitro*, étape obligée

L'analyse chromosomique d'un embryon passe nécessairement par sa destruction. Aussi, ce type d'investigation ne peut-il être envisagé, et justifié d'un point de vue éthique, que pour des embryons issus de fécondations *in vitro* et jugés cliniquement inutilisables.

En pratique, 24 heures après la phase de fécondation *in vitro*, les concepts sont examinés au microscope inversé et leur viabilité est appréciée. Sont alors systématiquement écartés les œufs fécondés polyspermiqes présentant plus de deux pronuclei (figure 1, p. 715) ; ensuite s'opère le choix des embryons qui seront transférés *in utero*. Cette étape de sélection est particulièrement délicate car on ne dispose, pour ce faire, que de quelques critères morphologiques, à savoir la forme et la taille des blastomères, l'aspect cytoplasmique, et la présence éventuelle de fragments cytoplasmiques dans l'espace périvitellin [7]. A partir de ces paramètres, les embryons sont classés en quatre catégories, du type I pour les plus beaux au type IV pour ceux d'aspect médiocre (figure 1). Ces derniers ne sont généralement pas transférés *in utero*, ni congelés en vue d'un transfert ultérieur. *A priori*, ce sont donc,

\* Amphimixie = Mélange des lots chromosomiques haploïdes mâle et femelle.

avec les zygotes polyspermiqes, les seules entités embryonnaires disponibles pour une analyse cytogénétique. L'amélioration des protocoles d'hyperstimulation ovarienne, notamment grâce à l'emploi d'agonistes de la GnRH, a entraîné un accroissement significatif du nombre d'ovocytes recueillis par ponction, et en conséquence du nombre d'embryons produits *in vitro* (jusqu'à 30). Dès lors, certaines équipes ont pu bénéficier pour leurs études de dons d'embryons de bonne qualité, de la part de couples ayant choisi de ne pas avoir recours à la congélation systématique de leurs embryons surnuméraires.

Les œufs destinés à l'analyse chromosomique vont, dans un premier temps, être remis en culture pour une durée de 18 heures, dans du milieu nutritif additionné de colcémid (0,2 µg/ml) afin d'obtenir le blocage des blastomères au stade métaphasique. A l'issue de cette culture, les embryons font l'objet, individuellement, d'un choc hypotonique de 3 à 5 minutes dans une solution de citrate de sodium à 1 %. L'embryon est ensuite prélevé à la micropipette, déposé sur une lame et fixé, sous contrôle microscopique, à l'aide de quelques gouttes d'un mélange 1:3 d'acide acétique et de méthanol absolu. Les lames sont aussitôt observées au microscope, et celles présentant des lots chromosomiques sont colorées et analysées. Divers procédés de dénaturation chromosomique (bandes G, R ou Q) peuvent être utilisés afin d'améliorer l'identification des chromosomes et des éventuelles anomalies du caryotype.

### Diversité des anomalies chromosomiques embryonnaires

Plusieurs laboratoires ont publié les résultats d'analyses cytogénétiques d'embryons préimplantatoires, mais, pour la plupart, il s'agit de petites séries n'excédant pas 30 embryons [8]. Seules trois études font état de résultats significatifs portant sur un nombre d'œufs supérieur à 70. Le nombre total d'embryons et de zygotes humains caryotypés est de 654, ce qui est relativement faible en comparaison des larges séries de spermato-

Tableau I			
RÉCAPITULATIF DES ÉTUDES CYTOGÉNÉTIQUES D'EMBRYONS ET DE ZYGOTES HUMAINS ISSUS DE FÉCONDATION <i>IN VITRO</i>			
	Nombre total de caryotypes	Nombre de caryotypes normaux	Anomalies de la constitution chromosomique
Embryons de bonne qualité morphologique	335	219 (65,3 %)	116 (34,4 %)
Embryons de mauvaise qualité morphologique	195	18 (9,3 %)	177 (90,7 %)
Zygotes triploïdes	124	25 (20 %)	99 (80 %)

zoïdes et d'ovocytes humains analysés. Trois types peuvent être distingués parmi les œufs analysés. Les zygotes triploïdes, les embryons de bonne qualité morphologique et les embryons de phénotype médiocre.

A l'issue des protocoles FIV, la proportion de zygotes triprouclés est de 7 %. La plupart des auteurs indiquent que ces œufs ont un développement *in vitro* identique à celui des œufs porteurs de deux *pronuclei*, d'où l'importance de l'étape d'observation microscopique des zygotes, lorsque les *pronuclei* sont encore visibles, afin d'éliminer ces conceptus triploïdes. Leur examen chromosomique montre que ces œufs évoluent de diverses manières [9] : les trois *pronuclei* peuvent participer à la formation d'un fuseau bipolaire aboutissant à la formation de cellules triploïdes ; plus rarement, il peut y avoir formation d'un fuseau tripolaire conduisant, soit à la formation simultanée de trois cellules diploïdes, soit à la création de mosaïques diploïdes/haploïdes ; enfin, une régulation du degré de ploïdie peut intervenir par élimination de l'un des *pronuclei*. Ce processus particulier pourrait expliquer l'observation d'embryons diploïdes normaux issus de zygotes jugés triploïdes. Mais, si l'élimination porte sur le *pronucleus* femelle, il aboutit à la formation d'une mole hydatiforme. Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité d'une confusion entre *pronucleus* et vacuole cytoplasmique, lors de l'examen microscopique des zygotes : Van Blerkom *et al.* [10] ont

montré que 40 % des zygotes présusmés multiprouclés contiennent en fait une ou plusieurs vacuoles cytoplasmiques, baptisées pseudo-*pronuclei*, de taille identique aux *pronuclei* et migrant avec eux dans le cytoplasme de l'œuf.

La comparaison des données chromosomiques relatives aux embryons préimplantatoires fait apparaître une très forte variation du taux d'anomalies chromosomiques en fonction de la qualité morphologique (Tableau I). Alors que dans le groupe des embryons de bonne qualité, ce taux atteint 34 %, il s'avère que 90 % des embryons d'aspect médiocre présentent une anomalie de leur constitution chromosomique. En premier lieu, cette donnée est à rapprocher de l'observation, faite en clinique, de l'existence d'une corrélation entre morphologie embryonnaire et taux de grossesse. En effet, plusieurs équipes ont constaté que le transfert d'embryons de type I améliorerait significativement le taux de grossesse, alors que les embryons de type IV n'aboutissaient que très rarement à une naissance [11, 12]. La classification morphologique des embryons constitue donc une pratique valable qui, lorsqu'elle est appliquée rigoureusement, permet l'élimination ultra-précoce d'une part appréciable des œufs anormaux. La question se pose alors de l'existence d'une corrélation directe entre morphogénèse embryonnaire et constitution chromosomique. Les éléments de réponse fournis par l'analyse cytogénétique des embryons

sont *a priori* contradictoires puisque plusieurs auteurs ont rapporté l'observation d'embryons aneuploïdes ou parthénogénétiques présentant un développement *in vitro* analogue à celui des embryons normaux [9, 13]. En fait, il semble que cette notion doive être modulée, car la « fenêtre d'observation » du développement embryonnaire qu'autorise la pratique FIV humaine est très étroite (environ 50 heures après la fécondation). Or, les expériences de Tada et Takagi [14] ont récemment démontré que des embryons chromosomiquement déséquilibrés, mais morphologiquement normaux durant la phase préimplantatoire, prennent rapidement un aspect anormal après l'implantation. En fait, il semble qu'en fonction des chromosomes impliqués et de leur origine parentale, les répercussions des anomalies chromosomiques sur le développement embryonnaire diffèrent. Ainsi, chez la souris, les monosomies des chromosomes 1, 3, 6, 9, 12, 14, 15, 16, 19 n'interfèrent pas avec le clivage et la formation des blastomères, alors que les déséquilibres portant sur les chromosomes 2, 5, 17 et X sont rapidement létales et provoquent un arrêt du développement entre les stades 4 et 8 cellules [15]. On peut donc supposer que la manifestation morphologique du déséquilibre chromosomique d'un embryon est d'autant plus précoce que l'anomalie qu'il porte est sévère. Si une telle corrélation existe entre morphogénèse et constitution chromosomique, le développement des techniques de coculture embryonnaire, en reculant de plusieurs jours le moment de l'implantation utérine, devrait permettre une détection accrue des embryons ayant une anomalie chromosomique.

La deuxième notion qui découle de l'analyse de ces données cytogénétiques concerne la diversité des anomalies chromosomiques observées chez l'embryon préimplantatoire. Cette diversité peut être perçue comme le juste reflet de la multiplicité des paramètres impliqués dans la formation et le développement d'un œuf humain. Comme l'indique le Tableau II, l'aneuploïdie constitue l'aberration la plus fréquente, indépendamment du phénotype embryonnaire. L'origine

## RÉFÉRENCES

11. Veeck LL, Wortham JWE, Sandow BA, Acosta A, Garcia JE, Jones S, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1983 ; 39 : 594-602.
12. Erenus M, Zouves C, Rajamahendran P, Leung S, Fluker M, Gomel V. The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1991 ; 65 : 707-10.
13. Angell RR, Templeton AA, Aitken RJ. Chromosome studies in human *in vitro* fertilization. *Hum Genet* 1986 ; 72 : 333-9.
14. Tada T, Takagi N. Early development and X-chromosome inactivation in mouse parthenogenetic embryos. *Mol Reprod Dev* 1992 ; 31 : 20-7.
15. Dyban AP. Experimental cytogenetics of preimplantation development. In : Verlinsky Y, Kuliev A, eds. *Preimplantation Genetics*. New York : Plenum Press, 1991 : 15-23.
16. Juberg RC, Mowrey PN. Origin of non-disjunction in trisomy 21 syndrome : all studies compiled, parental age analysis and international comparisons. *Am J Med Genet* 1983 ; 16 : 111-6.
17. Antonarakis SE. The down syndrome collaborative group. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1991 ; 324 : 872-6.
18. Boer de P, Hoeven van der FA. The use of translocation derived « marker-bivalents » for studying the origin of meiotic instability in female mice. *Cytogenet Cell Genet* 1980 ; 26 : 49-58.
19. Hummler E, Theuring F, Hansmann I. Meiotic non-disjunction in oocytes from aged Djungarian hamsters correlates with an alteration in meiosis rate but not in univalent formation. *Hum Genet* 1987 ; 76 : 357-64.

gamétique des anomalies numériques est suggérée par les résultats des études menées sur les spermatozoïdes et ovocytes humains [5]. Ces mêmes études indiquent la prédominance de l'origine maternelle de ces anomalies. Ce constat corrobore les résultats des études cytogénétiques [16] et moléculaires [17] menées sur l'origine parentale des trisomies. En particulier, dans le cas de la trisomie 21, il est désormais établi que 95 % des chromosomes 21 surnuméraires sont d'origine maternelle.

Dans plusieurs cas, les non-disjonctions observées chez l'embryon portent uniquement sur une chromatide\*. La présence de chromatides isolées a été rapportée dans les ovocytes de différentes espèces [18, 19] et relève d'un processus de séparation prématurée des chromatides-sœurs lors de la première division méiotique. Récemment, ce phénomène a été décrit pour les ovocytes humains [20], et son observation aux stades embryonnaires précoces indique que ce mécanisme particulier de non-disjonction peut constituer une source non négligeable d'aneuploïdies dans l'espèce humaine.

La fréquence des anomalies structurales apparaît aussi significative puisque, en moyenne, 4 % des embryons analysés sont porteurs d'anomalies structurales. Toutefois, cette valeur est vraisemblablement sous-estimée, compte tenu du manque de résolution des caryotypes embryonnaires. En fait, la totalité des aberrations structurales répertoriées relève de cassures chromosomiques. La conformation compacte des chromosomes ne per-

met pas une identification directe d'éventuelles anomalies plus fines telles que les translocations ou les inversions chromosomiques.

En définitive, ces différents types d'anomalies, numériques et structurales, constituent l'essentiel des anomalies chromosomiques observées à terme ou dans les produits d'avortements spontanés. Mais, parallèlement à ces anomalies d'origine méiotique, on trouve chez l'embryon préimplantatoire diverses autres anomalies en rapport avec les processus mêmes de fécondation et de division cellulaire. Il s'agit de polyploïdies, d'haploïdies, de mosaïques ou encore de fragmentations des lots chromosomiques (Tableau II). La plupart de ces aberrations provoquent un développement fœtal anormal ou peuvent être létales, et les estimations concernant leurs incidences laissent à penser que leur survenue lors des fécondations *in vivo* constitue un événement relativement rare. Leur incidence relativement élevée parmi les embryons issus de fécondations *in vitro* suggère donc que leur étiologie puisse être liée à certains aspects des protocoles de FIV humaine.

### La FIV peut-elle induire des anomalies chromosomiques

Parmi les anomalies en rapport avec la fécondation *in vitro*, la polyploïdie est la plus fréquente. Alors que le taux de polyploïdie est estimé à 1,8 % *in vivo*, il atteint 11 % en moyenne dans les protocoles FIV [21]. Il a été démontré que la poly-

\* Chromatide : chacun des deux filaments constituant le chromosome et reliés par le centromère.

Tableau II		
FRÉQUENCES DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES EN FONCTION DE LA QUALITÉ MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS ANALYSÉS		
Anomalies	Embryons de bonne qualité (n = 338)	Embryons de mauvaise qualité (n = 179)
Aneuploïdie	7,4 %	34,2 %
Mosaïque	13,0 %	7,8 %
Polyploïdie	9,1 %	10,0 %
Haploïdie	4,1 %	10,6 %
Fragmentation	0 %	21,8 %
Anomalie structurale	0,8 %	6,3 %

ploïdie est directement liée au degré de maturité de l'ovocyte lors de la fécondation. En effet, l'immaturité ovocytaire a pour conséquence une réaction corticale incomplète, favorisant la polyspermie, alors que l'hypermaturation peut provoquer la non-expulsion du deuxième globule polaire. Or, le degré de maturité des ovocytes recueillis est très variable, chaque ponction contenant un lot hétérogène d'ovocytes issus de plusieurs follicules. Les protocoles d'hyperstimulation ovarienne sont en grande partie responsables de l'hétérogénéité de la maturité ovocytaire, et donc de la survenue de polyploïdies. Les follicules recrutés par la stimulation se trouvent à des stades différents de leur évolution et cette stimulation ne permet pas une synchronisation de leur croissance. Divers protocoles d'hyperstimulation peuvent être employés, qui diffèrent par les doses, les associations, les rythmes d'administration des hormones, mais sans qu'aucun permette de résoudre ce problème de maturité ovocytaire. D'autres mécanismes peuvent être à l'origine de la polyploïdie embryonnaire. En particulier, il existe deux processus mitotiques atypiques, l'endomitose et l'endoreduplication, qui conduisent à une multiplication totale ou partielle du nombre de chromosomes. Ces dérèglements sont étroitement liés à un dysfonctionnement du fuseau mitotique. Pickering *et al.* [22] ont montré que les microtubules fusoriaux étaient thermosensibles, et que de très faibles variations de température, de l'ordre de 1 °C, perturbaient la structure du fuseau et pouvaient induire ces types de duplications chromosomiques. Des variations aussi discrètes peuvent aisément se produire en pratique FIV, du fait de la nécessité de manipuler et d'observer les cellules. La conjugaison de ces différents phénomènes peut aisément aboutir à des polyploïdies extrêmes de l'ordre de 5 à 7n, telles que celles observées dans quelques embryons de type IV (figure 2, p. 722).

A l'inverse des embryons polyploïdes, certains œufs sont porteurs de lots chromosomiques haploïdes (figure 3, p. 723). Ces œufs sont issus d'ovocytes ayant fait l'objet d'une activation parthénogénétique *in vitro*. On con-

naît divers facteurs susceptibles d'induire expérimentalement le développement parthénogénétique du gamète femelle. Il s'agit des chocs thermiques, des chocs électriques ou encore de l'éthanol. De tels facteurs ont, *a priori*, peu de chances d'intervenir au cours d'une tentative FIV, mais d'autres paramètres, tels que l'exposition lumineuse des cellules ou la pression d'aspiration lors de la ponction folliculaire, ont été mis directement en cause comme facteurs d'activation parthénogénétique [23]. Par ailleurs, le degré de maturité des ovocytes pourrait constituer un facteur de prédisposition à l'activation spontanée. Le problème est que ces parthénogénètes peuvent avoir *in vitro* un développement normal, et de ce fait, faire partie des œufs transférés *in utero*.

Les perturbations de l'amphimixie ou des premières divisions cellulaires peuvent aussi déboucher sur la formation de mosaïques, dont la manifestation la plus remarquable est représentée par des mosaïques de type « globale », dans lesquelles le déséquilibre porte sur la totalité d'un lot chromosomique haploïde. Ainsi observe-t-on des embryons avec des constitutions chromosomiques  $n/2n$ ,  $2n/3n$  voire même  $n/3n$ . Ces mosaïques engendrent des perturbations du cycle cellulaire, avec en particulier une mauvaise synchronisation des divisions blastomériques, qui constitue un facteur de dégénérescence rapide des embryons.

Enfin, une proportion importante d'embryons de mauvaise qualité présentent des fragmentations de leurs lots chromosomiques. Ces embryons se caractérisent par la présence soit d'une plaque métaphasique complète accompagnée de plusieurs lots chromosomiques réduits (de 5 à 15 chromosomes), soit uniquement d'une série de petits groupes de chromosomes. Les causes de ces altérations sont à rechercher parmi les facteurs qui perturbent l'organisation du cytosquelette, puisque ce système est à la base de l'organisation spatiale des chromosomes et des mouvements intracellulaires impliqués dans la syngamie\* et le clivage cellulaire. *In vitro*, la fécondation tardive semble être un facteur étiologique important. Au niveau ultrastructural, le vieillissement

*in vitro* de l'ovocyte donne lieu à une détérioration du cytosquelette. Du retard dans la phase de fusion des gamètes découle un asynchronisme dans la formation et le développement des *pronuclei* mâles et femelles, aboutissant à une fragmentation des lots chromosomiques lors des clivages [24].

## Vers une cytogénétique moléculaire

L'analyse cytogénétique classique comporte deux limites inhérentes à sa réalisation. D'une part, il y a obligation d'obtenir les métaphases interprétables, et une revue de la littérature indique, pour les embryons préimplantatoires humains, un taux de succès relativement faible (de 5 à 35 %) en termes de métaphases obtenues. D'autre part, ce type d'analyse ne peut être que rétrospectif de par la nécessité de sacrifier la cellule. En ce sens, l'analyse chromosomique des embryons préimplantatoires ne présente donc pas d'intérêt clinique direct.

Désormais, le premier obstacle peut être partiellement contourné par l'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* par sondes froides. On assiste depuis quelques années à un développement considérable de ces techniques, grâce à la diversification des modes de production des sondes ainsi que des protocoles de révélation. Il est possible aujourd'hui de réaliser le marquage simultané de plusieurs chromosomes, chaque sonde étant révélée par un fluorochrome différent [25]. Ces méthodes de marquages multiples sont désormais réalisables sur noyaux interphasiques, et les premières tentatives faites sur des cellules d'embryons préimplantatoires ont été encourageantes [26]. La deuxième limitation que constitue la destruction cellulaire peut être outrepassée par l'utilisation d'un micromanipulateur. Il est techniquement possible de prélever une cellule d'un embryon de 2 ou 3 jours sans nuire au développement ultérieur de cet œuf.

Ainsi, la conjonction de ces deux techniques permet d'envisager l'analyse du patrimoine chromosomi-

\* Syngamie : fusion des gamètes mâle et femelle.

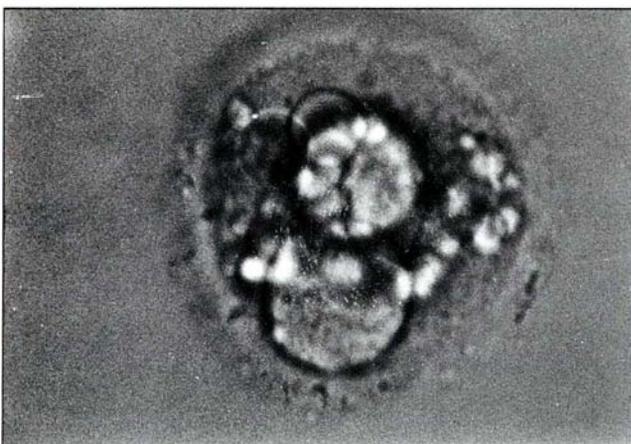
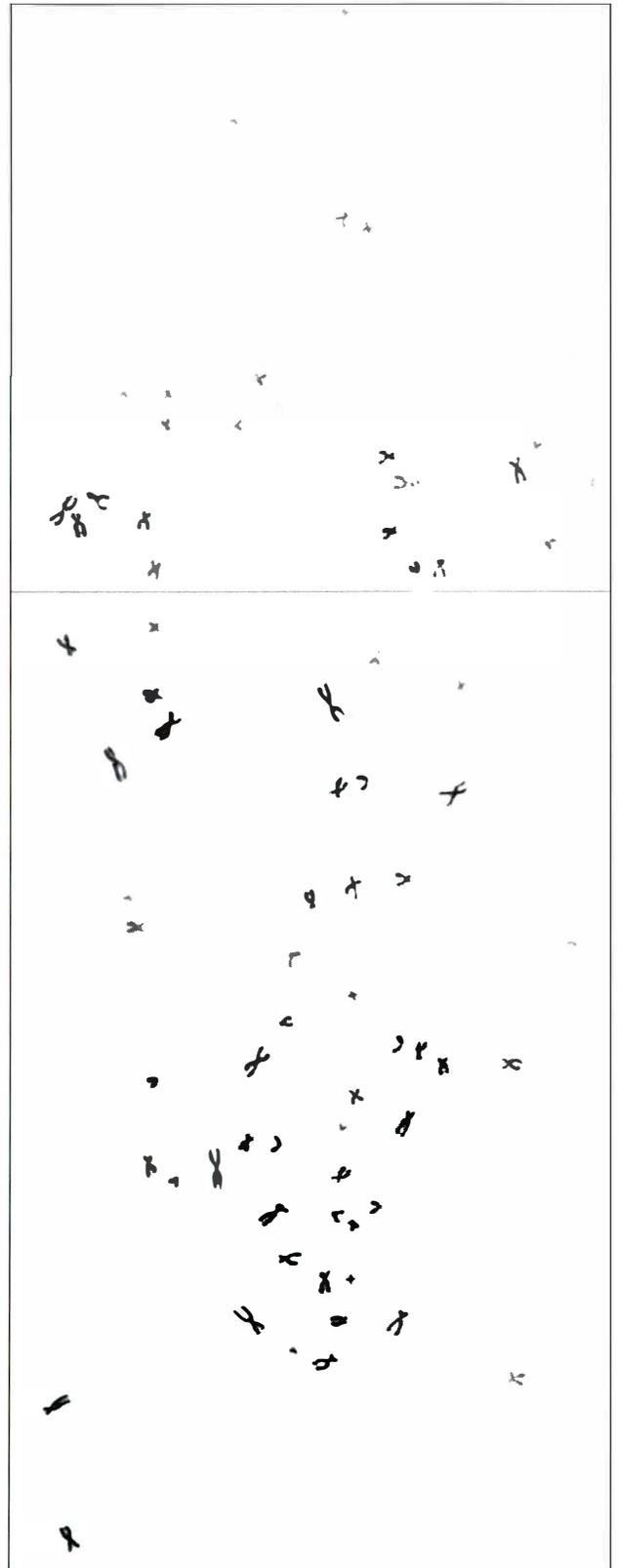
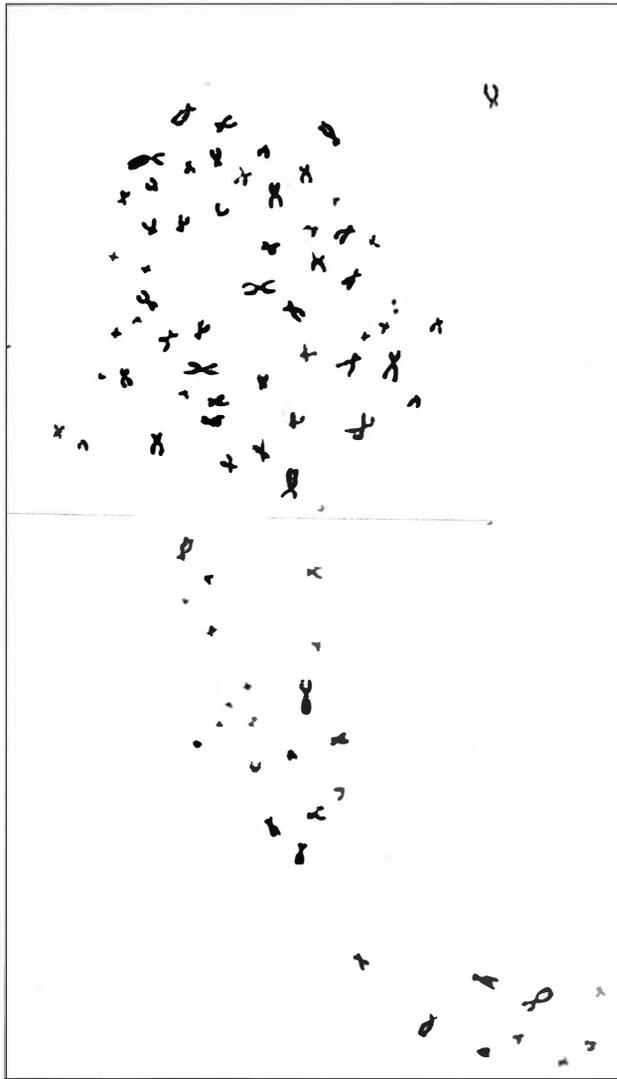


Figure 2. **Lots chromosomiques d'un embryon tétraploïde.** Ces deux métaphases comptent respectivement 89 et 91 chromosomes.

que embryonnaire, sans perte de l'embryon. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une « analyse chromosomique », puisque tous les chromosomes ne sont pas visualisés, mais de l'exclusion de certaines anomalies recherchées. Cela concerne en priorité les principales anomalies chromosomiques susceptibles d'être présentes chez l'embryon (trisomies 21, 18, 16, 13 et syndromes touchant les chromosomes sexuels X et Y), ou encore des remaniements chromosomiques transmissibles, tels que les translocations. Sur le même schéma se sont développés des protocoles de diagnostic

préimplantatoire de maladies géniques, fondés sur l'amplification unicellulaire par PCR, soit d'un marqueur spécifique du sexe (cas de la myopathie [27], soit directement du gène muté [28]).

La réalisation de toutes ces analyses n'excède pas 24 heures. Ces techniques offrent donc la possibilité d'une détection *in vitro* ultraprécoce d'anomalies chromosomiques ou géniques. L'intérêt clinique est considérable pour les couples porteurs d'une affection transmissible. Mais, bien que les perspectives offertes par ces nouveaux modes d'investigation soient extrême-

ment prometteuses, trois points essentiels liés à leur mise en œuvre doivent être soulignés. Premièrement, du point de vue diagnostique, les résultats ainsi obtenus ne permettent pas de préjuger de l'existence d'une mosaïque embryonnaire : les données chromosomiques recueillies mettent clairement en évidence l'existence d'une proportion élevée de mosaïques, en particulier dans le groupe des embryons phénotypiquement normaux (Tableau II) et l'extrapolation à l'embryon des résultats obtenus sur une seule cellule n'est pas exempte de risques. Deuxièmement, la possibilité

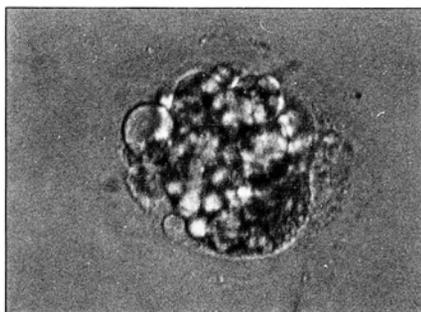
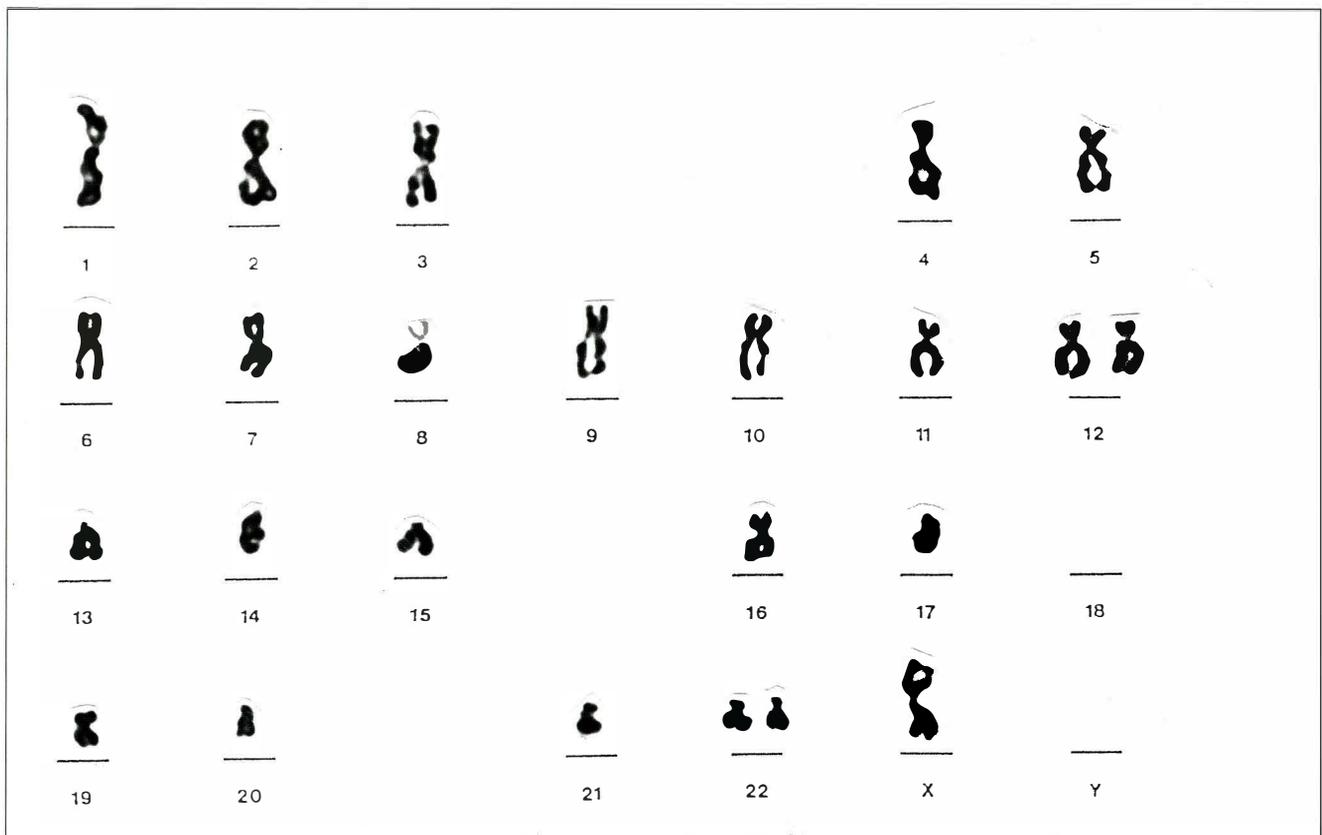


Figure 3. **Caryotype en bande R d'un embryon haploïde, présentant une triple aneuploïdie : 24, X, - 18, + 12, + 22.**

d'erreurs techniques ne doit pas être exclue dans l'application de ces protocoles très délicats. Des phénomènes d'hybridations parasites ou de contaminations de PCR sont d'autant plus difficiles à déceler que l'analyse porte uniquement sur une cellule. Enfin, d'un point de vue éthique, la finalité clinique de ces protocoles étant la sélection *in vitro* d'embryons sains, leur application doit être rigoureusement codifiée et contrôlée de manière à éviter toute dérive vers une sélection embryonnaire ne relevant pas d'une pathologie chromosomique ou génique justifiant réellement un diagnostic préimplantatoire.

## RÉFÉRENCES

20. Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 1991; 86: 383-7.
21. Michelmann HW, Bonhoff A, Mettler L. Chromosome analysis in polyploid human embryos. *Hum Reprod* 1986; 1: 243-6.
22. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houliston E. Cytoskeletal organization in fresh, aged, and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 978-89.
23. Muechler EK, Graham MC, Huang KE, Partridge A, Jones K. Parthenogenesis of human oocytes as a function of vacuum pressure. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1989; 6: 335-7.
24. Ron-El R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril* 1991; 55: 338-44.
25. Nederlof PM, Flier van der S, Wiggant J, Raap AK, Tank HJ, Ploem JS, et al. Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 1990; 11: 126-31.
26. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston R, Delhanty J. Dual fluorescent *in situ* hybridization for simultaneous detection of X and Y chromosome specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992; 89: 18-22.
27. Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston RM. Using pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
28. Handyside A, Lesko JG, Tarin JJ, Winston R, Hughes MR. Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 905-9.

## Conclusion

L'analyse chromosomique des embryons issus de fécondations *in vitro* humaines a permis de mettre en lumière l'incidence et l'extrême diversité des anomalies pouvant être engendrées lors de la formation d'un œuf humain. La majeure partie de ces aberrations n'est que peu ou pas représentée à terme ou dans les produits d'avortements spontanés, ce qui étaye la notion de précocité des arrêts de développement dus à des anomalies chromosomiques. Divers mécanismes interagissent dans la formation ultraprécocce des anomalies de la constitution chromosomique des embryons produits par fécondation *in vitro*. La part exacte de responsabilité des protocoles de FIV reste difficile à déterminer. Il est certain toutefois que ces techniques, et les aléas qu'elles comportent, contribuent de manière plus ou moins directe à accroître l'incidence des anomalies dont l'accumulation pourrait expliquer les taux de succès relativement faibles enregistrés dans les tentatives de fécondation *in vitro* humaine ■

## Summary

### Cytogenetics of human embryo

Chromosomal abnormalities constitute a major cause of the high early wastage of human conceptuses. The development of IVF techniques has provided a unique opportunity to study chromosomes at the earliest embryonic stages. In IVF procedures, embryos were classified in four grades according to morphological criteria. The frequency of chromosomal aberrations in poor quality embryos was higher than that in good quality embryos. This demonstrated both the relationship between chromosomal imbalance and embryonic morphology, and the prognostic value of the embryo grading system as a means for eliminating abnormal embryos. Aneuploidy was the most frequently observed abnormality. In addition, various types of rare chromosomal aberrations such as polyploidy, haploidy, mosaic or fragmentation, were also found. Data suggested that some aspects of the IVF procedure might be responsible for the occurrence of these abnormalities. With the recent advances in molecular genetic methods, new techniques are developed to perform preimplantation diagnosis of single gene defects. *In situ* hybridization and the polymerase chain reaction (PCR) techniques have been successfully applied to the nuclei of single human blastomeres, thus providing a basis for clinical applications.

## ERRATA

### m/s n° 4, vol. 9, avril 1993, p. 477

A la suite d'un incident technique, la référence n° 4 de la nouvelle: « Des YAC dans des souris transgéniques » (A.K.) n'apparaissait pas dans la liste; nous la publions donc ci-dessous.

4. Capecchi Mr. YACs to the rescue. *Nature* 1993; 362: 205-6.

### m/s n° 5, vol. 9, mai 1993, p. 661

Dans l'article de Jacques Thibodeau, Gilbert Croteau, Nathalie Labrecque et Rafick-Pierre Sékaly: « Les superantigènes bactériens: agents pathogènes ou outils thérapeutiques. » *médecine/science* 1993; 5: 605-613, la première phrase (suivant le titre) de la légende de la figure 4 devrait se lire comme suit: « Les sites proposés de contact avec le R<sub>c</sub>T sont indiqués en bleu alors que les acides aminés impliqués dans la fixation des molécules de classe II sont situés dans les portions rouges. »

Ce changement corrige l'inversion des couleurs de la légende originale.