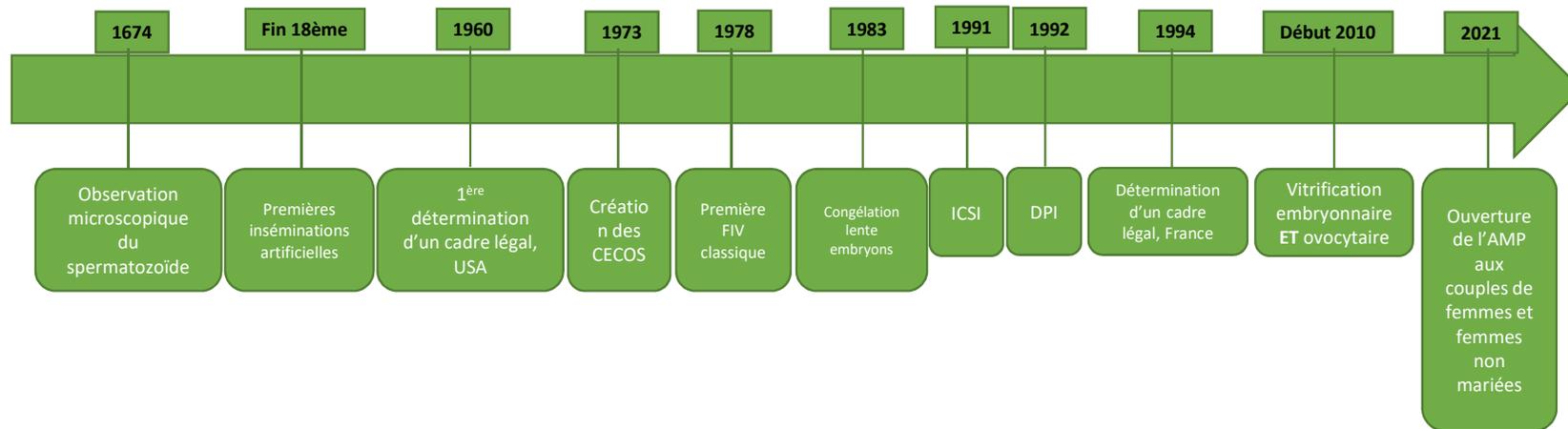


ASPECTS BIOLOGIQUES DE LA PRISE EN CHARGE EN AMP

Dr Elodie Lefranc – CHU AMIENS

HISTORIQUE



→ Le laboratoire est divisé en **4 secteurs principaux** :

- **Spermiologie Diagnostique** : examens du bilan d'infertilité masculine
- **Spermiologie Thérapeutique** : préparation des spermés pour IUI ou FIV
- **FIV** : fécondation, culture embryonnaire, transfert, congélation/décongélation embryonnaire
- **CECOS** : préservation de fertilité, gestion des dons

→ Permet l'exploration des paramètres spermatiques chez l'homme



Différents examens possibles



En première intention

Spermogramme
Spermocytogramme
Test de Migration Survie (TMS)
Spermoculture (germes standards/mycoplasmes)
PCR urinaire
ChlamydiaT/Gonocoque

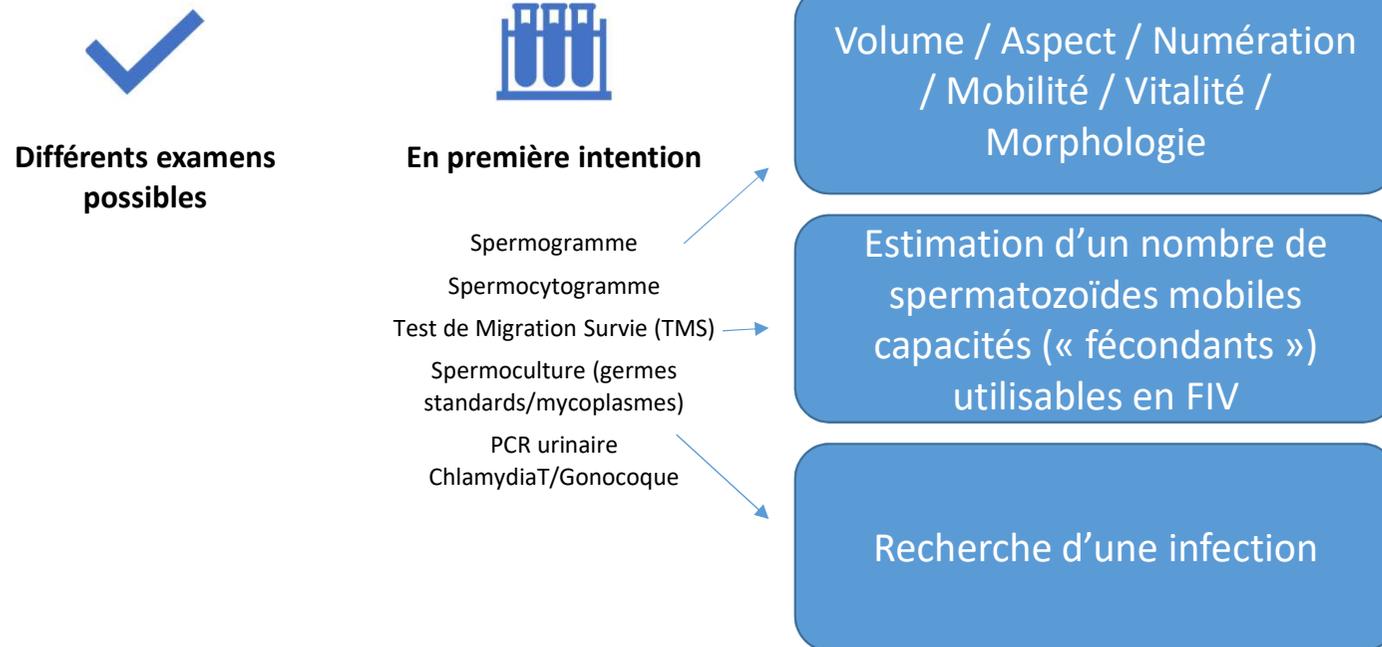


En 2nd intention

Recherche d'ACAS
Fragmentation et dénaturation de l'ADN spermatique

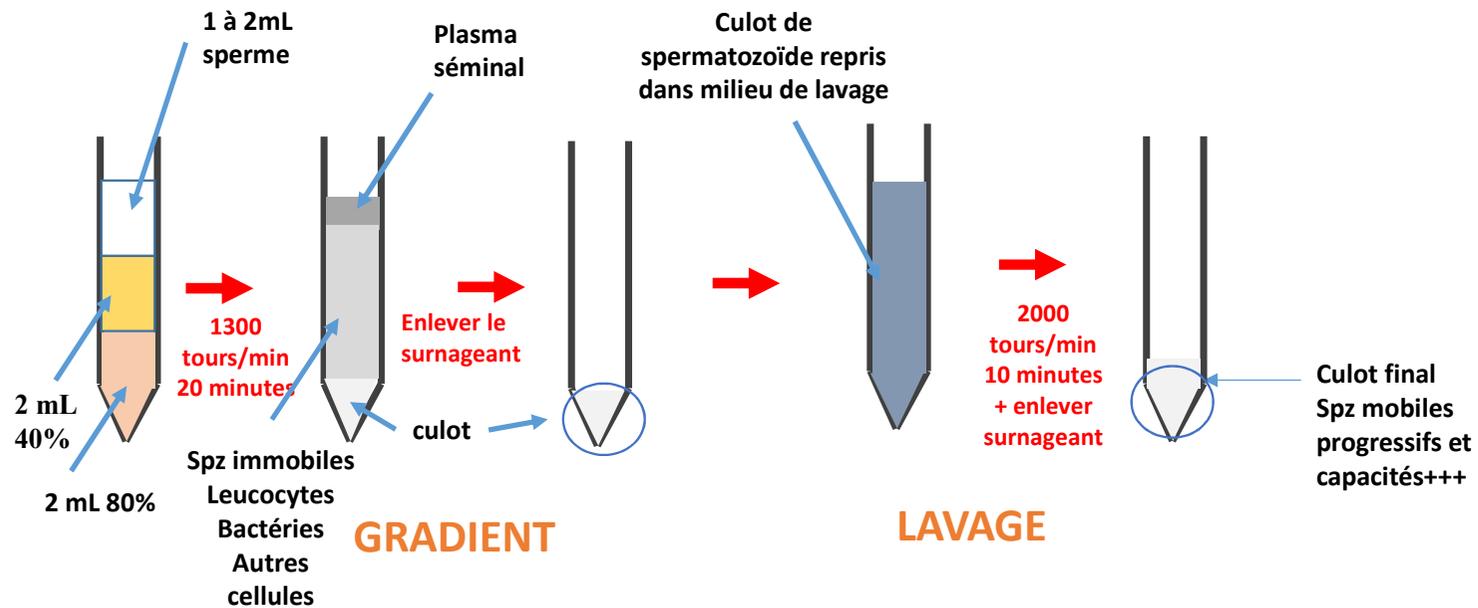
SPERMIOLOGIE DIAGNOSTIQUE

→ Permet l'exploration des paramètres spermatiques chez l'homme

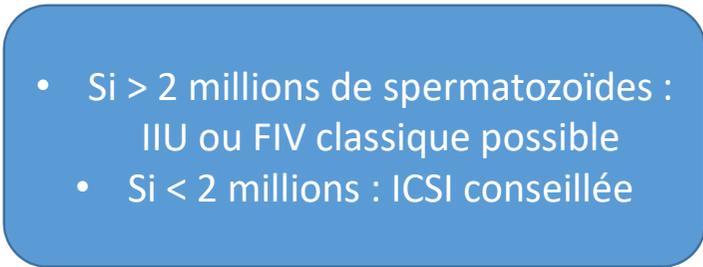


SPERMIOLOGIE THERAPEUTIQUE

- La spermologie thérapeutique permet le traitement du sperme avant son utilisation pour une technique de FIV
- Cette préparation repose sur un **test de migration survie**
- C'est le culot de spermatozoïdes mobiles capacités obtenu après TMS qui sera utilisé pour mettre en fécondation les ovocytes en FIV
- Ces préparations peuvent concerner :
 - Le sperme du conjoint (sperme frais OU congelé)
 - Du sperme de donneur (paillettes de sperme congelé)



- La spermologie thérapeutique permet le traitement du sperme avant son utilisation pour une technique de FIV
- Cette préparation repose sur un **test de migration survie**
- C'est le culot de spermatozoïdes mobiles capacités obtenu après TMS qui sera utilisé pour mettre en fécondation les ovocytes en FIV
- Ces préparations peuvent concerner :
 - Le sperme du conjoint (sperme frais OU congelé)
 - Du sperme de donneur (paillettes de sperme congelé)

- 
- Si > 2 millions de spermatozoïdes :
IIU ou FIV classique possible
 - Si < 2 millions : ICSI conseillée

- **3 techniques principales :**
 - Insémination Intra Utérine (IIU)
 - FIV classique
 - FIV avec micro-injection (ICSI)

- **Origine des gamètes : intracouple ou donneur/donneuse**
 - Sperme frais
 - Sperme congelé (paillettes d'ACP ou d'AMP, risque viral)
 - Spermatozoïdes de ponction épидидymaire
 - Spermatozoïdes de biopsie testiculaire
 - Ovocytes frais ponctionnés
 - Ovocytes congelés

• IIU intra-couple:

- Incompatibilité sperme-glaire
- Infertilité idiopathique en 1ere intention
- Troubles de l'éjaculation

Taux de grossesse = 12,2%

Taux de Naissance vivante = 10,4%

IIU avec tiers donneur:

- Azoospermie
- Couple de femmes/femmes non mariées
- Risque de transmission d'une maladie grave inaccessible au DPN et au DPI

Taux de grossesse = 20,8%

Taux de Naissance vivante = 18,1%

→ Recueil de sperme au laboratoire, préparation par TMS, puis insémination d'un minimum de 2 millions de spz mobiles progressifs dans l'utérus via KT de transfert

• FIV classique

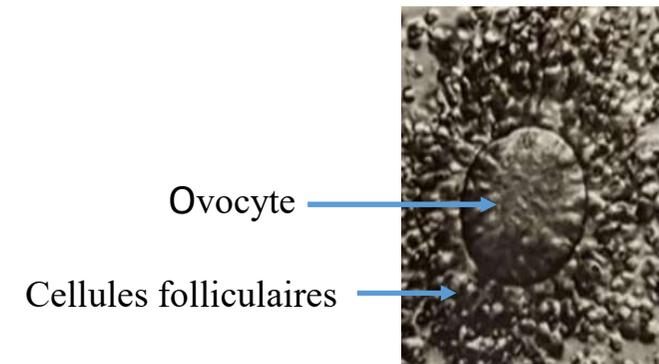
- Stérilité tubaire (obstruction, absence, non fonctionnelle)
- Diminution de la réserve ovarienne, endométriose stade III/ IV
- Troubles de l'ovulation en seconde intention (SOPK)
- Echecs des IIU
- Femme > 38 ans => envisager la FIV
- Les indications de FIV classiques sont principalement FEMININES +++ le sperme doit être normal

ICSI

- Altération spermatique
- Échecs de fécondation en FIV classique
- Sperme de biopsie testiculaire et ponction épидидymaire
- Les indications d'ICSI sont principalement MASCULINES +++

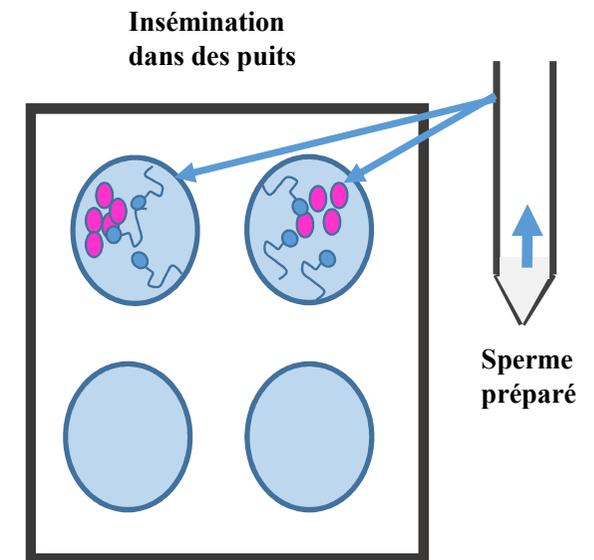
Recueil ovocytaire et tri au laboratoire (J0)

- Ponction ovocytaire au bloc opératoire sous AG 36H après déclenchement de l'ovulation
- Recueil des ovocytes + liquide folliculaire dans des seringues
- Transport rapide des ovocytes au laboratoire dans une valise thermostatée à + 37°C
- Tri des ovocytes au laboratoire sous loupe binoculaire et sur platine chauffante à + 37°C
- Les ovocytes sont ensuite placés dans une étuve sous CO₂ dans un milieu de culture



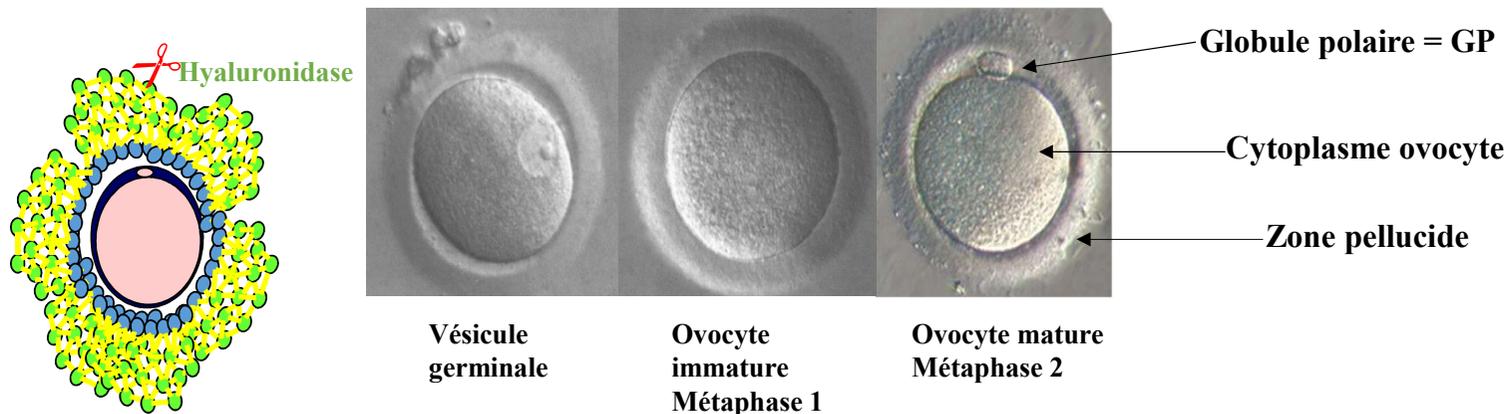
Mise en fécondation (FIV classique) J0

- 2h à 4h après la ponction
- Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) sont placés dans des puits de milieu de culture recouverts d'huile de paraffine
- Insémination de **50 000 à 150 000** spermatozoides mobiles progressifs par puits
- Les CCO et les spermatozoides sont ensuite placés dans un incubateur à +37°C sous CO₂
- Décoronisation mécanique le lendemain matin par refoulement et aspiration



Mise en fécondation (ICSI) J0

- Les complexes cumulo-ovocytaires sont préalablement décoronés par refoulement-aspiration dans un temps court par une **enzyme: la hyaluronidase**, afin de couper les liens d'acide hyaluronique entre les cellules de la granulosa
- Puis décoronisation mécanique avec une pipette par aspiration et refoulement
- Les ovocytes sont ensuite observés au MO pour apprécier leur stade de maturation: Ovocyte mature = ovocyte qui a expulsé son 1^{er} GP (=métaphase 2)



Mise en fécondation (ICSI) J0



- Les spermatozoïdes sont préalablement déposés dans un milieu visqueux contenant de la polyvinylpyrrolidone (PVP) pour les ralentir
- Puis ils sont immobilisés par la micropipette d'injection



- Sur microscope inversé équipé d'une platine chauffante à +37°C
- Grossissement x 400
- Les ovocytes sont placés 1 par 1 dans des microgouttes recouvertes d'huile
- 2 micropipettes sont utilisées: 1 de contention qui maintient l'ovocyte / 1 d'injection qui aspire et injecte un spermatozoïde

Mise en fécondation (ICSI) J0

Micro-injection: on injecte directement 1 seul spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire

Taux de fécondation attendu : 70%



Observation du développement embryonnaire

- Après la fécondation, les embryons sont replacés dans des microgouttes de milieu de culture sous huile et replacés dans un incubateur à CO₂
- Tous les matins, techniciens et biologistes observent ensuite le bon développement embryonnaire au microscope
- Les meilleurs embryons seront choisis pour être replacés dans l'utérus de la patiente ou congelés





J1: Stade Zygote

Observation de la fécondation

- 2 Pro-noyaux au centre
- 2 Globules Polaires



J2 et J3: Stade clivé

- Nombre de blastomères
- Typicité du clivage
- Pourcentage de fragments
- Blastomères multi nucléés



J4: Morula / Compaction

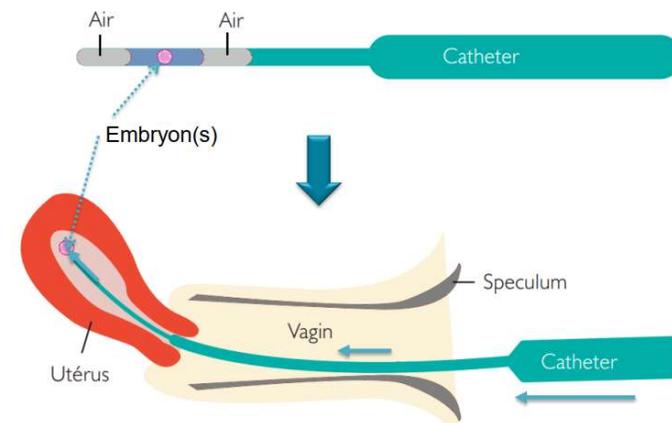


J5: Blastocyste

- Degré d'expansion de l'embryon
- Masse cellulaire interne avec bouton embryonnaire
- Trophectoderme

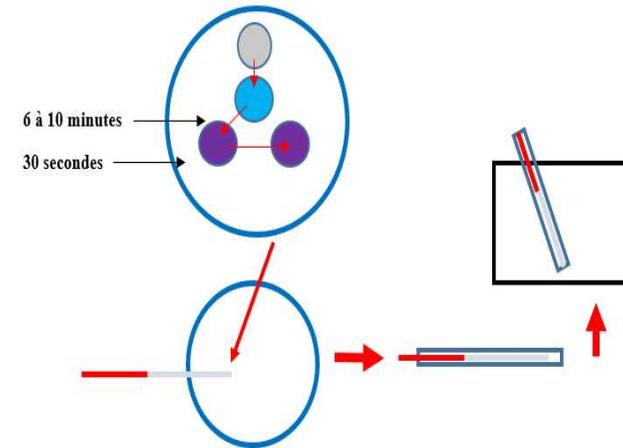
Transfert embryonnaire

- Possible à J2 / J3 ou J5 (++)
- Après observation et choix des embryons à transférer
- L'embryon est monté au laboratoire dans un cathéter puis transmis au gynécologue
- Réalisation sous contrôle échographique
- L'embryon est déposé dans l'utérus après passage du col cervical



Congélation embryonnaire

- En cas d'embryons surnuméraires ou de transfert différé
- Embryons congelables à tous les stades
- Par technique de **vitrification** :
 - Cryoprotecteurs à haute concentration
 - Descente en température extrêmement rapide: déshydratation sans formation de cristaux de glace
 - Dans une paillette à système fermé ou ouvert
- Taux de survie à la décongélation: 90 – 95%
- Stockage et conservation dans une cuve d'azote à – 196°C



- Les principaux centres de PMA du secteur public sont également CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme)
- **Activité de DON de gamètes :**
 - Donneuse d'ovocyte
 - Donneur de sperme
 - Donneurs d'embryon
- **Activité de préservation de la fertilité** pour les patients et patientes adultes ET enfants à risque d'altération de leur fertilité suite à divers traitements (chimiothérapies, radiothérapies, chirurgies pelviennes ...) ou pathologies (syndrome de Klinefelter, Insuffisance Ovarienne prématurée ...) :
 - Cryopréservation des ovocytes
 - Cryopréservation des spermatozoïdes
 - Cryopréservation des cortex ovariens
 - Cryopréservation des parenchymes testiculaires
- **Activité de préservation sociétale** pour les femmes entre 29 et 37 ans, pour les hommes entre 29 et 45 ans

- **Chez la femme :**

- Vitriification ovocytaire après stimulation ovarienne
- Cryopréservation de cortex ovarien après coelioscopie au bloc opératoire (chez la femme adulte et la fille impubère)

- **Chez l'homme :**

- Congélation de sperme : réalisation au laboratoire de paillettes de sperme
- Cryopréservation du parenchyme testiculaire chez le garçon impubère

- « **Gold standard** » si patient pubère
 - Sur éjaculat après masturbation +++
 - Sur éjaculation rétrograde
 - Sur éjaculat après stimulation vibratoire pénienne
 - Après aspiration de liquide épидидymaire
 - Après extraction sur biopsie testiculaire
- **A proposer avant toute radio/chimio +++** (risque cytotoxique, mutagène, clastogène)
- Nécessité d'un nombre suffisant d'échantillons congelés : prévoir en général la possibilité de **placer au moins 2 voire 3 rendez-vous au CECOS**

- **Congélation lente** de spermatozoïdes sur sperme entier ou après gradient
- Après analyse des paramètres spermatiques
- Ajout d'un **cryo-protecteur** au prélèvement
- **Montage de « paillettes »** contenant les spermatozoïdes (photo)
- Congélation via différents automates
- **Stockage dans l'azote liquide à -196 degrés** dans des cuves (photo)
- **Test de décongélation** effectué pour s'assurer d'une utilisation ultérieure possible

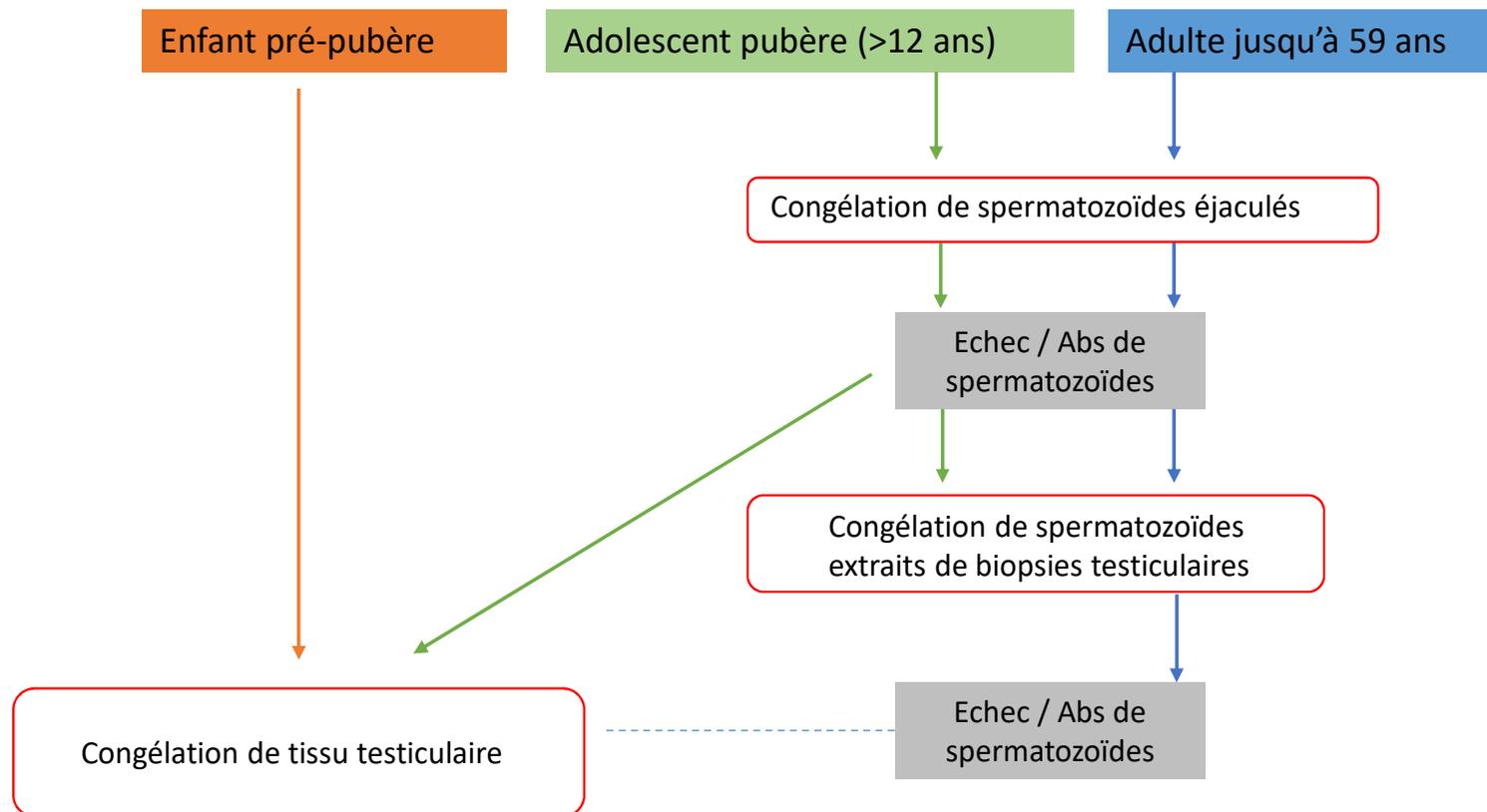
- **Indiquée si échecs de recueils / troubles de l'éjaculation / oligospermie sévère / azoospermie sur recueil frais**
- En concertation avec l'urologue et l'oncologue (blocs programmés souvent en urgence ++)
- Biopsies de parenchyme testiculaire **au bloc opératoire** (uni ou bilat) +/- aspiration de liquide épидидymaire
- Prélèvements conservés dans un milieu de transport de gamètes puis envoyés au laboratoire rapidement

Au laboratoire :

- Dilacération au scalpel ou broyage des prélèvements pour extraire les spermatozoïdes des tubes séminifères
- Centrifugation pour récupération des spermatozoïdes mobiles dans un culot et élimination du surnageant
- Congélation des spermatozoïdes récupérés dans des paillettes, puis stockage dans l'azote liquide
- **Utilisation en ICSI ++**

- Congélation de parenchyme testiculaire pour **préservation des CSS** dans leur environnement : **seule technique possible chez les pré-pubères**
- Biopsies de parenchyme testiculaire uni ou bilatérales voire prélèvement d'un testicule entier au bloc
- Fragments placés dans des cryotubes dans un milieu de conservation composé de **cryoprotecteurs** (DMSO/sucrose) et de **sérum du patient décomplémenté**
 - (faire prélever un tube sec de sang de patient au préalable ++)
- Puis **congélation lente contrôlée avec seeding** du tissu via un automate
- Stockage dans des cuves d'azote à -196°C
- **Mais réutilisation chez l'homme encore du domaine de la recherche : information +++ des parents**

SECTEUR CECOS : arbre décisionnel



MERCI POUR VOTRE ATTENTION

