

TABLE DES MATIERES

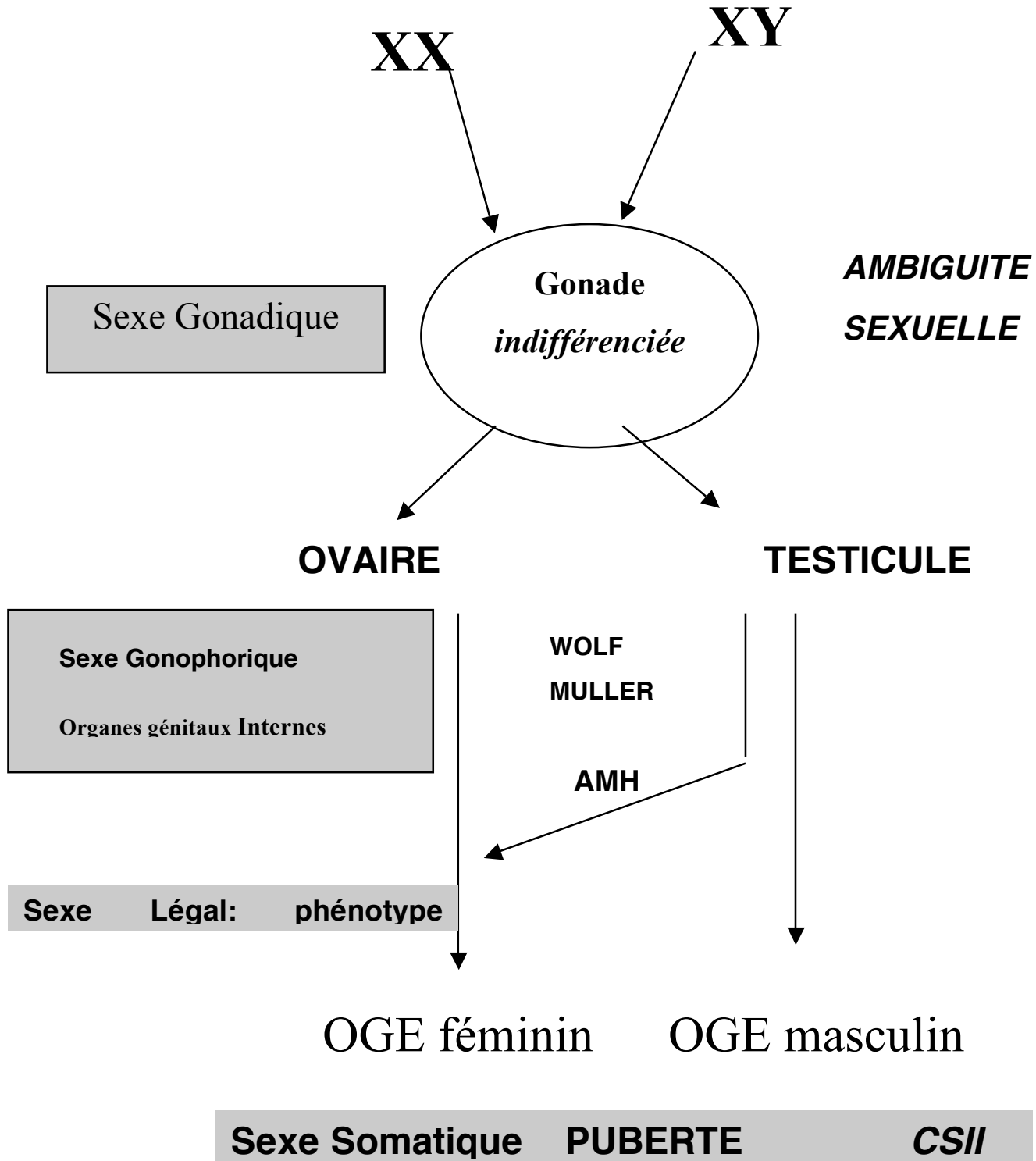
LA DIFFERENCIATION SEXUELLE	4
1. Mise en place de l'organogénèse.....	5
2. Déterminisme du sexe gonadique.....	6
3. Déterminisme gonadique.....	7
AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE GONADOTROPE	8
1. Introduction, définitions presentation des hormones.....	8
2. Hypophyse gonadotrope : les gonadotrophines LH et FSH.....	10
3. L'hypothalamus gonadotrope : GnRH.....	16
4. Rétrocontrôle.....	18
5. Régulation différentielle de LH et FSH.....	22
LES HORMONES STEROÏDES	23
1. Les Hormones stéroïdes : production et effets biologiques.....	23
2. Transport plasmatique des hormones stéroïdes.....	24
3. Mécanismes d'action des Stéroïdes : Effets génomiques.....	25
4. Mécanismes d'action des Stéroïdes : effets non-génomiques.....	28
INHIBINE ET HORMONE ANTI MULLERIENNE	30
1. Inhibines.....	30
2. Hormone anti-müllérienne ou AMH.....	31
Facteurs de régulation de la spermatogénèse.....	34
1. Introduction.....	34
2. Caractéristiques cytologiques de la spermatogénèse.....	35
3. Caractéristiques moléculaires de la spermatogénèse.....	37
4. Contrôle endocrine de la spermatogénèse.....	39
5. Régulation des échanges entre intérieur et extérieur du tubule séminifère : la barrière hémato testiculaire.....	42
6. Régulation paracrine et autocrine de la spermatogénèse.....	44
7. Contrôle non endocrine non paracrine de la spermatogénèse.....	48
BILAN D'UNE INFERTILITE MASCULINE	51
1. Introduction.....	51
2. Analyse de l'histoire individuelle.....	51
3. Examen clinique.....	56
4. Conclusions.....	61
5. Examens paracliniques.....	61
VARICOCELE	64
1. introduction.....	64
2. Etiopathogénie.....	64
3. Comment diagnostiquer la varicocèle ?.....	65
4. Quelles sont les indications thérapeutiques ?.....	66
5. Les différents traitements.....	67
6. Résultats du traitement.....	68
7. Surveillance après traitement.....	70
8. Conclusion.....	70
ASPECTS GENETIQUES DE L'INFERTILITE MASCULINE	77
1. Introduction.....	77
2. Cause pré-testiculaire.....	78

3. Les causes testiculaires.....	80
4. Causes post-testiculaires.....	86
5. Syndromes particuliers du spermatozoïde.....	88
6. Conclusion.....	88
MUCUS CERVICAL ET EXPLORATIONS	91
1. Le mucus cervical.....	91
2. Exploration et pathologie du mucus cervical.....	98
3. Conclusion.....	103
BILAN FEMININ D'INFERTILITE	104
1. Interrogatoire.....	105
2. Examen clinique.....	106
3. Examens complémentaires du bilan de base.....	106
4. Conduite d'un bilan d'infertilité en pratique.....	110
INSEMINATION INTRA-UTERINE	111
1. Bases Physiologiques de l'IIU.....	111
2. Technique de l'IU.....	111
3. Préparation du sperme.....	112
4. Cycle spontané ou cycle stimulé ?.....	112
5. Quel inducteur utiliser ?.....	112
6. Nombre d'IU par cycle et nombre de cycles d'IU.....	113
7. Indications de l'IIU.....	113
8. Facteurs pronostiques.....	113
9. Conclusion.....	115
10. Bibliographie.....	115
FECONDATION IN VITRO-FECONDATION ASSISTEE	119
1. Stimulation ovarienne.....	119
2. Ponction folliculaire.....	124
3. Fécondation In Vitro.....	125
4. Fécondations assistées.....	126
5. Evaluation de la fécondation et surveillance du développement embryonnaire.....	128
6. Transfert d'embryons.....	129
7. Résultats.....	130
8. Indications.....	132
9. Culture jusqu'au stade blastocyste.....	133
10. Ecllosion assistée (assisted hatching).....	134
11. Retrait des fragments cytoplasmiques.....	134
12. Transfert de cytoplasme.....	134
13. Aspects légaux.....	135
CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS	136
1. Principe.....	136
2. Les techniques.....	136
3. Choix des embryons à conserver.....	138
4. Transfert des embryons.....	138
5. Résultats.....	139
6. Devenir des embryons congelés.....	139
DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE (DPI)	140
1. Principe.....	140
2. Réalisation.....	140
3. Indications.....	141

4. Réglementation.....	141
5. Aspects éthiques.....	141
DEVENIR DES GROSSESSES APRES AMP	142
1. Devenir des grossesses en fonction du type d'inducteur.....	142
2. Devenir des grossesses en fonction de la technique d'AMP.....	143
3. Evolution des grossesses obtenues par AMP indépendamment de l'inducteur et de la technique.....	147
4. Conclusion.....	149
5. Références.....	149
LEGISLATION DE L'AMP	150
1. LOI NO 94-654 DU 29 JUILLET 1994 RELATIVE AU DON ET A L'UTILISATION DES ELEMENTS ET PRODUITS DU CORPS HUMAIN, A L'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION ET AU DIAGNOSTIC PRENATAL (1)	150
2. Arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation.....	157
VASECTOMIE	171
1. Introduction.....	171
2. Techniques.....	171
3. Stérilisation contraceptive chez les majeurs capables : évolution de la loi.....	173
4. Conclusion.....	174

DIFFERENCIATION SEXUELLE MASCULINE

Docteur Catherine PIENKOWSKI
Endocrinologie et Génétique Médicale, Hôpital des Enfants, Toulouse



La différenciation sexuelle débute très précocément après la fertilisation de l'œuf ou Zygote qui inclue 23 chromosomes maternels et 23 chromosomes paternels.

L'œuf contient tout le capital génétique nécessaire à l'élaboration d'un individu mâle ou femelle

Au cours de la méiose, il existe la fusion de 3,5 milliards de paires de bases d'ADN organisées en moins de 100.000 gènes. Chaque gène transcrit des protéines qui servent à élaborer les tissus puis les organes.

1. MISE EN PLACE DE L'ORGANOGENESE

1.1. Déterminisme Sexuel, 2 phases: *Phase Génétique*

Différenciation de la gonade primitive

Phase Précoce dès la 6ème semaine

PHASE ACTIVE aboutissant à la différenciation de la gonade primitive en testicule ou en ovaire

Sous le contrôle de facteurs génétiques +++ (Facteurs de Transcription)

1.1.2 Phase Hormonale Active dans sexe mâle: Différenciation des OGI et OGE

Rôle majeur des sécrétions gonadiques: testostérone, Hormone Anti-Mullérienne (AMH ou MIS)

Inactive chez Fille: Double absence hormonale, maintien des ovaires dans abdomen.

1.2. Organogénèse *Formation de la gonade Primitive:*

Formée à partir d'un épaissement coelomique

Colonisation par les cellules germinales qui migrent à partir du sac vitellin.

1.2.2 *Différenciation Testiculaire Précoce*

- 7ème semaine: Sous l'impact de certains facteurs génétiques:

Formation des cordons séminifères à partir des cellules de Sertoli qui entourent les cellules germinales

- 9ème semaine:

Apparition dans le milieu interstitiel des cellules de Leydig

Différenciation et maturation de ces cellules sous le contrôle de LH

Sécrétion de Testostérone

2. DETERMINISME GONADIQUE

2.1. SRY cz Y p 11- 3: Gène clé de la détermination Testiculaire

Présence du TESTIS DETERMINING FACTOR

Identification du gène « Sex determining Region Y » (SRY) à la frontière pseudo-autosomique qui produit une HMG protéine de 204 AA:

Injection de SRY dans fœtus XX → Fœtus Male

2.1.1 Propriétés de SRY:

Facteur de transcription qui se lie à ADN

Rôle dans la configuration spatiale de l'ADN permettant la formation de complexes protéiques.

Activation en cascade des gènes de la différenciation testiculaire

2.1.2 Mutation SRY - chez 46XY

Gonade indifférenciée + utérus + OGE féminin

Absence de cellules de Leydig et de testostérone

2.2. SOX 9 cz 17q-24

Code pour une HMG protéine impliquée dans la formation des chondrocytes et type II de collagène

Mutation SOX 9: Dysplasie campomélique : Anomalie sexuelle variable allant du phénotype féminin aux anomalies mineures

2.3. Région DSS sur bras court de X: cz Xp21

Récepteur nucléaire, facteur de transcription inhibiteur

Dosage sensitive « anti-testis » factor ou effet dose sur la différenciation testiculaire

Mutation DAX 1 chez l'homme → hypoplasie surrénalienne + hypogonadisme hypogonadotrope et arrêt total de développement testiculaire

DAX inhibe la transcription SF1

DAX est un antagoniste de SRY

2.4. Différenciation gonadique dans le sexe masculin

2.4.1 Différenciation de deux types cellulaires sous l'action de SRY:

Cellules de Leydig

Cellules de Sertoli

2.4.2 Production de deux lignées hormonales

- *Androgènes*

Les cellules de Leydig assurent la sécrétion de Testostérone

Virilisation des structures Wolffiennes

La Testostérone se transforme en Dihydrotestostérone grâce à la 5 alpha réductase : enzyme présente dans le sinus urogénital, développement du tractus génital externe.

La Testostérone et la DHT agissent au niveau des tissus cibles via un récepteur nucléaire : le récepteur aux androgènes (Rr A)

Le Rr A : cz Xq 11-12 : est un gène de 8 exons codant pour une protéine de 919 AA. Le complexe Rr DHT forme un homodimère qui lie spécifiquement des facteurs de transcription.

- *Hormone anti-Mullérienne*

Produite par les cellules de Sertoli à la 8ème semaine de vie

Son rôle est de faire régresser les canaux de Muller

Syndrome de persistance des canaux mullériens autosomique récessif cz19 : utérus et trompes présents, OGE masculinisés, cryptorchidie ; intérêt du dosage dans les dysgénésies gonadiques à contingent testiculaire et dans les insensibilités aux androgènes (répression).

AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE

GONADOTROPE

*Docteur Antoine BENNET
Service d'Endocrinologie, CHU Rangueil, Toulouse*

1. INTRODUCTION, DEFINITIONS PRESENTATION DES HORMONES

La fonction gonadotrope est assurée, en dehors de la période de la grossesse, par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. **Un même type cellulaire, la cellule gonadotrope, synthétise et sécrète les 2 gonadotrophines hypophysaires, à savoir les hormones LH (Luteinizing Hormone, lutropine) et FSH (Follicle Stimulating Hormone, follitropine).** Seules quelques-uns des cellules gonadotropes sont probablement spécialisées dans la production et la sécrétion de LH ou de FSH, mais la plupart des cellules gonadotropes ont la possibilité de produire et de sécréter de façon régulée les 2 hormones.

L'hypophyse est une glande endocrine située dans la selle turcique, qui est une logette de la base du crâne, au niveau de la partie supérieure de l'os sphénoïde. On distingue au niveau de l'hypophyse un lobe antérieur, un lobe postérieur, et une tige (tige pituitaire) située en arrière du chiasma optique.

- *Le LOBE ANTERIEUR (ANTE-HYPOPHYSE) contient 5 types de cellules sécrétantes : cellules somatotropes (= cellules à GH = Growth Hormone ou STH = Somato-trophic hormone), cellules lactotropes (prolactine, en abrégé PRL), cellules gonadotropes (LH et FSH), cellules thyroïdotropes (TSH), cellules corticotropes (ACTH, dont le précurseur est la POMC ou pro-opio-mélanocortine).*
- *Le LOBE POSTERIEUR de l'hypophyse (POST-HYPOPHYSE) contient les axones de neurones dont le corps neuronal est situé dans les noyaux supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus et sécrète principalement l'ADH (hormone anti-diurétique), appelée encore arginine-vasopressine (AVP).*

Le lobe antérieur de l'hypophyse est donc glandulaire, capable de synthétiser et de sécréter des hormones, et il ne possède pas de connexion nerveuse avec le cerveau, mais une connexion vasculaire à fort débit, le SYSTEME PORTE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE. Les artères hypophysaires supérieures se dirigent vers l'éminence médiane de l'hypothalamus, où elles se résolvent en un réseau capillaire, qui converge pour donner des troncs de plus gros volume, eux-mêmes donnant un réseau capillaire secondaire au niveau de l'anté-hypophyse. Les neurones hypothalamiques peuvent donc libérer leur sécrétion dans le premier réseau capillaire, qui véhicule le facteur hypothalamique jusqu'au second réseau capillaire, où il agit sur les cellules glandulaires de l'anté-hypophyse, dont il

régule l'activité de synthèse et de sécrétion hormonale. A l'opposé, le lobe postérieur n'est que le prolongement de neurones hypothalamiques dont les axones passent dans la tige pituitaire (donc il y a une connexion nerveuse avec les régions supra-hypophysaires), et il n'a pas les caractéristiques d'une glande endocrine effectuant des synthèses, il n'a qu'un rôle de réservoir pour la sécrétion d'ADH.

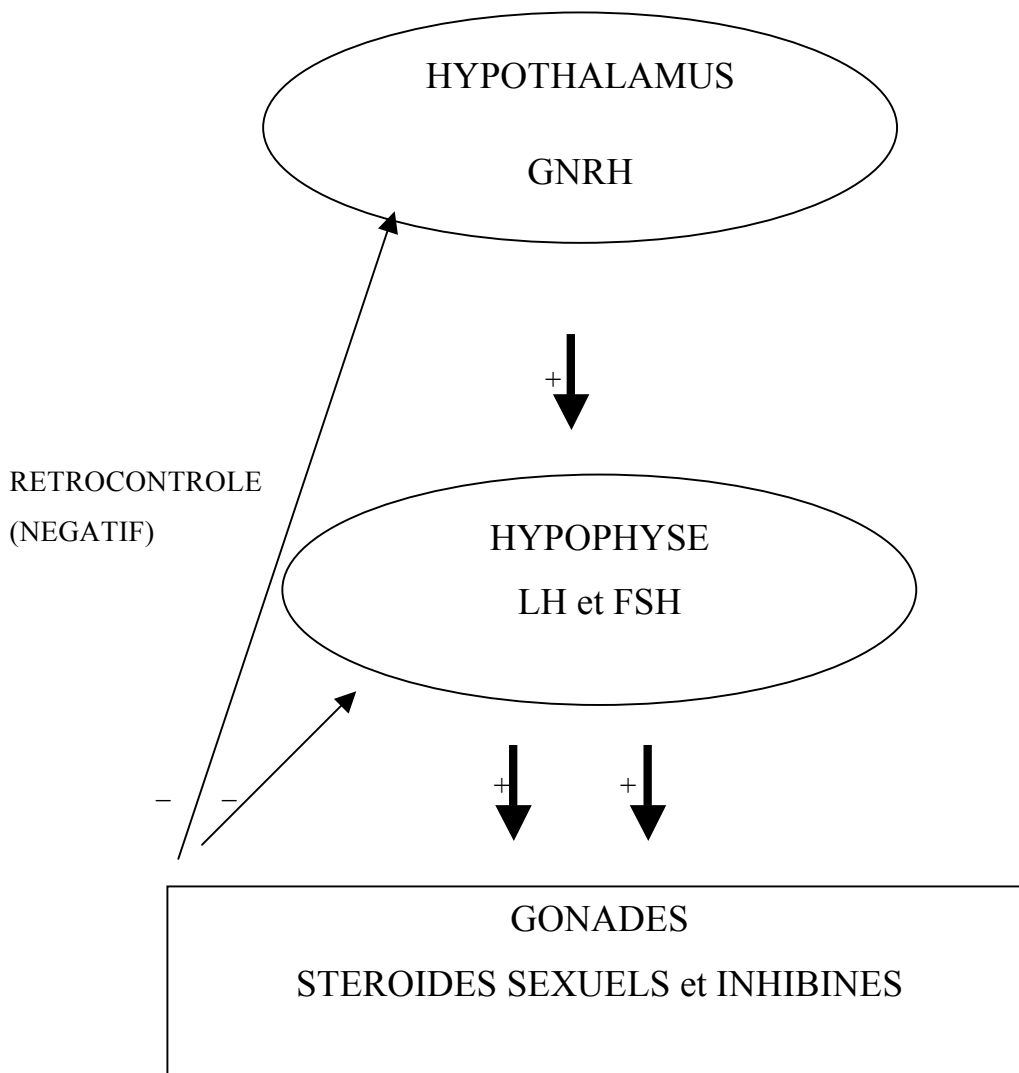
La PROLACTINE (PRL) a pour rôle essentiel dans l'espèce humaine d'assurer la lactation, mais n'a pas la même action ovarienne que dans d'autres espèces animales. A concentrations circulantes élevées (hyperprolactinémie), par contre, elle inhibe la fonction gonadotrope, au niveau hypothalamique (GnRH), et plus accessoirement elle inhiberait également la réponse gonadique aux gonadotrophines. Cela explique qu'elle est évaluée dans les bilans d'infertilité et de perturbations de la fonction gonadotrope, mais son rôle physiologique sur celle-ci est mineur.

La PRL est physiologiquement inhibée en permanence par la sécrétion de dopamine hypothalamique (tonus dopaminergique inhibiteur) qui agit sur le récepteur D2 dopaminergique des cellules lactotropes. Toute pathologie perturbant le passage de la dopamine de l'hypothalamus à l'antéhypophyse, et tout médicament à effet anti-dopaminergique entraînera une hypersécrétion de prolactine. La forme moléculaire sécrétée par les cellules gonadotropes, qui est physiologiquement la forme circulante largement majoritaire, est une simple chaîne de 199 acides aminés («Little PRL», poids moléculaire de l'ordre de 23 kD) dont il existe également une forme variante glycosylée, portant une chaîne glucidique branchée sur la chaîne d'acides aminés («Little PRL» glycosylée, poids moléculaire de 25 kD), qui représente 20 à 25% de la « Little PRL » totale, et qui est moins active biologiquement sur le récepteur de la PRL que la forme non glycosylée. Il existe également des formes macromoléculaires de PRL, la « Big PRL » (dimère de « Little PRL », poids moléculaire de l'ordre de 50 kD), et la « Big big PRL » (agglomérat de molécules de Little PRL et d'anticorps anti-PRL, poids moléculaire de 150 kD ou plus). Ces formes macromoléculaires, plus particulièrement la «Big big PRL», ne sont pas détectées par toutes les méthodes immunologiques de dosage de la prolactine.

En pathologie, dans la majorité des cas, les hyperprolactinémies sont dues à une augmentation de la forme monomérique ou «little PRL».

Nous ne traiterons par la suite que des gonadotrophines hypophysaires, de leur intervention et de leur régulation, dans le cadre de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope. **Globalement, l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope répond au schéma classique de fonctionnement et de régulation de plusieurs types cellulaires antéhypophysaires** : stimulation hypothalamo-hypophysaire (un facteur hypothalamique, GnRH, stimule les hormones hypophysaires, LH et FSH, qui elle-mêmes stimulent les glandes endocrines cibles que sont les testicules chez l'homme, les ovaires chez la femme) et rétrocontrôle par les glandes endocrines cibles au niveau hypothalamo-hypophysaire (rétrocontrôle des stéroïdes sexuels et des inhibines sur l'hypophyse et/ou l'hypothalamus). L'axe peut intégrer de plus l'effet d'autres influences, en particulier à partir de neuromédiateurs centraux, ce qui permet des adaptations à différentes conditions dont le stress ou les modifications des apports

énergétiques. L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope présente des particularités spécifiques, au niveau de la stimulation hypothalamique et du rétrocontrôle, qui permettent de réguler à partir d'un seul type cellulaire, la cellule gonadotrope, les sécrétions de 2 hormones, LH et FSH, de façon physiologiquement harmonieuse.



2. HYPOPHYSE GONADOTROPE : LES GONADOTROPHINES LH ET FSH

2.1. La structure des gonadotrophines

Les gonadotrophines anté-hypophysaires, LH et FSH, sont des stimulines glycoprotéiques, comprenant donc une partie protéique, sur laquelle se greffent des chaînes glucidiques. Nous ne donnerons ici que les principales notions sur la structure des gonadotrophines hypophysaires et les relations structure-propriétés.

Une 3^{ème} gonadotrophine est l'hormone chorionique gonadotrope (hCG = human chorionic gonadotrophin), qui est sécrétée par le placenta pendant la grossesse, et par certaines tumeurs.

La partie protéique des stimulines glycoprotéiques est définie par le code génétique, et elle est formée de 2 sous-unités, qui sont des chaînes peptidiques, liées entre elles par des liaisons non covalentes dont les gènes sont portés par des chromosomes différents (gène en 6 q21-1-q23 pour la sous-unité alpha, 19q13.32 pour la sous-unité bêta de LH, 11p13 pour la sous-unité bêta de FSH) :

- la sous-unité alpha, spécifique d'espèce, est commune à 4 hormones: LH, FSH, hCG, TSH;
- la sous-unité bêta, spécifique d'action, diffère entre ces 4 hormones; cependant la sous-unité bêta de hCG est très proche de la sous-unité bêta de LH (elle correspond approximativement à bêta-LH, avec un site supplémentaire de N-glycosylation, et prolongée de 30 acides aminés dans la région C-terminale, avec 4 sites de O-glycosylation). LH et hCG ont un même récepteur. La FSH a un récepteur différent de celui de LH et hCG.

La partie glucidique est faite de plusieurs chaînes glucidiques différentes pour chaque résidu glucidique. La LH (comme la FSH, ou hCG, ou TSH) n'est pas une seule molécule, mais un ensemble de molécules (=isoformes), qui ont en commun leur partie protéique, mais diffèrent par leurs parties glucidiques. Les chaînes glucidiques N-liées (sur fonction amine d'asparagine de la chaîne protéique) se fixent sur l'asparagine s'il y a la séquence consensus de glycosylation: Asparagine-X-Sérine ou Asparagine-X-Thréonine, où X n'est pas la Proline. Il existe également sur hCG des chaînes glucidiques O-liées (sur fonction alcool de sérine ou thréonine). Les chaînes glucidiques interviennent dans la demi-vie et l'activité biologique de la molécule. De façon générale, les isoformes basiques, dont les résidus glucidiques sont pauvres en acide sialique, sont plus actives in vitro (rapport B/I = bioactivité /immunoréactivité élevé) mais elles ne sont pas nécessairement plus efficaces in vivo, car leur demi-vie est courte, alors que c'est le contraire pour les isoformes acides, plus riches en acide sialique (activité biologique plus faible in vitro et demi-vie plus longue in vivo). L'hCG, qui possède plus de résidus glycosylés que la LH, a la même action (elle agit sur le même récepteur), mais la durée de l'action est plus prolongée.

SUR LE PLAN PRATIQUE, il y a plusieurs conséquences de la glycosylation. La production d'hormones « recombinantes » par génie génétique dans des lignées cellulaires a permis de standardiser les isoformes dans les préparations de FSH utilisées en thérapeutique, par rapport aux formes extraites d'urines de femmes ménopausées (hMG et urofollitropine purifiée). D'autre part, il faut s'attendre à ce que les éléments régulant la sécrétion de LH et FSH modifient, sans que cela soit nécessairement évalué, la composition en isoformes de ces hormones, et cette « régulation qualitative » peut avoir une importance parfois sous-estimée dans les conséquences biologiques, si on a évalué seulement la quantité circulante par une méthode de dosage immunologique. Enfin, les méthodes de dosage immunologiques peuvent ne pas reconnaître certaines isoformes de LH ou de FSH, ce qui peut entraîner des résultats différents d'une méthode de dosage à l'autre.

2.2. Schéma de l'axe gonadotrope. Rôle des gonadotrophines dans le sexe masculin

Dans le sexe masculin, le rôle de la fonction gonadotrope est le contrôle de la fonction endocrine et de la fonction exocrine testiculaire. Schématiquement, sur le plan endocrine, la fonction gonadotrope contrôle principalement la production de testostérone, d'où un contrôle sur la morphologie des organes génitaux in utero, et des caractères sexuels secondaires chez l'adulte. Sur le plan exocrine, la fonction gonadotrope contrôle la spermatogénèse.

La LH stimule les cellules de Leydig qui produisent la testostérone, qui exerce elle-même des effets généraux (androgénisation) et des effets locaux (stimulation de la spermatogénèse). **La testostérone exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH, et également, mais plus accessoirement, de la FSH (pour laquelle un rétrocontrôle complet nécessite la présence d'inhibine B à concentration adéquate).**

La FSH stimule les cellules de Sertoli, au niveau des tubes séminifères, et entraîne ainsi une stimulation de la spermatogénèse ainsi qu'une stimulation de la sécrétion d'inhibine B. La FSH pourrait également exercer un rôle direct de stimulation sur la spermatogénèse au niveau des spermatogonies, qui se situent dans le compartiment basal des tubes séminifères, et qui apparaissent présenter des récepteurs pour la FSH. L'effet de la FSH sur la spermatogénèse est une stimulation quantitative; il est possible également qu'une quantité au moins minimale de FSH soit nécessaire pour l'initiation de la spermatogénèse lors de la puberté masculine.

L'inhibine B exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH, essentiellement au niveau hypophysaire.

En ce qui concerne le rôle de la FSH dans l'initiation de la spermatogénèse, il faut savoir :

- 1) qu'en cas de mutation inactivatrice de béta-FSH, il y a azoospermie (Huhtaniemi, Mol. Cell. Endocrinol., 1999, 25, 89-94);
- 2) qu'en cas de mutation inactivatrice du récepteur de la FSH, on n'a rapporté qu'une oligoasthénospermie (Tapanainen J.S., Nat. Genet., 1997, 15, 205-206). Une explication pourrait être qu'une quantité minimale de FSH efficace suffit à l'initiation de la spermatogénèse, mais que cette quantité minimum est indispensable pour cette initiation; dans le premier cas, la mutation supprime la production de FSH, d'où l'azoospermie, et dans l'autre cas, l'inactivation du récepteur de la FSH serait incomplète, permettant l'initiation de la spermatogénèse, mais confirmant que la FSH est nécessaire pour la stimulation quantitative normale de la spermatogénèse, d'où la réduction de la numération des spermatozoïdes (oligozoospermie).

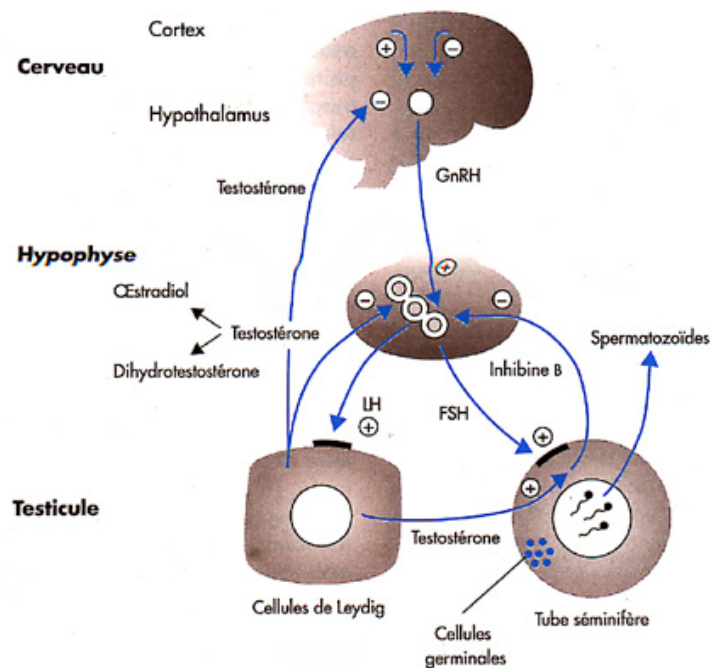


Schéma de régulation d'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope masculine : GnRH stimule LH et FSH ; LH stimule la testostérone (cellules de Leydig testiculaires), qui stimule les cellules de Sertoli et la spermatogénèse (effet local paracrine) , et exerce un rétrocontrôle négatif (en grande partie via une aromatisation en œstradiol) sur LH et FSH, au niveau hypophysaire, et au niveau hypothalamique sur GnRH (sans doute via un système neuronal hypothalamique, comme les neurones à bêta-endorphine donnant des terminaisons neuronales dans le noyau arqué = système neuronal opioïde qui inhibe la sécrétion des neurones à GnRH du noyau arqué de l'hypothalamus); FSH stimule l'inhibine B (cellules de Sertoli testiculaires), qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH au niveau hypophysaire.

Il faut rajouter au schéma l'AMH (ANTI-MULLERIAN HORMONE), hormone qui n'intervient pas dans le rétrocontrôle sur les gonadotrophines, mais dont la sécrétion dépend de la sécrétion de gonadotrophines. Dans le sexe masculin, elle est sécrétée par les cellules de Sertoli dans le sang circulant de la vie in utero à la puberté, puis elle est retrouvée principalement ensuite dans le liquide séminal. L'AMH appartient à la même famille d'hormones que les inhibines et les activines (cf plus loin), la famille du TGF-béta, et comme les gonadotrophines, il s'agit de protéines glycosylées. Le gène de l'AMH est situé sur le chromosome 19 (19p13.3). L'AMH est sécrétée dans le sexe masculin durant la vie embryon-fœtale sous l'effet des gènes SRY et SOX9 (qui interviennent dans la différenciation sexuelle) et entraîne une régression des canaux de Müller qui est complète à 8 semaines de vie, au moment où débute la sécrétion de testostérone qui stimule les structures dérivant des canaux de Wolff. L'AMH intervient de plus dans la descente des testicules dans l'abdomen, puis le passage à travers le canal inguinal est dépendant de l'action de la testostérone. Dans la vie embryon-

fœtale, ainsi que chez le nouveau-né, les cellules de Sertoli sont dépourvues de récepteur aux androgènes. A la puberté, alors que la FSH tend à stimuler l'AMH, la LH, par son effet de stimulation de la testostérone, entraîne une inhibition de la sécrétion d'AMH, si le récepteur aux androgènes est normal. Dans l'enfance, les sujets qui ont une absence de testicules (anorchidie) ne sécrètent pas d'AMH et se différencient des sujets qui ont une cryptorchidie (testicules intra-abdominaux) qui ont une sécrétion d'AMH. A la puberté, les sujets normaux ont une diminution franche de la concentration circulante d'AMH (qui diminue à de très faibles concentrations dans le sang, et ne se retrouve plus à des concentrations plus importantes que dans le liquide séminal) si la puberté se déroule normalement ; en cas d'insensibilité aux androgènes, l'AMH reste élevée, à des taux infantiles. Cette évolution est totalement différente de ce qui se produit dans le sexe féminin.

2.3. Rythmes sécrétoires des gonadotrophines

Plusieurs rythmes interviennent dans la sécrétion de LH et FSH chez l'adulte.

2.3.1 Pulsatilité

La **pulsatilité** (ou rythme circulaire, ou rythme ultradien) existe dans les 2 sexes. Il dépend de la **sécrétion hypothalamique de GnRH** (= Gonadotropin Releasing Hormone = LHRH = gonadolibérine), qui se fait non de façon continue, mais de façon "pulsée". On estime que pour chaque pulse de GnRH, il existe un pic sécrétoire de gonadotrophines, ce qui permet d'évaluer indirectement la pulsatilité de la GnRH hypothalamique en étudiant, par des prélèvements répétés (généralement toutes les 10 minutes) de sang périphérique, les concentrations de LH et leurs variations. La règle 1 pulse de GnRH = 1 pic de sécrétion de gonadotrophines (en particulier LH, dont les isoformes sont de demi-vies globalement plus courtes que les isoformes de FSH) est certainement vraie de façon générale, mais en fait, elle dépend de la réactivité hypophysaire : on sait que si chez des sujets déficients en GnRH, on administre 2 pulses de GnRH de façon trop rapprochée, le second pulse de GnRH n'entraîne pas de pic de LH (période réfractaire) ; d'autre part, il existe des sujets qui présentent une mutation du récepteur hypophysaire à la GnRH, entraînant une inactivation partielle ou complète de ce récepteur, et il peut alors y avoir un ou plusieurs pulses de GnRH sans pic de LH, voire une absence complète de pic de LH malgré une pulsatilité normale de GnRH.

Dans le sexe masculin il y a environ 1 pulse toutes les 120 minutes.

Cela entraîne des conséquences pratiques pour l'évaluation des concentrations circulantes de LH et FSH. La LH aura en effet des concentrations circulantes variables entre le pic et le nadir de sécrétion, d'où une zone des valeurs normales de concentrations de LH assez large, en cas d'évaluation sur un prélèvement ponctuel (la demi-vie moyenne des isoformes de LH reconnues par les dosages est de l'ordre de 45 minutes et permet de percevoir nettement les pics de concentration). La FSH a des pics de concentration contemporains des pics de LH, mais la demi-vie moyenne des molécules de FSH est

plus longue, de l'ordre de presque 4 heures (3h45 environ) de sorte que les concentrations circulantes de FSH sont beaucoup moins variables que celles de la LH.

2.3.2 Rythme nyctéméral

Chez l'homme adulte, il existe un rythme nyctéméral de la concentration circulante de testostérone, qui est maximum en milieu et fin de nuit et tout début de matinée, sans qu'il y ait de rythme nyctéméral de la LH (augmentation de la sensibilité testiculaire à la sécrétion de LH dans cette période ?). L'augmentation de la testostérone durant la nuit semble un phénomène dépendant du sommeil et de la survenue de phases de sommeil rapide (phases REM) (Luboshitzky R., 2001).

2.4. Variations des gonadotrophines au cours de la vie

La fonction gonadotrope varie au cours de la vie.

Pendant la vie in utero, les cellules gonadotropes sont présentes à partir de la 8^{ème} semaine, la LH et la FSH circulantes augmentent de la 10^{ème} à la 25^{ème} semaine.

Au niveau gonadique, dans le sexe masculin : de la 6^{ème} à la 14^{ème} semaine de vie in utero, il y a multiplication des cellules de Sertoli et des cellules germinales; de la 8^{ème} à la 17^{ème} semaine de vie, il y a multiplication des cellules de Leydig et sécrétion de testostérone, qui permet la différenciation sexuelle. La stimulation de type gonadotrophine peut être assurée au début par hCG sécrétée par le placenta, puis par LH et FSH de l'embryon puis du fœtus. Cela permet de comprendre que dans le cas décrit de mutation inactivatrice de LH (mutation ponctuelle sur bêta-LH) il n'y a pas d'ambiguïté sexuelle (l'hCG placentaire a remplacé la LH pour la stimulation de la testostérone pendant la vie in utero) alors qu'en cas de mutation inactivatrice du récepteur de LH-hCG, il y a ambiguïté sexuelle chez les sujets XY.

A la naissance, la LH est quasi-indéetectable dans les 2 sexes et la FSH est présente, surtout dans le sexe féminin.

Puis survient une sécrétion pendant les 6 premiers mois de vie (crise génitale du nouveau-né).

Dans le sexe masculin, les concentrations circulantes de LH, FSH, testostérone sont semblables à celles de l'homme adulte. La concentration de LH est supérieure à celle qui est observée dans le sexe féminin. En cas de blocage de la sécrétion de gonadotrophines dans les premiers mois de vie chez le Singe, à l'âge adulte, les taux de testostérone seront subnormaux, la taille des testicules et la numération des spermatozoïdes inférieures aux valeurs normales de l'adulte.

Pendant l'enfance, la sécrétion de LH et FSH est inhibée très fortement, mais le rythme pulsatile apparait présent (avec une très faible amplitude). Au niveau gonadique, il y a multiplication des cellules de Sertoli et des cellules germinales, mais les cellules germinales s'arrêtent au stade de spermatogonies.

De toutes ces notions, il faut retenir en pratique que la fonction gonadotrope a été présente avant la puberté chez tous les sujets normaux, et qu'elle a contribué, avant la puberté, au développement gonadique. On peut donc ainsi comprendre que chez certains sujets présentant une déficience en GnRH (syndrome de Kallmann ou autres syndromes), malgré un traitement par gonadotrophines bien conduit et suffisamment prolongé à l'âge adulte, on ne récupère pas toujours un spermogramme normal. Il est probable que dans ce cas, il ne faut pas prolonger la stimulation par gonadotrophines indéfiniment (généralement pas plus de 1 an), et qu'il faut avoir recours aux techniques de procréation médicalement assistée dès qu'elles deviennent possibles.

A la puberté, il y a levée de l'inhibition de la fonction gonadotrope, avec une sécrétion de FSH qui prédomine d'abord sur LH, puis une sécrétion de LH et FSH. La pulsatilité de la sécrétion des gonadotrophines s'amplifie, il y a dans une première phase une sécrétion pulsatile ample nocturne (rythme nyctéméral avec inhibition diurne), puis la sécrétion devient de type adulte, avec des pics sécrétoires (toutes les 120 minutes environ chez l'homme) sur les 24 heures.

Au niveau gonadique, il y a multiplication des cellules germinales, initiation de la spermatogénèse, et réorganisation des cellules de Sertoli. Ces dernières acquièrent les zones de "jonction" qui créent la barrière hémotesticulaire, et la fonction de sécrétions de facteurs Sertoliens, avec stimulation de la spermatogénèse. Il y a réactivation des cellules de Leydig, avec sécrétion de testostérone, ce qui entraîne des effets locaux (stimulation de la spermatogénèse) et apparition des caractères sexuels secondaires. A noter qu'au début de la puberté, lorsque la sécrétion ample de LH n'est que nocturne, la testostérone circulante ne s'élève significativement que pendant cette phase ; pour diagnostiquer la puberté masculine débutante, il est utile de doser la testostérone tôt le matin, et pas en fin de matinée ou dans l'après-midi.

3. L'HYPOTHALAMUS GONADOTROPE : GnRH

Le principal acteur physiologique de régulation des sécrétions de LH et FSH est la sécrétion hypothalamique de GnRH (= Gonadotropin Releasing Hormone = LHRH = gonadolibérine). Il s'agit d'un décapeptide produit à partir d'un précurseur (structure = GAP-GnRH) qui comprend donc, en plus de la GnRH, un fragment N-terminal qui est le GAP ou GnRH-Associated-Peptide, qui est un inhibiteur de la sécrétion de PRL.

La GnRH agit sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires. Il existe des agonistes et des antagonistes pharmacologiques.

La GnRH a une demi-vie très courte de l'ordre de 2 à 4 minutes. La séquence est :

Pyro-Glu _ His _ Trp _ Ser _ Tyr _ Gly _ Leu _ Arg _ Pro _ Gly-NH₂

L'histidine en 2 et le tryptophane en 3 sont essentiels à l'activité biologique, et des modifications à ce niveau peuvent permettre de produire des antagonistes de GnRH. Les acides aminés N et C terminaux

sont responsables de la reconnaissance du récepteur. La glycine en 6 constitue un point d'attaque des enzymes protéolytiques qui dégradent la molécule, et des modifications apportées à ce niveau permettent d'obtenir des agonistes de plus longue durée d'action.

Des agonistes ont été obtenus en modifiant les acides aminés en 6,7 et 10 : leuprolide, bussereline, nafareline, gosereline, histreline, triptoreline. Il existe également des antagonistes par modifications des acides aminés en 1,2, 3 et 10: Nal-Glu, Antide, Cetrorelix, Ganirelix, Detirelix.

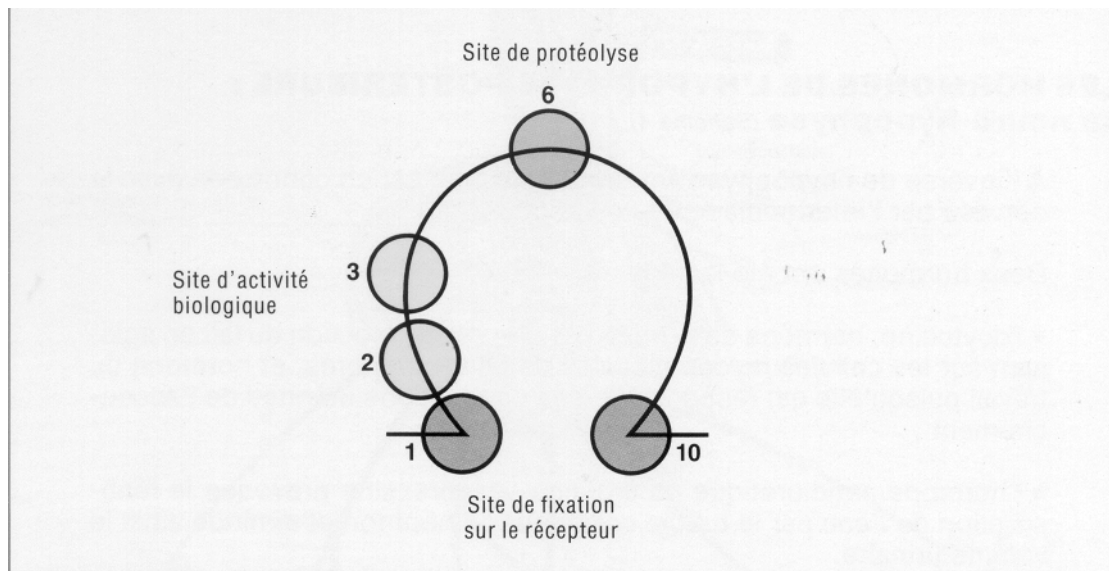


Schéma de la GnRH (qui prend une forme en C en milieu aqueux) avec les sites intervenant dans les propriétés biologiques

La GnRH qui contrôle la fonction gonadotrope est synthétisée et sécrétée par les neurones du NOYAU ARQUE de l'HYPOTHALAMUS. La sécrétion est PULSATILE +++ , et cette pulsativité est physiologiquement nécessaire pour la sécrétion de LH et FSH, comme l'a montré Knobil. Si la sécrétion est continue, ou si on administre un agoniste retard de GnRH, il y a inhibition de la transcription des sous-unités bêta (bêta-LH, bêta-FSH) et sécrétion de sous-unité alpha libre. Cet effet de la sécrétion continue serait dû à une diminution du nombre des récepteurs à la GnRH lors de leur stimulation continue. Lors du traitement par GnRH administré de façon pulsatile, chez un patient dépourvu de GnRH, il faut 4h au minimum pour qu'il y ait réapparition de récepteurs à la GnRH, et 4 à 8 jours pour obtenir l'effet maximum de stimulation du nombre de récepteurs à la GnRH. Lors d'un traitement par GnRH administré de façon continue, il faut 4 à 8 jours pour obtenir un effet maximum de diminution du nombre de récepteurs à GnRH. Se pose également le problème d'un éventuel effet post-récepteur de la stimulation continue par GnRH, pour expliquer la sécrétion préférentielle de sous-unité alpha.

Les EFFETS sont DIFFERENTS SUIVANT LA FREQUENCE DES PULSES de GnRH. Une fréquence minimum d'environ 1 pulse toutes les 120 minutes au minimum serait nécessaire pour avoir

une fonction gonadotrope normale (phase folliculaire de la femme, et sexe masculin). A partir de cette fréquence, un rythme plus rapide favorise la sécrétion de LH (production préférentielle de béta-LH par la cellule gonadotrope), un rythme plus lent la sécrétion de FSH (production préférentielle de béta-FSH par la cellule gonadotrope).

La SECRETION de GnRH est NECESSAIRE à la SYNTHÈSE et à la SECRETION des GONADOTROPHINES. En cas de déficience prolongée en GnRH, si on réalise un test de stimulation court par injection ponctuelle de GnRH (test à la LHRH pharmacologique classique), il peut donc ne pas y avoir de réponse en LH et FSH à ce test même s'il n'y a pas d'anomalie hypophysaire et si la cause de l'hypogonadisme est purement hypothalamique ; il faut proposer une stimulation pulsatile par GnRH (pompe à LHRH) de plusieurs jours (généralement réalisée une semaine) pour essayer de confirmer la cause hypophysaire ou hypothalamique de l'absence de réponse. En conclusion, un test pharmacologique « standard » à la LHRH, dans une situation d'hypogonadisme de cause centrale, hypothalamique ou hypophysaire, ne permet pas toujours de reconnaître le site hypothalamique ou hypophysaire de l'anomalie.

De façon récente, on a individualisé une protéine nommée GPR54, qui serait nécessaire à la sécrétion normale de GnRH au niveau de l'hypothalamus. Le rôle cette protéine serait important dans le déclenchement de la puberté (Seminara SB, New Engl J Med, 2003, 349, 1614-1627).

4. RETROCONTROLE

4.1. Rétrocontrôle stéroïdien dans le sexe masculin

La testostérone exerce un rétrocontrôle négatif surtout hypophysaire, mais également hypothalamique. Il s'exerce pour sa plus grande part par l'intermédiaire d'une conversion (aromatisation) en oestradiol, au niveau de récepteurs des oestrogènes mais également directement et via une conversion en 5-alpha-dihydrotestostérone (DHT) au niveau du récepteur des androgènes.

La testostérone est en effet convertie en oestradiol par l'aromatase = CytP450Arom = (dans la nomenclature la plus récente) CYP19. En conséquence, la testostérone exerce certains effets via l'oestradiol sur les récepteurs des oestrogènes. Il existe 2 types différents de récepteur aux oestrogènes E-R alpha et E-R bêta, plus récemment découvert.

La testostérone peut agir sur le récepteur des androgènes (A-R) directement ou surtout par l'intermédiaire d'une réduction en 5-alpha-dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 alpha réductase, dont il existe 2 formes : type 1 et type 2. L'affinité du récepteur pour la DHT est beaucoup plus forte que pour la testostérone, et dans la plupart (mais non la totalité) des organes cibles, il faut une transformation en DHT pour que l'action soit observée.

La testostérone inhibe la sécrétion de LH et FSH, en diminuant, en ce qui concerne le rythme pulsatile, la fréquence et l'amplitude des pics de LH et de FSH (Matsumoto, 1984). Un traitement par un anti-androgène pur comme le flutamide, qui inhibe l'action androgénique au niveau du récepteur A-R, entraîne une augmentation de LH et de FSH. Si on utilise l'acétate de cyprotérone, qui est anti-androgène mais aussi inhibiteur gonadotrope et progestatif, il y a inhibition de la sécrétion de gonadotrophines.

L'oestradiol est présent à faible concentration chez le sujet normal de sexe masculin. Il diminue la sécrétion de FSH et LH, avec une action plus marquée sur la FSH. Il diminue, en ce qui concerne le rythme pulsatile, l'amplitude des pics de LH. Il diminue également la demi-vie moyenne de LH et FSH, vraisemblablement en modifiant leur composition en isoformes.

La DHT diminue (modérément) la concentration circulante de LH, en diminuant au niveau du rythme pulsatile, l'amplitude, et dans un moindre degré la fréquence, des pics de LH (Canovatchel W.J., 1994). Le déficit en 5-alpha-réductase de type 2 et donc en DHT s'associe à une augmentation des concentrations circulantes de LH, testostérone, oestradiol, et à des concentrations circulantes de FSH normales.

Le fait que l'amplitude des pics de LH, et pas leur fréquence, soit modifiée par l'oestradiol, a fait suggérer que l'action de l'oestradiol serait plutôt hypophysaire (en inhibant l'amplitude des pics hypophysaires qui sont induits par les pulses hypothalamiques de GnRH) qu'hypothalamique (une modification du rythme des pics de LH, qui reflètent en principe les pulses de GnRH, aurait suggéré un rétrocontrôle hypothalamique). Cependant ces conclusions ne peuvent pas être formelles et de plus certains ont retrouvé une modification de fréquence des pics de LH avec les oestrogènes ou les anti-oestrogènes. Une expérimentation clinique plus récente permet de penser qu'il y a un rétrocontrôle de l'oestradiol en partie hypothalamique chez l'homme, et les méthodes employées sont intéressantes à connaître. On a étudié la sécrétion pulsatile de gonadotrophines chez : 1) des sujets normaux avant et après traitement par un inhibiteur de l'aromatase (anastrozole); 2) des sujets déficients en GnRH (syndrome de Kallmann) traités par administration pulsatile de GnRH, avant et après traitement par inhibiteur de l'aromatase; 3) des sujets normaux avant et après administration d'antagoniste de GnRH (Nal-Glu) (Hayes F.J., 2000). L'inhibiteur de l'aromatase entraîne une élévation des concentrations circulantes de LH et FSH plus importante chez les sujets normaux que chez les sujets déficients en GnRH et traités par GnRH pulsatile à doses fixes. Chez les sujets normaux, l'élévation de la LH circulante lors du traitement par inhibiteur de l'aromatase est due à une augmentation non seulement de l'amplitude, mais également de la fréquence des pics de LH (pulsatilité majorée en fréquence et en amplitude) (NB : l'amplitude des pics a augmenté chez tous les 9 sujets normaux évalués alors que la fréquence a augmenté chez 7 d'entre eux). Enfin, le pourcentage d'inhibition des concentrations de LH par l'injection aiguë d'antagoniste de GnRH chez les sujets normaux est semblable, avant et pendant l'administration d'inhibiteur de l'aromatase ; les auteurs en tirent argument pour considérer que la réactivité hypophysaire à la GnRH n'a pas été modifiée par l'administration d'inhibiteur de

l'aromatase, donc par la diminution de l'oestradiol, et de ce fait, l'augmentation de fréquence et d'amplitude des pics de LH n'est pas due à une simple majoration de réactivité hypophysaire à des pulses inchangés de GnRH, mais bien à une levée du rétrocontrôle de l'oestradiol au niveau hypothalamique, sur les pulses de GnRH. Ce test à l'antagoniste de GnRH a été utilisé plutôt qu'un test classique de stimulation pharmacologique à la GnRH (test LHRH standard), auquel les auteurs trouvent les défauts suivants : 1) il s'agit d'un test pharmacologique, à dose forte, ne permettant pas de juger la réponse à un pulse physiologique de GnRH ; 2) la réponse varie en fonction de l'instant où le test est fait, elle dépend de l'intervalle qu'il y eu entre les 2 pulses endogènes de GnRH qui ont précédé le test.

Dans les données d'études cliniques, il y a également des arguments pour penser que le rétrocontrôle de la testostérone se fait également par l'intermédiaire d'une action sur le récepteur des androgènes, en partie directe, en partie par transformation en DHT.

Dans la résistance aux androgènes, par anomalie du récepteur A-R, il y a élévation des concentrations circulantes de LH et FSH, alors qu'il y a sécrétion d'oestradiol et conservation des récepteurs aux oestrogènes.

Il y a également élévation des concentrations circulantes de LH et FSH dans le déficit en 5 alpha-réductase de type 2, où la sécrétion de testostérone et le récepteur A-R sont conservés.

L'effet de la DHT ne paraît pas expliquer tout l'effet observé avec la testostérone. L'effet de la DHT à dose pharmacologique sur les concentrations de LH et FSH n'est que plus ou moins perceptible suivant le cas. Il est faible dans l'hypogonadisme périphérique, présent chez les sujets normaux. L'effet de la DHT s'exerce en grande partie au niveau hypophysaire, puisqu'il est présent chez les sujets déficients en GnRH (syndrome de Kallmann) et traités par administration pulsatile de GnRH selon un protocole fixe.

4.2. Rétrocontrôle non stéroïdien : inhibine B, activines, follistatines

4.2.1 Inhibine B

Les INHIBINES sont l'élément principal du rétrocontrôle non stéroïdien. Elles inhibent la sécrétion de la FSH au niveau hypophysaire, et elles ont par ailleurs des rôles locaux, au niveau gonadique. L'inhibine B est synthétisée et sécrétée par les cellules de Sertoli dans le sexe masculin. Avant la naissance, l'inhibine B aurait principalement une origine Leydigienne.

Les INHIBINES sont des glycoprotéines, comme les gonadotrophines (une partie protéique, une partie glucidique). La partie protéique comprend également **2 sous-unités,** dénommées alpha et bêta, mais qui n'ont rien de commun avec les sous-unités alpha et bêta des gonadotrophines, et qui sont reliées entre elles par liaison par pont-disulfure.

Il existe actuellement des anticorps permettant des dosages assez spécifiques d'inhibine A et d'inhibine B. Pour l'inhibine A comme pour l'inhibine B, un des anticorps est un anti-alpha-C, et le 2ème anticorps est un anti-béta-A ou béta-B, suivant la molécule à doser. Les molécules contenant une sous-unité alpha, même réduite à alpha-C, et une sous-unité béta-A ou béta-B ont toutes vraisemblablement une activité biologique d'inhibition de la FSH, mais en l'absence de dosage spécifique de chaque forme moléculaire, cela est difficile à affirmer formellement. Les sous-unités libres ou leurs fragments circulants n'ont pas d'activité d'inhibition de la FSH, et les méthodes de dosage plus anciennes qui dosaient outre les inhibines, les sous-unités alpha libres, ne permettent pas de tirer de véritables conclusions.

4.2.2 Activines

Les ACTIVINES sont des molécules constituées de 2 sous-unités béta de l'inhibine béta A-béta A ou activine A, béta A - béta B ou activine AB, béta B - béta B ou activine B. Les ACTIVINES stimulent in vitro la sécrétion de FSH, mais leur rôle physiologique est sans doute local, au niveau gonadique (actions paracrines et/ou autocrines). Il n'est pas certain que les concentrations circulantes observées in vivo soient actives sur la FSH (pas d'effet endocrine prouvé).

Dans le sang, de plus, l'activine est transportée liée à la follistatine qui est en excès (il n'y aurait pas d'activine libre dans le sang circulant). En synthèse, l'ACTIVINE aurait un rôle surtout local, au niveau gonadique, et son rôle général (endocrine) reste à évaluer, sans qu'il apparaisse majeur sur les données actuelles. Seul le dosage de l'activine A est actuellement disponible.

4.2.3 Rétrocontrôle par l'inhibine B

L'INHIBINE B est sécrétée par les cellules de Sertoli. Il existe un rythme nyctéméral presque parallèle à celui de la testostérone (maximum de concentration circulante en fin de nuit-début de matinée), et comme pour la testostérone, ce rythme ne correspond pas à des modifications de sécrétion des gonadotrophines, qui n'ont pas de rythme nyctéméral établi chez l'homme adulte (il pourrait donc y avoir des modifications nyctémérales de la sensibilité testiculaire à l'action des gonadotrophines ?).

Dans des groupes d'hommes adultes, il y a une **CORRELATION INVERSE ENTRE concentrations circulantes de FSH et d'INHIBINE B.** L'inhibine B est donc un élément essentiel du rétrocontrôle négatif des testicules sur la FSH à l'âge adulte.

L'INHIBINE B DIMINUE, et donc la FSH AUGMENTE, s'il n'y a PAS DE SPERMATIDES ou s'il y a une HYOSPERMATOGENESE SEVERE. Par contre, l'inhibine B ne diminue PAS dans tous les cas de syndrome "Sertoli cell only" (aplasie germinale) (von Eckardstein S., 1999; Foresta C., 1999; Bohring, 1999).

L'inhibine B inhibe la FSH au niveau hypophysaire par une boucle de rétrocontrôle négatif classique, la FSH stimulant la sécrétion d'inhibine B par les cellules de Sertoli.

MAIS il existe des différences entre l'axe LH-TESTOSTERONE (LEYDIG) et l'axe FSH-INHIBINE B (SERTOLI), comme le montrent les résultats de l'orchidectomie unilatérale chez le Singe (Ramaswamy S., 2000). Au niveau de l'axe LH-testostérone, il y a transitoirement une diminution de la concentration circulante de testostérone, et une augmentation de celle de la LH, puis récupération de concentrations de testostérone et de LH normales. Au niveau de l'axe FSH-inhibine B, il y a diminution de l'inhibine B circulante, augmentation de la FSH, et pas de récupération de concentrations circulantes normales de FSH et d'inhibine B. Tout se passe donc comme si la production de testostérone n'était pas à son maximum possible au niveau testiculaire, et pouvait s'adapter après orchidectomie unilatérale, à partir du seul testicule restant, alors que la production d'inhibine B serait physiologiquement proche de son maximum, ne permettant pas de récupération d'une concentration normale après orchidectomie unilatérale.

5. REGULATION DIFFERENTIELLE DE LH ET FSH

La cellule gonadotrope sécrète LH et FSH, et les quantités respectives de chacune de ces 2 hormones résultent de facteurs de régulation qui s'exercent sur la cellule gonadotrope, et permettent d'obtenir les quantités optimales respectives de LH et FSH. Il existe, comme nous l'avons vu, **TROIS ELEMENTS** permettant la régulation différentielle de la sécrétion de LH et de FSH par les cellules gonadotropes. Ces 3 mécanismes interviennent dans les 2 sexes.

Le premier mécanisme est l'effet de la **FREQUENCE DES PULSES DE GnRH** sur les cellules gonadotropes. Une fréquence plus rapide favorise la sécrétion de LH, une fréquence moins rapide celle de la FSH.

Le 2ème mécanisme fait intervenir l'OESTRADIOL, qui exerce un effet inhibiteur plus important sur la sécrétion de FSH que de LH, au niveau hypophysaire principalement.

Le 3ème mécanisme fait intervenir l'inhibine B, qui freine la sécrétion de FSH au niveau hypophysaire dans le sexe masculin.

LES HORMONES STÉROÏDES

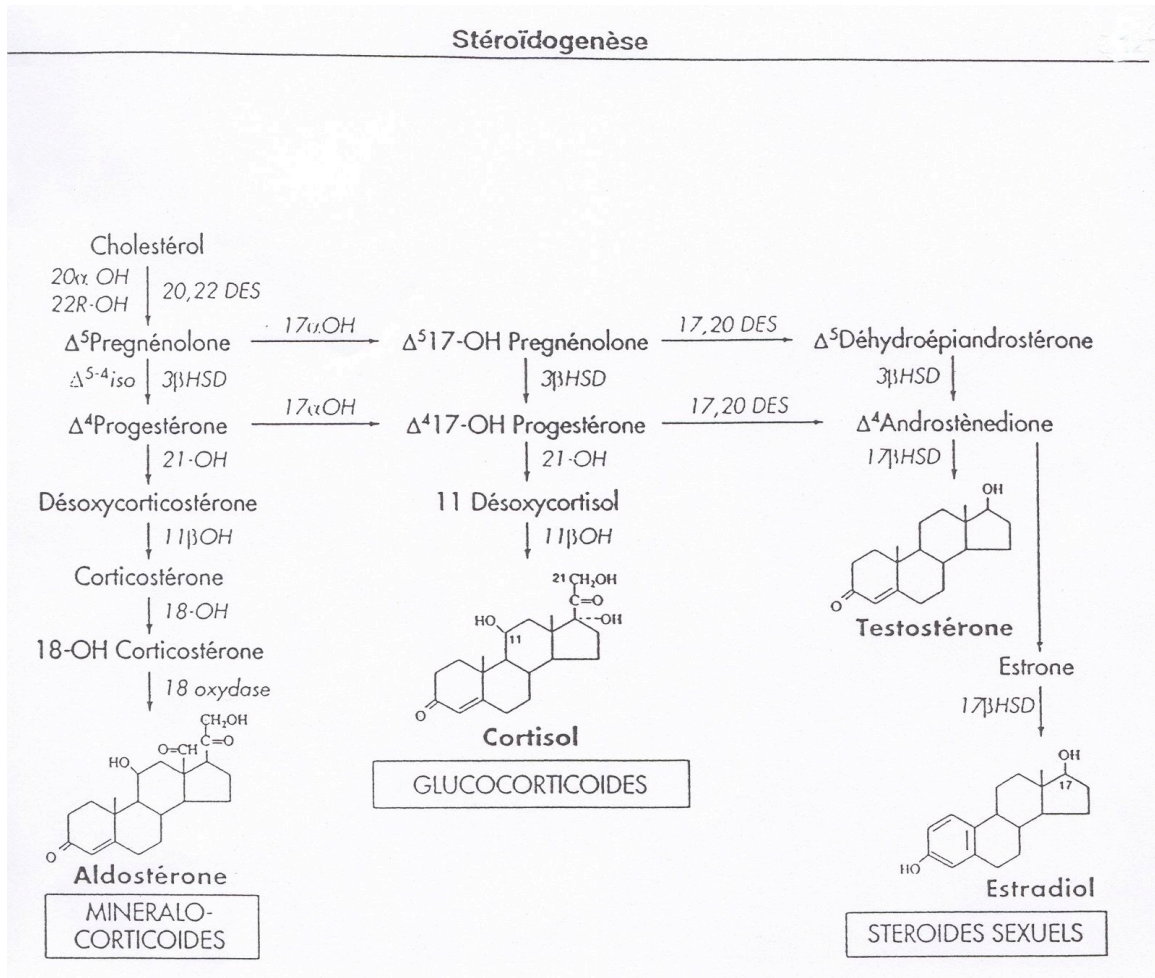
Professeur Bertrand PERRET

Laboratoire de Biochimie III CHU, La Grave, Toulouse et Unité INSERM 563

1. LES HORMONES STÉROÏDES : PRODUCTION ET EFFETS BIOLOGIQUES

Le cholestérol est le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. La première étape de toute stéroïdogénèse passe par la formation de Δ^5 -prégnénone, cette conversion prenant place dans la mitochondrie sous l'action de la C_{20,22} desmolase associée au Cytochrome P450. Chez l'adulte jeune, la zone réticulée du Cortex Surrénal développe une synthèse importante de DHEA et DHEA-sulfate, à partir de la Prégnénone. Tous ces stéroïdes partagent des éléments structuraux communs : une double liaison en Δ^5 et une fonction alcool sur le carbone 3.

Dans le cortex surrénal comme dans les gonades, un complexe enzymatique mitochondrial, la 3β HydroxyStéroïde Déshydrogénase, assure la conversion de ces molécules en stéroïdes de configuration Δ^4 et fonction cétone sur le carbone 3 : la Progestérone et son dérivé 17-OH Progestérone et la Δ^4 -androstène-dione (Δ^4 A.D.). Ce complexe 3α -HSD ouvre ainsi la voie à la synthèse des Glucocorticoïdes et Minéralocorticoïdes par le cortex surrénal, et à celle des Androgènes à la fois dans le cortex surrénalien et dans les gonades. Chez l'homme, plus de 90% de la Testostérone (T) est sécrétée par les cellules de Leydig,.



Les principaux effets physiologiques des stéroïdes hormonaux sont brièvement rappelés. La testostérone est convertie en DiHydro-Testostérone (DHT) dans nombre de cellules cibles. Elle intervient dans la différenciation sexuelle, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires, l'entretien de la spermatogénèse et exerce des effets trophiques et anabolisants sur le squelette et les muscles... E2 et T ont aussi des effets métaboliques complexes, et parfois opposés. Ainsi, par exemple, l'imprégnation estrogénique est associée à l'élévation du HDL-cholestérol, et de façon générale, à des effets vasculo-protecteurs dont les mécanismes sont incomplètement élucidés.

Il semble bien aujourd'hui que la DHEA et la Δ^4 -A.D., pour lesquelles aucun récepteur spécifique n'a été encore formellement identifié, exercent l'essentiel de leurs effets de par leur conversion en stéroïdes "actifs", T et E2. Toutefois, des données expérimentales chez l'animal, suggèrent que les sulfates de DHEA et de Prénénolone puissent être considérés comme des neuro-stéroïdes, produits par, et agissant sur, le système nerveux central. Le rôle éventuel de ces neuro-stéroïdes dans le contrôle de la libido est actuellement débattu.

2. TRANSPORT PLASMATIQUE DES HORMONES STEROÏDES

Les stéroïdes circulent sous trois formes :

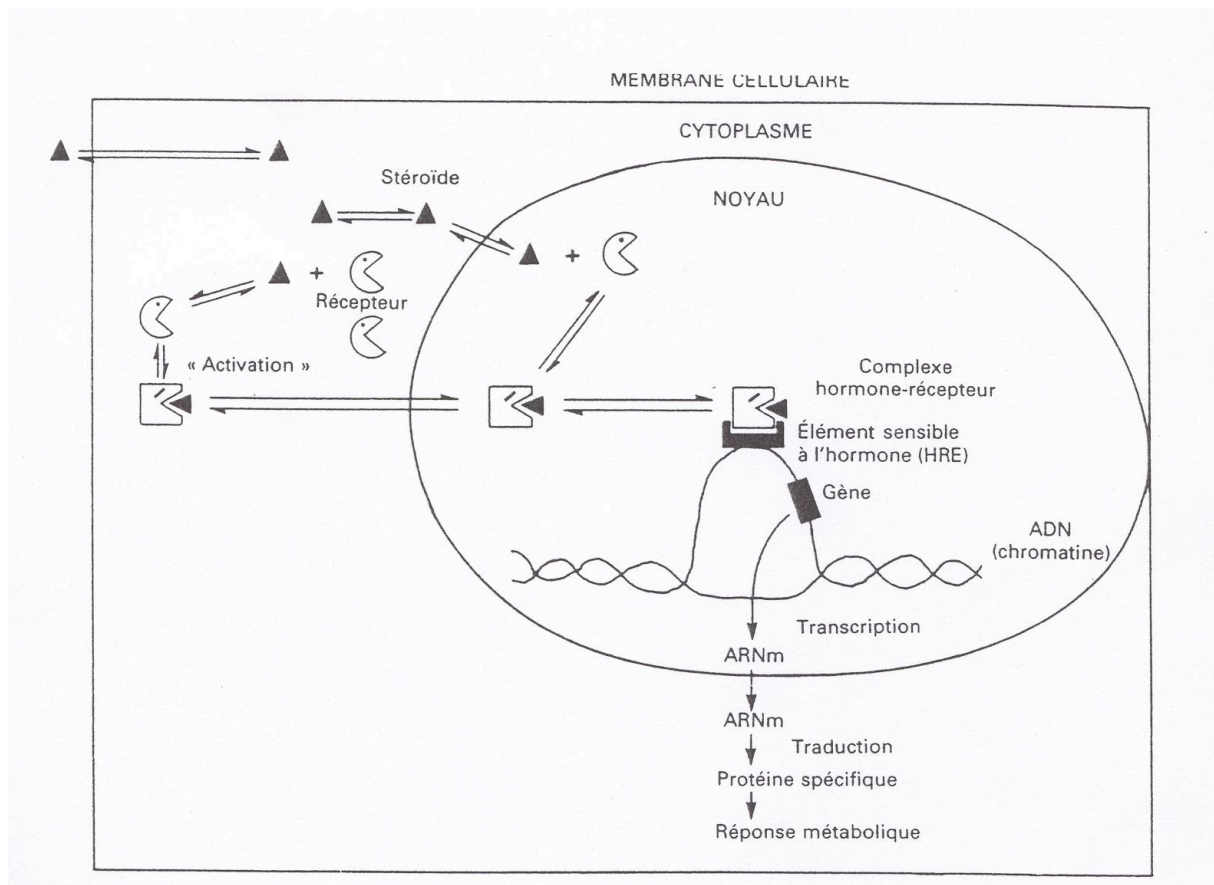
- libre, correspondant à la forme bio-active, susceptible d'interagir avec des récepteurs membranaires ou de pénétrer dans les cellules ; cette forme représente 0,5 à 6% de l'hormone circulante.
- liée à l'albumine, transporteur de grande capacité mais non spécifique et de faible affinité ; cette dernière caractéristique explique que les hormones se désorbent facilement de l'albumine. Pour cette raison, la somme fraction libre + fraction liée à l'albumine est dite " hormone bio-disponible ". L'albumine transporte de 25 à 90% des stéroïdes, selon les cas.
- Véhiculée par un transporteur spécifique de haute affinité (10^{-9} M).

@ la SHBG (sex hormone binding globulin), parfois dénommée TeBG (testostérone estradiol binding globulin) est une glycoprotéine synthétisée par le foie. Elle lie avec une haute affinité T et DHT et avec une affinité moindre, E2. Du fait de cette différence, la SHBG est principalement un régulateur des formes libre (active) et liée de la T. Par ailleurs, E2 stimule la synthèse de la SHBG alors que T la déprime, augmentant de ce fait la fraction libre de T. Cette boucle d'amplification accentue l'imprégnation androgénique des cellules. La SHBG est également soumise à des régulations métaboliques complexes. Il est bien établi aujourd'hui qu'un taux bas de SHBG est associé aux situations d'hyperinsulinisme. Ainsi, à l'avenir, le dosage de la SHBG pourrait prendre une place importante dans l'évaluation des profils d'hyperandrogénie et d'hyperinsulinisme, fréquemment retrouvés lors de situations de dysovulations. La SHBG véhicule 75% de la T chez l'homme,.

@ la CBG (cortisol binding globulin) ou " transcortine ", de synthèse hépatique, est la protéine de liaison spécifique du Cortisol, de la Corticostérone, mais aussi de la Progestérone.

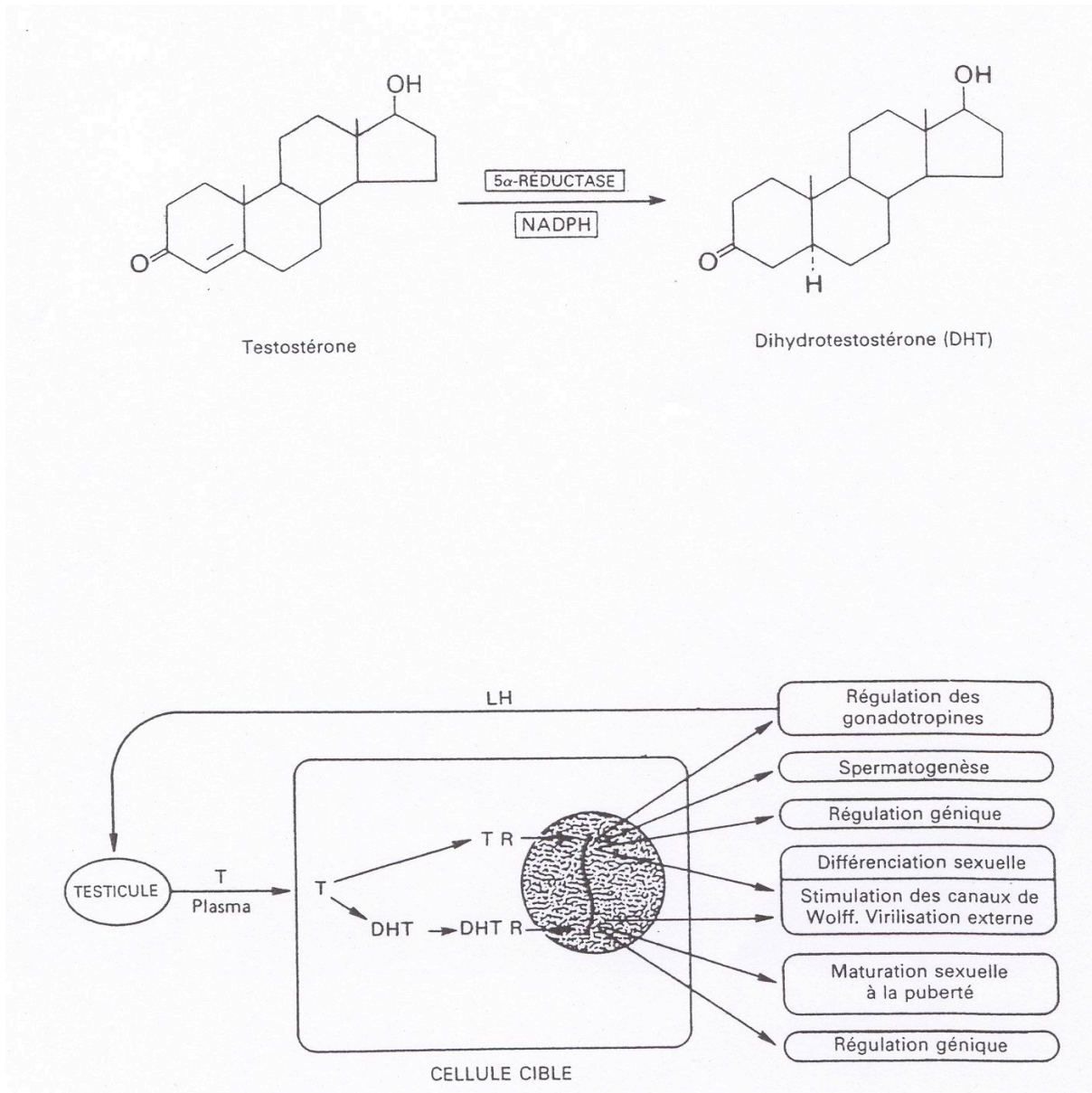
Les stéroïdes liés à ces protéines ont une clairance métabolique très ralentie. À côté de leur rôle de régulateurs des formes libres et liées, CBG et SHBG pourraient également intervenir dans la pénétration transmembranaire des hormones stéroïdes. Le schéma proposé fait d'abord intervenir la liaison de la protéine libre à des sites membranaires ; dans cette situation la globuline pourrait lier les stéroïdes spécifiques et favoriser leurs effets cellulaires. Cette hypothèse a été documentée sur des cellules en culture, en suivant la génération de seconds messagers cellulaires mais non pas les effets biologiques propres des hormones concernées, ce qui limite un peu sa portée. L'hypothèse "classique" reste donc celle d'une diffusion passive des stéroïdes, du fait de leur nature hydrophobe, au travers de la membrane plasmique.

3. MECANISMES D'ACTION DES STÉROÏDES : EFFETS GENOMIQUES



3.1. Séquence des événements d'utilisation cellulaire de la Testostérone

La T sous forme libre traverse la membrane plasmique. Dans certains tissus (muscles, os, rein, cerveau, spermatogonies), c'est la T qui interagit directement avec les récepteurs cellulaires. Dans d'autres cibles (prostate, vésicules séminales, peau), la T est d'abord convertie en DHT par une 5 α -réductase. T et DHT sont reconnues par le même récepteur, mais l'affinité pour la DHT excède celle pour la T. Le complexe Hormone-Récepteur agit au niveau nucléaire, en se fixant à l'ADN dans des zones de chromatine ouverte. T et DHT stimulent faiblement le taux de protéines totales, mais modulent spécifiquement la synthèse de protéines spécifiques. Les deux stéroïdes stimulent aussi la réplication de cellules cibles ; cet effet est sans doute impliqué dans l'hypertrophie bénigne de la prostate, qui peut être traitée par des inhibiteurs de 5 α -réductase.



3.2. Mécanisme général des effets génomiques des stéroïdes

La liaison à l'hormone stéroïde induit un changement conformationnel du récepteur qui se dimérise et se localise majoritairement au niveau du noyau. Ce récepteur activé acquiert la capacité de se lier sélectivement à certains gènes. La fixation fait intervenir une séquence d'ADN dite "élément de réponse à l'hormone", localisée généralement à proximité du promoteur, en région 5' du gène. Le promoteur lie un certain nombre de facteurs de transcription nécessaires à l'accrochage de l'ARN polymérase II. L'élément HRE, quant à lui, module la fréquence d'initiation de la transcription et peut exercer un effet stimulateur ou inhibiteur. La position et l'orientation du HRE dans le gène ont peu d'influence sur la fonction modulatrice de cet élément.

4. MECANISMES D'ACTION DES STÉROÏDES : EFFETS NON-GENOMIQUES

4.1. Introduction

Si les mécanismes moléculaires d'action des stéroïdes sur l'expression génique ont été progressivement élucidés, un certain nombre d'effets cellulaires des stéroïdes ne peuvent être expliqués par ce modèle d'interaction. Il s'agit le plus souvent d'effets stimulants sur l'activation cellulaire (mobilité, exocytose etc.), associés à des flux calciques intra-cellulaires. Ces effets sont dits "non-génomiques" car :

- ils sont trop rapides pour être compatibles avec la synthèse protéique,
- ils sont insensibles aux inhibiteurs généraux de la transcription ou de la traduction des protéines,
- ils sont observés dans des cellules qui n'effectuent pas de synthèse protéique,
- ils peuvent être reproduits avec des conjugués non perméants de stéroïdes, incapables de traverser la membrane plasmique.

Tous ces arguments plaident en faveur de l'existence de récepteurs membranaires aux stéroïdes. Les affinités de ces liaisons de membrane sont généralement modestes (10^{-6} M), bien que des sites de haute affinité (10^{-9} M) aient été décrits dans certains cas. Certaines protéines de liaison ont été mises en évidence, mais ces récepteurs attendent encore une caractérisation moléculaire précise.

4.2. Exemples d'effets non génomiques des stéroïdes

Sur des spermatozoïdes, E2 stimule la mobilité et la consommation d'oxygène. Un récepteur membranaire de haute affinité a été mis en évidence.

Mais, ce sont les effets stimulants de P sur les spermatozoïdes qui ont été les plus étudiés. Les actions membranaires de P se produisent dans une gamme de concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-6} M. P stimule la mobilité et le pourcentage de sptz hyperactivés et, à hautes concentrations, provoque l'exocytose acrosomique et la liaison à la zone pellucide. Il y aurait une relation directe entre la concentration de P dans le liquide folliculaire et la capacité de ce dernier à initier la RA. P provoque d'abord un influx de Ca^{++} extra-cellulaire, de quelques secondes, puis une cascade d'événements intracellulaires conduisant à la mobilisation calcique tardive (5 à 10 min.), à partir de l'acrosome.

4.3. Mécanismes moléculaires d'action de la Progestérone sur les spermatozoïdes

La liaison de P nécessite un événement préalable : la libération de P de la protéine transporteuse, la CBG, permettant d'obtenir de hautes concentrations locales de P libre. Cette étape serait réalisée par "l'acrosine", activité protéolytique de la surface du spermatozoïde. Les sites récepteurs membranaires de P ont été mis en évidence à l'aide de conjugués fluorescents non perméants. Ils apparaissent majoritairement localisés à la tête du sptz, concentrés à la jonction tête/acrosome.

En conclusion, les effets non génomiques des stéroïdes semblent mettre en jeu des complexes multi-récepteurs, déclenchant des cascades de signalisation assez voisines de celles décrites pour les hormones peptidiques. Les implications physiologiques de ces mécanismes sont sans doute importantes. Ainsi, certaines situations d'infertilité inexplicée ou d'oligospermie ont été associées à un défaut de liaison de P à la surface des spermatozoïdes et de l'influx calcique secondaire.

Références

- Baldi E., Krausz C. and Forti G. 1995 Nongenomic actions of Progesterone on human spermatozoa, Trends Endocrinol. Metab. 6 : 198-205
- Revelli a., Massorbio M. and Tesarik J. 1998 Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues, Endocrine Reviews 19 : 3-17.

INHIBINE ET HORMONE ANTIMULLERIENNE

Docteur Monique PLANTAVID

Laboratoire de Biochimie III, CHU, La Grave, Toulouse

1. INHIBINES

1.1. Rappel sur la structure

Les **inhibines** sont une famille d'hormones glycoprotéiques hétérodimériques constituées de l'association de 2 sous-unités α et β (β_B dans le cas de l'inhibine B) liées par un pont disulfure et appartenant comme l'**AMH** (hormone anti-mullérienne) à la famille du **TGF- β** :

Inhibine A $\alpha \beta_A$

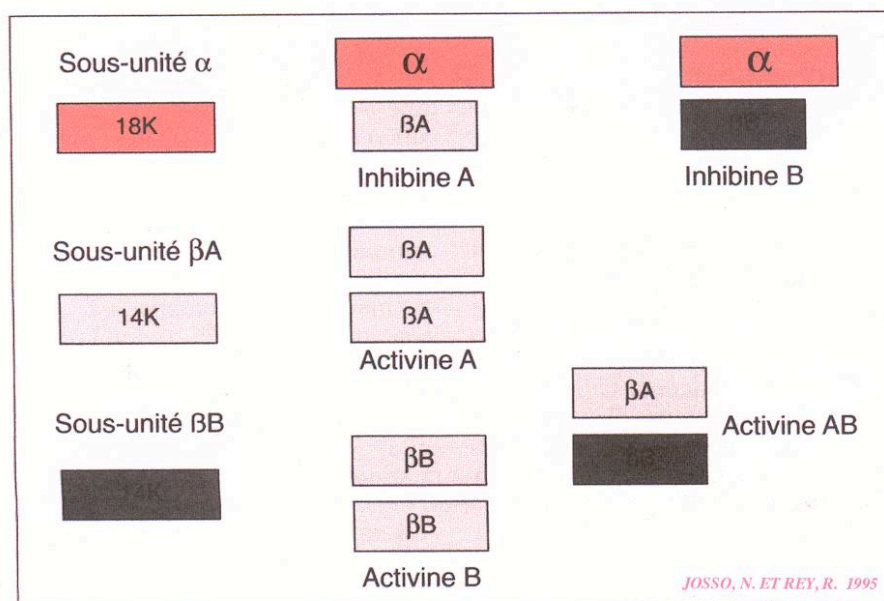
Inhibine B $\alpha \beta_B$

Activine A $\beta_A \beta_A$

Activine B $\beta_B \beta_B$

Activine AB $\beta_A \beta_B$

STRUCTURE DES INHIBINES ET ACTIVINES



1.2. Physiologie chez l'homme

L'inhibine B est sécrétée par **les cellules de Sertoli**, chez l'adulte C'est la forme d'inhibine importante physiologiquement.

Dans le sérum, la concentration d'inhibine B, élevée au cours de la première année de vie, diminue ensuite pour **s'élever au moment de la puberté**. Chez le fœtus, les cellules de Leydig pourraient en synthétiser, de même que certaines cellules de la spermatogénèse.

La sécrétion d'inhibine B est sous la dépendance de la FSH et l'inhibine B exerce un fort rétrocontrôle négatif sur la synthèse de FSH.

1.3. Méthode de dosage Inhibine B

Dosage ELISA avec micropuits recouverts d'**anticorps anti-βB (anticorps de capture)**. L'addition des sérums et des standards est suivi d'un premier lavage puis le deuxième **anticorps anti- α** est ajouté. Ce deuxième anticorps est **couplé à la phosphatase alcaline**. L'anticorps en excès est éliminé par lavage et l'addition du substrat de la phosphatase permet ensuite la réaction colorimétrique, le produit de cette réaction étant rouge. Mesure de la DO à 490 nm . Cette coloration est directement proportionnelle à la concentration d'inhibine B dans l'échantillon.

Valeurs attendues :

Homme adulte : m=182 pg/ml (80-232)

1.4. Intérêt du dosage chez le jeune garçon, pour explorer la puberté

L'inhibine B augmente très précocement durant la puberté. Dès le stade II, les taux sont comparables à ceux de l'âge adulte.

1.5. Intérêt du dosage chez l'homme azoosperme

Excepté dans l'hypogonadisme hypogonadotrophique, il existerait une relation inverse entre FSH et Inhibine B et une corrélation positive entre le nombre de spermatozoïdes et le taux d'inhibine B.

Produite par les **cellules de Sertoli**. Marqueur de la fonction sertolienne et de la spermatogénèse.

Inhibine B basse dans les azoospermies sécrétoires avec FSH élevée. Serait plus sensible que la FSH dans ces pathologies. Des taux très bas indiquent une absence de production de spermatozoïdes ou une production négligeable.

Pour certains auteurs, **l'inhibine B** permet de prédire le succès d'une biopsie testiculaire au seuil de 53 pg/ml. D'où la nécessité d'introduire le dosage d'inhibine B dans l'arbre décisionnel de la réalisation d'une biopsie testiculaire en vue de FIV/ICSI

2. HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE (AMH)

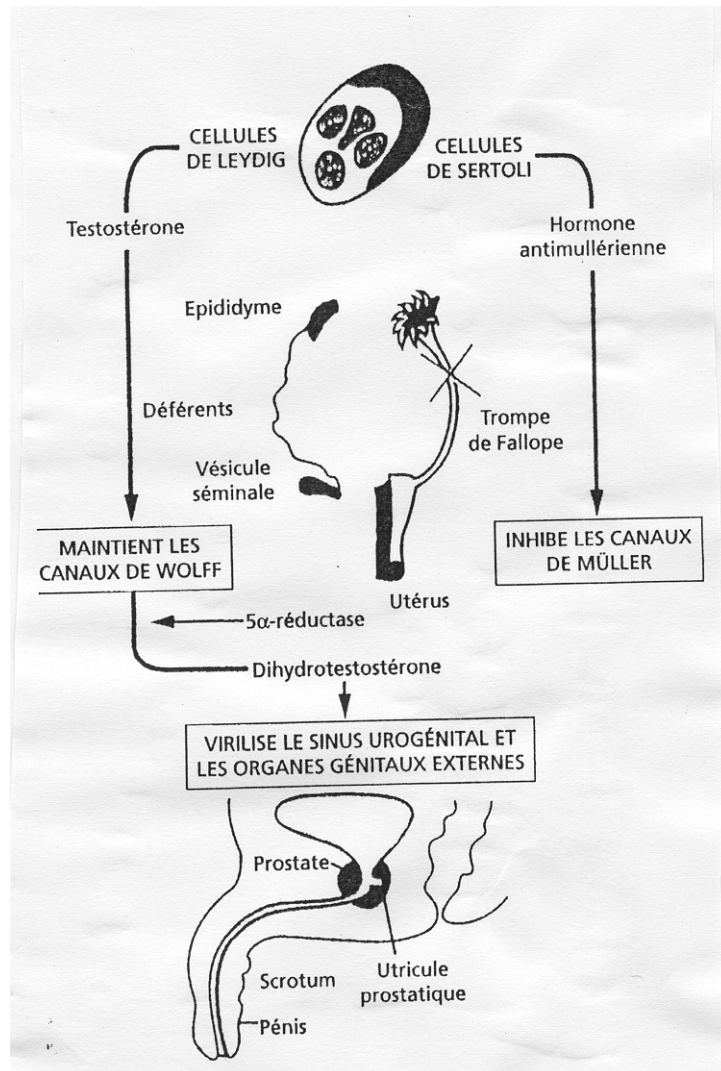
AMH : Glycoprotéine homodimérique, formée de 2 sous-unités de 70 kDa liées par des ponts disulfure. **Elle appartient à la famille du TGFβ qui comprend également les inhibines et activines.**

Au cours du **développement fœtal**, les gonades primitives ont une double potentialité avec coexistence à la fois

-des **canaux de Müller**, précurseurs de l'utérus, des trompes et de la partie supérieure du vagin

-et des canaux de Wolff, précurseurs de l'épididyme, des canaux déférents et des vésicules séminales.

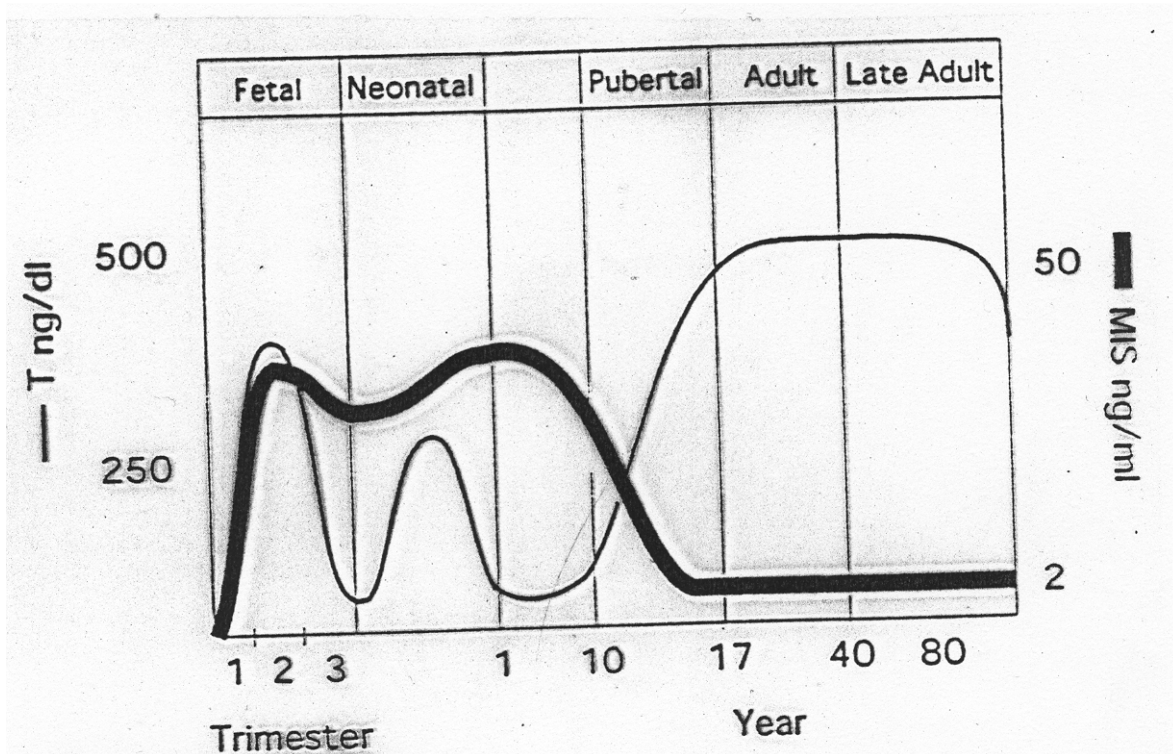
Chez le fœtus mâle, l'AMH est sécrétée par **les cellules de Sertoli dès la 7^{ème} semaine de vie in-utero** et va entraîner la **régression des canaux de Müller**. La **testostérone** sera responsable de la persistance des canaux de Wolff et de la virilisation des organes génitaux externes.



AMH

Après la naissance du garçon, il y a augmentation des taux d'AMH au cours de la première année

Pendant la Puberté, CORRELATION INVERSE entre TESTOSTERONE et AMH.



Dosage de AMH :

Chez jeune garçon présentant une **cryptorchidie bilatérale** (*distinguo* avec anorchidie)

Exploration **d'ambiguïtés sexuelles chez l'enfant**, avec dosage de testostérone.

Chez l'homme, dans le plasma séminal : permet dans les **azoospermies non-obstructives** de savoir s'il y a production très partiellement conservée de spermatozoïdes

FACTEURS DE REGULATION DE LA SPERMATOGENESE

*Docteur Roger MIEUSSET
Centre de Stérilité Masculine, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse*

1. INTRODUCTION

La fonction gamétogène mâle ou spermatogenèse se déroule dans les testicules, à l'intérieur des tubules séminifères. Chaque tubule (1) est circonscrit par une paroi propre, la 'gaine péri tubulaire', (2) renferme l'épithélium séminifère, constitué par les cellules de la lignée germinale et de Sertoli, (3) est centré par une lumière.

Les espaces intertubulaires, subdivisés en territoires distincts, contiennent les cellules de Leydig, spécifiques du testicule, qui forment la 'glande interstitielle', support d'une activité uniquement endocrinienne : la stéroïdogénèse. On y trouve aussi les capillaires sanguins et lymphatiques, les terminaisons nerveuses et diverses cellules libres non spécifiques du testicule, telles que les macrophages ou mastocytes susceptibles de participer aux régulations intra gonadiques.

Les échanges entre les tubules séminifères (compartiment tubulaire) et les espaces interstitiels (compartiment interstitiel) sont en partie sous le contrôle de la barrière hémato-testiculaire interposée entre l'épithélium séminifère et le sang. La barrière est composée successivement par la paroi des capillaires sanguins, les cellules myoïdes pérítubulaires, la membrane basale de la gaine pérítubulaire et un système de jonctions serrées disposées entre les faces latérales des cellules de Sertoli. Les jonctions serrées divisent la paroi de l'épithélium séminifère en deux compartiments distincts : basal et adluminal. A l'exception des spermatogonies et des spermatoctes pré méiotiques, localisés dans le compartiment basal, tous les autres éléments de la lignée germinale sont groupés dans le compartiment adluminal et sont, de ce fait, entièrement dépendants de l'activité fonctionnelle des cellules de Sertoli.

Un double contrôle s'exerce sur les fonctions testiculaires : d'une part un contrôle neuro endocrine par l'intermédiaire des gonadotrophines hypophysaires et d'autre part une régulation locale paracrine résultant des interactions cellulaires intra gonadiques. En dehors de ce double contrôle, qui est essentiellement de nature hormonale, que ce soit la régulation endocrine ou paracrine, il existe d'autres processus physiologiques qui sont de puissants facteurs de contrôle de la spermatogenèse : la vascularisation testiculaire d'une part et la régulation thermique du testicule d'autre part .

2. CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES DE LA SPERMATOGENESE

2.1. Cycle de la spermatogenèse et cycle de l'épithélium séminifère.

Les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides sont les trois types de cellules germinales impliquées dans la spermatogenèse. A chacune d'entre elles correspond une phase du processus spermatogénétique : renouvellement cellulaire, méiose, et différenciation terminale. L'évolution spatio-temporelle de la lignée germinale se déroule au sein de l'épithélium séminifère. Elle est caractéristique d'une espèce donnée. Le cycle spermatogénétique se définit par le temps qui s'écoule entre la première division de spermatogonie entrant en méiose et la spermiation, libération des spermatozoïdes dans la lumière du tubule. Ce temps, qui est constitué de la succession chronologique des différents stades de maturation de la même génération de cellules germinales, est de l'ordre de 74 jours chez l'homme. [Une génération est l'ensemble des cellules germinales reliées par des ponts cytoplasmiques qui proviennent toutes d'une spermatogonie Ap (groupe cellulaire isogénique).] Dans l'épithélium séminifère, sur une coupe transversale, les différentes générations de cellules germinales superposées forment six types d'associations cellulaires de composition constante, encore dénommées stades de l'épithélium séminifère. La succession des six stades en un point donné du tube séminifère correspond au cycle de l'épithélium séminifère dont la durée dans l'espèce humaine est de 16 jours.

[Rappel sur les déplacements cellulaires au sein de l'épithélium séminifère : les cellules germinales vont se déplacer ou plutôt être déplacées du pôle basal à la lumière du tubule dans les espaces intersertoliens ; ces déplacements cellulaires se font dans le sens transversal du tubule ; il n'existe aucun déplacement qui soit longitudinal à l'exception du repeuplement de l'épithélium par ces cellules souches après destruction de toutes les autres cellules germinales].

2.2. Spermatogonies et renouvellement cellulaire

Trois populations de spermatogonies caractéristiques de l'adulte sont identifiables dans les tubes séminifères : les spermatogonies de type Ad (d = dark), de type Ap (p = pale) et de type B. [Les spermatogonies appartenant à un groupe homogène de cellules souches de la même génération sont connectées par des ponts inter-cellulaires qui persisteront entre les cellules filles, au cours de la spermatogenèse.]

La prolifération de cellules germinales, continue durant toute la période adulte, nécessite la multiplication des cellules Ap, mais aussi le maintien constant du pool des cellules Ad considérées comme des cellules de réserve. Les spermatogonies Ad sont quiescentes et ne deviennent actives que lorsque le nombre des autres cellules germinales est inférieur à un certain seuil. Les spermatogonies B proviennent de la division des spermatogonies Ap. La durée de vie moyenne est de 18 jours pour les spermatogonies Ap et de 9 jours pour les spermatogonies B. [Cependant, la prolifération cellulaire est contre-balançée par l'apoptose qui affecte un nombre appréciable de spermatogonies et qui de ce fait intervient dans le développement et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium séminifère.]

2.3. Spermatocytes et méiose.

Issus de la division des spermatogonies B, les spermatocytes de premier ordre (SPCI) restent en interphase pendant deux à quatre jours au cours desquels leur taille s'accroît notablement. L'ultime synthèse de l'ADN, qui a pour effet de doubler la quantité d'ADN (4C), et la replication des filaments chromosomiques ont lieu juste avant le début de la première division (stade préleptotène). Au cours de la prophase qui dure environ 23 jours chez l'homme, la cellule passe par cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse, caractérisés par la présence dans le noyau de chromosomes à différentes étapes du processus de spiralisation.

La première division conduit à la séparation des chromosomes paternels et maternels appariés et à la formation de spermatocytes de deuxième ordre (SPCII) haploïdes, contenant une quantité d'ADN réduite de moitié (2C). Chaque chromosome est alors formé de deux chromatides.

Au terme d'une interphase brève (environ un jour), les SPCII se divisent à leur tour pour donner naissance aux spermatides, deuxième génération de cellule haploïdes. Le contenu en ADN y est deux fois moins élevé (1C) et chaque cellule fille reçoit une chromatide.

Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'entrée en méiose des spermatocytes (transition G2-M du cycle cellulaire) n'est pas élucidé. Plusieurs membres de la famille des cdk (cycline-kinases cycline dépendantes) sont exprimées dans la lignée germinale mâle, non seulement dans les spermatogonies, mais aussi dans les spermatocytes et les spermatides, suggérant leur intervention à la fois durant les divisions cellulaires et la différenciation.

La malségrégation des chromosomes à la métaphase I, ou la non disjonction à la métaphase II conduit souvent à la mortalité embryonnaire ou à des syndromes comme le syndrome de Down.

2.4. Spermatides et spermiogenèse.

Les différentes étapes de la métamorphose des spermatides en spermatozoïdes constituent la spermiogenèse dont la durée chez l'homme est de l'ordre de 23 jours. En fonction des caractéristiques nucléaires, on distingue 3 familles de spermatides :

- les jeunes spermatides avec un noyau rond ;
- les spermatides intermédiaires avec un noyau en élongation et en cours de condensation ;
- les spermatides matures avec un noyau condensé.

Des transformations majeures des structures nucléaires et cytoplasmiques se poursuivent durant la spermiogenèse en dépit de l'arrêt de la transcription dans les spermatides intermédiaires. L'acquisition de la forme définitive du noyau, les modifications de la composition et de la condensation de la chromatine, le développement du système acrosomique et la formation du flagelle confèrent au spermatozoïde la capacité d'assurer la transmission du génome paternel à l'ovocyte au moment de la fécondation. Toutes ces transformations s'effectuent de manière concomitante et surviennent dès le début de la spermiogenèse.

Les remaniements nucléaires sont l'une des caractéristiques de la spermiogenèse. Les changements structuraux de la chromatine sont concomitants des modifications biochimiques des nucléoprotéines basiques. Les histones de type somatique et leurs variants testiculaires – spécifiques, présents dans les stades précoces de la spermiogenèse, sont remplacées par deux protéines de transition (TP1 et TP2) qui sont à leur tour déplacées par les protamines (familles P1 et P2) riches en résidus cystéine. L'interaction inter et intra – protamines due à la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéine favorise la compaction de l'ADN. De nombreux travaux ont montré la relation entre l'état de condensation de la chromatine des spermatozoïdes éjaculés et la fertilité masculine. Ils ont été à l'origine de la mise au point de diverses méthodes d'évaluation de la qualité nucléaire au cours de l'exploration de l'homme infécond.

L'hypothèse suivant laquelle les spermatides haploïdes matures sont fonctionnellement équivalentes paraît étayée par deux ordres de faits. Premièrement, certains des ARNms et des protéines qui sont synthétisés dans les cellules préméiotiques sont codés par les deux génomes parentaux. Ils seront ensuite distribués dans les spermatides où ils ne seront soumis qu'au contrôle post – transcriptionnel ou post – traductionnel. Deuxièmement, des transcrits et des protéines sont mis en commun entre les spermatides, du fait de leur passage à travers les ponts cytoplasmiques qui persistent jusqu'à la spermiation. Ceci a été établi chez la souris pour les transcrits de la protamine 1, et pour une protéine majeure de la gaine fibreuse du spermatozoïde codée par le gène AKAP82 localisé sur le chromosome X et dont l'expression est exclusivement post méiotique.

3. CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DE LA SPERMATOGENESE

3.1. Diversité et spécificité des gènes exprimés dans la lignée germinale.

Les gènes exprimés durant la spermatogenèse codent pour les protéines spécifiques impliquées dans les structures et/ou les fonctions des cellules germinales. Ils peuvent être regroupés en trois catégories : les gènes testicule – spécifiques , ceux codant pour des isozymes ou des isoformes testiculaires – spécifiques et enfin ceux dont l'expression est modifiée dans le testicule.

3.1.1 Les gènes testicule – spécifiques.

Ils codent pour les protéines constitutives du complexe synaptonémal, des protéines majeures (Odf) qui entrent dans la composition des fibres denses externes de la queue du spermatozoïde, ou les protéines de transition et les protamines synthétisées dans les cellules haploïdes au cours de la spermiogenèse.

3.1.2 Les gènes codant pour des isozymes ou des isoformes testiculaires – spécifiques.

Les gènes appartenant à cette catégorie sont distincts des gènes homologues qui s'expriment dans les cellules somatiques. Ainsi, le gène autosomique codant pour la phosphoglycérate kinase 2 ne s'exprime que dans les cellules germinales, alors que le gène localisé sur le chromosome X et codant pour la phosphoglycérate kinase 1 est actif dans les autres organes.

3.1.3 Les gènes dont l'expression est modifiée dans le testicule.

L'expression alternative d'un même gène peut s'effectuer dans le testicule suivant plusieurs mécanismes :

- présence de promoteurs distincts (exemple : enzyme de conversion de l'angiotensine) ;
- épissage d'exons (exemple : la protéine tronquée – CREB – AMPc Responsive Element Binding Protein-) ;
- polyadénylation différente des ARNm (exemple : oncoprotéine c – alb).

L'expression du génome haploïde dans les jeunes spermatides est une caractéristique de la lignée germinale mâle. Outre les protéines nucléaires, sont exprimés un certain nombre de gènes codant pour des protéines cytoplasmiques telles que des isoenzymes acrosomiaux ou des isotopes de l'actine et de la tubuline.

Des transcrits spécifiques de proto – oncogènes sont exprimés de façon séquentielle aux stades pré méiotique, méiotique et post méiotique de la spermatogenèse. Leurs produits appartiennent à la famille des protéines kinases, aux protéines de liaison au GTP, aux facteurs de transcription nucléaire et à la famille Wnt (protéines d'adhésivité cellulaire).

3.2. Contrôle de l'expression des gènes au cours de la spermatogenèse.

Ce contrôle s'exerce au niveau transcriptionnel, traductionnel et post – traductionnel. La transcription des gènes est régulée par la liaison de facteurs de transcription à des séquences d'ADN localisées dans la région du promoteur des gènes. Les protéines CREB et CREMt (« cAMP Responsive Element Modulator ») sont des activateurs de transcription qui se lient à des séquences CRE (cAMP Responsive Element) présentes dans les promoteurs des gènes cibles de l'AMPc. Une réduction significative de la protéine CREMt dans les spermatides rondes est associée à des troubles de la maturation des spermatides dans certains cas d'infertilité idiopathique.

Le contrôle de la traduction des ARNm transcrits s'effectue soit par déadénylation de la queue polyA, soit par l'interaction avec des protéines de liaison à l'ARN qui ont pour effet de déclencher ou d'inhiber la traduction dans les spermatides. Plusieurs protéines de liaison à l'ARN ont été identifiées dans le testicule. Parmi celles-ci, les protéines codées par les gènes RBM et DAZ qui sont localisées sur le bras long du chromosome Y méritent une attention particulière. En effet, ces gènes sont souvent délétés chez les patients oligo ou azoospermiques.

La synthèse des protéines constitutives des structures cytoplasmiques du spermatozoïde a lieu tout au long de la spermatogenèse. Ainsi, le spermatozoïde est l'aboutissement d'une évolution programmée et séquentielle qui se poursuit tout au long de la spermatogenèse.

Les protéines nouvellement synthétisées peuvent être remaniées du fait de modifications post-traductionnelles. Tel est le cas des protamines de la famille P2 qui sont élaborées sous la forme d'un long précurseur (protamine) qu'un processus de maturation protéolytique convertit en protamine HP2, HP3 et HP4.

Le catabolisme des protéines néo-synthétisées implique la mise en jeu d'un processus de protéolyse. « L'ubiquitination » des protéines par liaison à l'ubiquitine est un préalable à leur destruction sélective par une protéase. Le système ubiquitine est présent dans les cellules spermatogénétiques. L'inactivation du gène codant pour un enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (mHR6B) se traduit par une stérilité chez la souris mâle, à l'exclusion de toute autre anomalie phénotypique.

4. CONTROLE ENDOCRINE DE LA SPERMATOGENESE

4.1. Organisation générale.

Le contrôle hormonal des fonctions testiculaires est assuré par les gonadotrophines hypophysaires. L'hormone lutéinisante (LH) a pour cible les cellules de Leydig et stimule la production des stéroïdes sexuels. L'hormone folliculo-stimulante (FSH) en association avec la testostérone agit sur les tubes séminifères par l'intermédiaire des cellules de Sertoli pour assurer l'initiation et le maintien de la spermatogenèse.

La sécrétion des deux gonadotrophines, élaborées conjointement par les cellules gonadotropes des lobes antérieur et tubéral de l'adénohypophyse, est contrôlée par un décapeptide d'origine hypothalamique, le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Ce peptide, de sécrétion pulsatile (période de 15 à 30 minutes) et de demi-vie courte (4 minutes), est synthétisé dans les neurones à GnRH localisés dans les noyaux arqués et pré optiques de l'hypothalamus médio-basal. Transporté dans l'adénohypophyse par le système porte-hypothalamo-hypophysaire, le GnRH se fixe sur les récepteurs membranaires spécifiques des cellules gonadotropes. L'activité sécrétoire des neurones à GnRH est modulée non seulement par les hormones sexuelles, mais aussi par des neuropeptides (POMC) et des neurotransmetteurs comme le N-Méthyl-D-aspartate, le glutamate ou l'acide γ -aminobutyrique. Il faut souligner que les androgènes aromatisables (testostérone), ou non aromatisable (dihydrotestostérone) agissent sur l'hypophyse en diminuant la fréquence des décharges de LH.

4.2. LH et stéroïdogénèse

La LH est une glycoprotéine formée de deux sous unités, une sous unité α qui est identique pour la LH, la FSH, la Thyrotropine (TSH) et la choriogonadotropine humaine (hCG), et une sous unité β qui est spécifique pour chaque hormone. La choriogonadotropine humaine (hCG) est élaborée par le

syncytiotrophoblaste placentaire et se différencie de la LH par sa demi-vie beaucoup plus longue. LH et hCG stimulent la production des stéroïdes par les cellules de Leydig, en se liant au même récepteur membranaire. La liaison de LH/hCG à son récepteur a pour effet d'activer les enzymes impliquées dans les stéroïdogénèse. Cet effet est rapide (aigu) puisqu'il survient dans les 2 à 3 minutes suivant la fixation de LH à son récepteur. Plusieurs voies de transduction peuvent être mises en jeu : voie de l'adénylcyclase (AMPC), voie de la phospholipase A2 (acide arachidonique) ou voie de la phospholipase C (calcium). La LH a aussi des effets chroniques sur la cellule de Leydig : expression et maintien des fonctions différenciées de la cellule de Leydig, par exemple les récepteurs à la LH et les enzymes de la stéroïdogénèse.

Aux doses pharmacologiques, la LH ou hCG provoque une désensibilisation de la cellule de Leydig, c'est-à-dire une diminution de la sensibilité à LH. Par ailleurs, FSH, PRL et GH ont des effets sur la cellule de Leydig : ils augmentent l'expression du nombre de récepteurs à la LH.

L'action de LH sur la cellule de Leydig permet le maintien d'une concentration élevée de stéroïdes dans les tubes séminifères. Des récepteurs aux androgènes sont présents dans les cellules de Leydig, les cellules myoïdes périvitubulaires et les cellules de Sertoli. L'existence de ces récepteurs dans les cellules germinales n'est pas établie avec certitude. Il est vraisemblable que les effets de la testostérone sur la spermatogenèse s'exercent par l'intermédiaire des cellules somatiques du tube séminifère.

Dans les conditions physiologiques, les stéroïdes androgéniques et oestrogéniques stimulent la synthèse de FSH et de LH et inhibent leur libération induite par le GnRH.

4.3. FSH et cellule de Sertoli.

La cellule de Sertoli, cellule cible de la FSH, possède des récepteurs spécifiques, structurellement semblables à ceux de LH. La voie de transduction du signal à partir du récepteur de FSH s'effectue par l'intermédiaire de l'AMPC et de la protéine kinase A dont l'activation permet la phosphorylation de la protéine CREB. Comme dans le cas de l'action de la LH, le mécanisme de transduction n'est pas unique. Par exemple, le taux de calcium intra cellulaire, dont le flux est contrôlé par la FSH, module en retour les effets de la FSH.

L'action de FSH sur la cellule de Sertoli est essentielle pour l'initiation de la spermatogenèse à la puberté. Dans les périodes pré natale et pré pubertaire, la FSH a des effets mitogènes sur les cellules de Sertoli : cette prolifération des cellules de Sertoli est importante pour la fertilité future, puisque :

- c'est le nombre de cellules de Sertoli qui détermine la longueur de l'épithélium séminifère, et donc sa capacité numérique à produire des spermatozoïdes ;
- les cellules de Sertoli ne se divisent plus à partir de la puberté.

La FSH a, en outre, une action morphogénétique qui est nécessaire à l'acquisition de la maturité fonctionnelle des cellules de Sertoli. Enfin, chez l'adulte, les effets mitogènes de la FSH s'exercent sur les SPG dont elle favorise la multiplication (la FSH est l'un des régulateurs potentiel de la phase de

renouvellement des SPG). Parmi les nombreuses protéines synthétisées et sécrétées par les cellules de Sertoli, deux protéines sont impliquées directement dans le contrôle hormonal du tube séminifère :

- La première est l'inhibine, un hétérodimère glycoprotéique formé de deux sous unités associées par des ponts di sulfures, α et β , cette dernière existant en deux variantes β A et β B. L'inhibine A ($\alpha\beta$ A) sécrétée par les cellules de Sertoli (et dans une moindre mesure, par les cellules de Leydig,) ; elle inhibe la biosynthèse et la sécrétion de FSH par les cellules gonadotropes, et elle potentialise les effets de la LH sur la production d'androgènes. De nombreuses données expérimentales indiquent que l'inhibine agit conjointement avec les androgènes pour réguler négativement la sécrétion de FSH chez le mâle pré pubère et adulte.
- L'association de sous unités β différentes ou identiques constitue les activines qui stimulent la production de FSH par les cellules hypophysaires et qui s'opposent à l'effet de LH sur la stéroïdogénèse. Elles inhibent par ailleurs la sécrétion basale d'ACTH et de GH. Enfin, elles ont un rôle actif dans l'érythropoïèse, et un rôle d'inducteur du mésenchyme pendant la vie embryonnaire.

Sous l'influence de la FSH et de la testostérone, la cellule de Sertoli élabore une autre protéine essentielle pour l'action des androgènes : l'«Androgen Binding Protein» (ABP). Cette protéine de 40 kDa possède une grande affinité pour la testostérone et la dihydrostérone, permettant ainsi l'obtention de concentrations intra testiculaires au-dessus de leur limite de solubilité. Au-delà du testicule, elle assure le transport des androgènes vers l'épididyme.

La FSH intervient indirectement sur le métabolisme des stéroïdes dans la cellule de Sertoli par l'activation de certaines enzymes spécifiques : la 17β oxydo-réductase (conversion de l'androsténone en testostérone) , la 5α -réductase (conversion de la testostérone en dihydro testostérone) et l'aromatase (conversion de la testostérone en oestradiol dans certaines conditions expérimentales chez le rat).

4.4. FSH, androgènes et spermatogenèse.

D'une façon générale, les gonadotrophines et les androgènes jouent un rôle essentiel dans la survie des cellules germinales, grâce à leur action anti-apoptotique.

Les besoins en FSH et en testostérone lors de l'initiation de la spermatogenèse à la puberté, de son maintien ou de sa restauration chez l'adulte ne sont pas de même nature. Chez le sujet pré pubère, bien que la testostérone seule soit capable d'initier la spermatogenèse, l'adjonction de FSH permet à la lignée germinale d'aller au terme de son évolution. Chez l'adulte, la spermatogenèse est entièrement dépendante de LH/testostérone. Cependant, la récupération quantitative de la spermatogenèse nécessite aussi de la FSH.

La concentration intra testiculaire de testostérone (de l'ordre de $0,1\ \mu\text{mol/l}$) est beaucoup plus élevée que ne le nécessite la saturation des récepteurs des androgènes. Elle reste indispensable pour le déroulement de la spermatogenèse. Chez le rat hypophysectomisé, le maintien d'une spermatogenèse

qualitativement normale est obtenu par injection de testostérone, à condition que la concentration atteinte dans le testicule soit aussi élevée que chez le rat normal.

Des observations récentes tendent à minimiser le rôle de la FSH dans l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. En effet, chez la souris mâle déficiente en FSH, après knock out du gène FSH β , et chez des hommes homozygotes pour une mutation inactivatrice du gène codant pour le récepteur de FSH, toutes les étapes de la spermatogenèse sont réalisées. Mais la production des spermatozoïdes est notablement diminuée.

4.5. Rôle des autres hormones sur la spermatogenèse.

D'autres hormones circulantes peuvent participer à la régulation des fonctions testiculaires. En effet, les pathologies des systèmes endocriniens sont souvent associées à des altérations de la spermatogenèse. La prolactine (PRL) paraît jouer un rôle favorable sur la stéroïdogénèse chez le rat. Cependant, chez l'homme, l'hyperprolactinémie provoque une diminution de sécrétion de la testostérone et une impuissance dues en grande partie à une inhibition des pulses de GnRH.

Les cellules de Leydig possèdent des récepteurs à l'insuline. Celle-ci a pour effet d'augmenter la stéroïdogénèse basale et stimulée par LH. Le manque d'insuline pourrait être responsable des altérations des fonctions testiculaires observées chez certains diabétiques.

Les récepteurs à l'hormone de croissance (GH) n'ont pas été mis en évidence sur les cellules de Leydig, de sorte que l'action stimulante de cette hormone sur la stéroïdogénèse est indirecte et sans doute médiée par IGF1.

Les glucocorticoïdes en provenance de la cortico-surrénale contribuent à la régulation endocrine du testicule. Les cellules de Leydig possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes et ces hormones diminuent la conversion du cholestérol en hormones stéroïdes.

5. REGULATION DES ECHANGES ENTRE INTERIEUR ET EXTERIEUR DU TUBULE SEMINIFERE : LA BARRIERE HEMATO TESTICULAIRE.

La barrière hémato testiculaire est constituée successivement par la paroi des capillaires sanguins (dont l'endothélium est continu), les cellules myoïdes péritubulaires, la membrane basale de la gaine péritubulaire et un système de jonctions serrées disposées entre les faces « latérales » des cellules de Sertoli et appartenant à un complexe jonctionnel. Ce complexe jonctionnel est constitué par la coexistence de 3 types successifs de jonctions (à partir du pôle basal de la cellule) :

- Jonctions serrées, ou étroites, ou oclusives (tight junctions ; zonula occludens), mises en place à la puberté ; caractéristiques : espace inter cellulaire (i.e. entre les feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules de Sertoli contiguës) est nul : aucune circulation possible de quelque substance que ce soit entre ces deux cellules de Sertoli.. Ces jonctions serrées divisent la paroi de l'épithélium séminifère en deux compartiments distincts : basal et adluminal. A l'exception des spermatogonies et des spermatoocytes pré méiotiques, localisés dans le compartiment basal, tous

les autres éléments de la lignée germinale sont groupés dans le compartiment adluminal et sont, de ce fait, entièrement dépendants de l'activité fonctionnelle des cellules de Sertoli.

- Jonctions lacunaires (gap junction ; nexus) : constituées de 6 connexons créant un canal central permettant le seul passage de substance de poids moléculaire inférieur à d'une cellule de Sertoli à sa voisine ; cette jonction communicante qui permet le passage d'informations entre deux cellules de Sertoli est importante dans cette région du complexe jonctionnel puisqu'elle va permettre la synchronisation du démantèlement et de la construction des jonctions serrées à chaque entrée en spermatogenèse d'une SPG.
- Jonctions adhérentes, ou d'ancrage (zonula adhaerens) qui assurent l'accrochage d'une cellule germinale sur sa voisine ; l'espace inter cellulaire est de 10 nm. Leur présence serait indispensable à la mise en place des deux autres types de jonction du complexe.

En conclusion : sur la membrane de cellules de Sertoli, les jonctions apparaissent selon une séquence spatio-temporelle définie de sorte que le type de jonction formée influence la formation du type de jonction suivante ; la formation et le démantèlement des jonctions occlusives doivent s'effectuer en coordination étroite avec la division et différenciation des cellules germinales dont le développement chronologique est associé à une migration spatiale au sein de l'épithélium séminifère, de la base vers la lumière du tubule séminifère.

Les fonctions de la barrière sertolienne sont les suivantes :

- établissement et maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère avec 2 compartiments basal et adluminal ;
- répartition en 2 domaines distincts (basal et adluminal) de certains constituants membranaires (récepteur à FSH) et cytoplasmique (noyau, golgi) ;
- polarisation de certaines des sécrétions de la cellule de Sertoli (transferrine, inhibine, ABP) ;
- constitution d'un micro environnement indispensable à la méiose et à la différenciation des cellules haploïdes (cellules germinales du compartiment ad luminal).

La barrière hémato testiculaire est en fait une barrière établie entre les éléments apportés ou véhiculés par le sang et la lymphe d'une part, et les cellules germinales méiotiques et post méiotiques d'autre part.

Elle est un élément fondamental des échanges qui surviennent entre

- d'une part l'extérieur du tubule séminifère, espace interstitiel avec cellules de Leydig, macrophages et éléments vasculaires, et l'intérieur du tubule séminifère, avec les cellules de Sertoli et les différents types de cellules germinales
- d'autre part, les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

Ces échanges, qui ne sont pas limités pas à des interactions cellulaires intra gonadiques, sont de types nutritionnels, environnementaux, et régulateurs. Mais ces échanges peuvent être aussi de type négatif, dans la mesure où la barrière peut laisser le passage à des molécules exogènes (de synthèse ou

naturelles) pouvant interférer de façon irréversible avec la spermatogenèse, que ce soit par effet direct sur les divisions et différenciations des cellules germinales, ou par l'intermédiaire des cellules de Sertoli.

6. REGULATION PARACRINE ET AUTOCHRINE DE LA SPERMATOGENESE

6.1. Définitions et modalités des interactions cellulaires intra gonadiques.

Les interactions cellulaires intra testiculaires sont multiples. Elles peuvent cependant être regroupées en trois grandes catégories :

- les interactions environnementales qui se définissent comme des interactions qui influencent l'environnement de la cellule pour en affecter ses contacts et son architecture cytoplasmique ; elles impliquent les composants de la matrice extra cellulaire, et les molécules d'adhésivité cellulaire ;
- les interactions nutritionnelles définies comme des interactions impliquées dans la fourniture, l'approvisionnement entre cellules des nutriments essentiels aux cellules ; il peut s'agir de transfert de métabolites énergétiques, de vitamines et de métaux ;
- Les interactions régulatrices : ce sont des agents, sécrétés par une cellule, qui vont, par l'intermédiaire d'un signal de transduction, réguler au niveau moléculaire une fonction d'une autre cellule ; ces agents peuvent être des facteurs paracrines ou autocrines, des facteurs de croissance, de différenciation, des cytokines ...

Il faut, cependant, souligner que la plupart des données établissant l'existence d'une régulation intra gonadique des fonctions testiculaires ont été acquises *in vitro*, notamment grâce à l'isolement et à la culture de fragment de tube séminifère à un stade donné du cycle de l'épithélium séminal et aux co-cultures de différentes cellules en provenance du testicule.

De nombreux produits de sécrétion, en particulier des facteurs de croissance, sont élaborés par les cellules somatiques. La cellule de Sertoli synthétise des protéines de liaison et de transport, des protéases, des composants de la matrice extra cellulaire, des métabolites et des protéines régulatrices. Outre les androgènes, la cellule de Leydig produit des peptides qui agissent sur les autres cellules somatiques. Les cellules péritubulaires sécrètent des composants de la matrice extracellulaire ou des protéines régulatrices. Les cellules germinales élaborent des facteurs de croissance qui ont pour cible les cellules somatiques et possèdent elles-mêmes des récepteurs pour certains d'entre eux.

Les facteurs produits dans le testicule agissent localement suivant différentes modalités. Dans la régulation paracrine, le facteur libéré dans le milieu interstitiel agit sur une autre cellule située à proximité sans transiter par le courant sanguin (par exemple : cellule de Leydig – cellule de Sertoli). Une variante de ce mode de contrôle correspond au type cryptocrine dans lequel une des cellules est enclavée dans l'autre (exemple : cellules germinales – cellule de Sertoli). Dans l'autre variante dite juxtacrine, le facteur présent à la surface cellulaire se lie au récepteur de la cellule cible disposée en regard (une des modalités d'action des facteurs de croissance). Dans la régulation de type autocrine, la

cellule libère un facteur qui module son propre fonctionnement (par exemple : cellule de Leydig). Le facteur peut agir sur la cellule sans sortir à l'extérieur, ce qui définit le type intracrine, caractéristique de certaines cellules qui élaborent des stéroïdes.

6.2. Régulation paracrine de la fonction leydigienne.

Plusieurs observations concordantes suggèrent l'implication de l'épithélium séminal dans le contrôle des fonctions leydigiennes. In vivo, la FSH stimule l'activité de la glande interstitielle, ce qui suppose l'intervention de la cellule de Sertoli. L'aspect et l'activité des cellules de Leydig varient suivant les stades du cycle de l'épithélium séminifère. Toute altération expérimentale de la spermatogenèse retentit sur la structure et sur la fonction des cellules de Leydig. Enfin, le liquide interstitiel, dans lequel plusieurs facteurs thermosensibles ont été identifiés, stimule in vitro la production de testostérone, basale et stimulée par hCG, dans les cellules de Leydig du rat ou du porc.

Les expériences de co-cultures de cellules de Sertoli et de cellules de Leydig établissent clairement l'existence d'une régulation paracrine de la stéroïdogénèse. Dans ce modèle expérimental, on observe une augmentation du nombre des récepteurs LH/hCG et un accroissement de la production des stéroïdes, qui sont amplifiés en présence de FSH. Les cellules germinales, via la cellule de Sertoli, interviennent également dans la régulation de la stéroïdogénèse les spermatoctytes pachytènes ayant un effet inhibiteur et les spermatoctides un effet stimulant.

Les peptides produits par la cellule de Sertoli régulent la stéroïdogénèse soit positivement (inhibine) soit négativement (activine). Les facteurs de croissance peuvent aussi avoir un effet stimulant ou inhibiteur, tel est le cas pour deux d'entre eux : l'Insuline Growth Factor 1 (IGF1) et le Transforming Growth Factor β (TGF β).

L'IGF1 est produit par les cellules de Sertoli et par les cellules de Leydig. Des récepteurs à l'IGF1 sont présents sur les cellules de Sertoli, de Leydig et sur les cellules germinales. L'effet de ce peptide sur la stéroïdogénèse se traduit par l'augmentation du nombre de récepteurs à LH et l'activation de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse. Dans le nanisme de Laron caractérisé par une mutation du récepteur à l'hormone de croissance, la puberté est retardée, mais le fonctionnement testiculaire reste normal. Le taux de l'IGF1 circulant est bas, ce qui permet de supposer que l'IGF produit localement assure un rôle de suppléance sur la stéroïdogénèse.

Le TGF β (ARNm et peptide) a été mis en évidence dans les cellules de Sertoli et de Leydig de porc et de souris. La FSH régule négativement le taux de l'ARNm dans les cellules de Sertoli. L'action du TGF β sur la cellule de Leydig entraîne une diminution du nombre des récepteurs à LH/hCG et la production d'AMPc et de testostérone en réponse à une stimulation par l'hCG. Le TGF β agirait aussi sur la cellule de Leydig par voie autocrine. Au contraire, le TGF α sertolien augmente la capacité stéroïdogène des cellules de Leydig.

Enfin, rappelons que les cellules de Leydig renferment l'aromatase, complexe enzymatique permettant la conversion irréversible des androgènes en oestrogènes. Il existe un récepteur nucléaire de type β

(ER β) localisé au niveau des SPC pachytènes et des SPT rondes ; il existe aussi un récepteur aux oestrogènes sur la membrane des SPZ.

6.3. Régulation paracrine du tubule séminifère.

La spermatogenèse est étroitement dépendante du fonctionnement des cellules de Sertoli, elles-mêmes soumises aux interactions qui s'effectuent d'une part avec les espaces interstitiels et d'autre part avec les cellules germinales.

6.3.1 Interactions cellules de Leydig – cellules péritubulaires – cellules de Sertoli.

Les cellules péritubulaires produisent sous l'influence de la testostérone leydigienne une protéine modulant la fonction sertolienne (P-Mod-S) de 40kDa. Cette protéine augmente la production d'ABP et de transferrine alors qu'elle inhibe l'activité aromatisique.

La cellule de Leydig élabore d'autres médiateurs actifs sur les cellules voisines, comme l'ocytocine qui agit sur la contraction des cellules péritubulaires. La cellule de Leydig est également apte à synthétiser des peptides opioïdes dérivés de la proopiomélanocortine (POMC), sous l'influence de la LH. Les dérivés opioïdes ont une action paracrine sur les cellules de Sertoli qui possèdent des récepteurs pour ces neuromédiateurs.

Les facteurs de croissance synthétisés par la cellule de Leydig ont un effet mitogène sur la cellule de Sertoli prépubère (Epidermal Growth Factor - EGF -, TGF α , basic Fibroblast Growth Factor - β FGF -) et stimulent les fonctions de la cellule différenciée (IGF1, TGF β , Interleukine 1 – IL1 -).

Les interactions cellule de Leydig – cellule péritubulaire ne sont que régulatrices ; celles entre cellule péritubulaire et cellule de Sertoli sont environnementales et régulatrices.

6.3.2 Interactions cellules de Sertoli – cellules germinales.

Les interactions cellule de Sertoli – cellule germinale sont environnementales, nutritionnelles et régulatrices.

Le métabolisme des cellules de Sertoli et des cellules germinales est régulé par des interactions réciproques. La cellule de Sertoli participe à l'élaboration du liquide tubulaire indispensable à la nutrition des cellules germinales, au transport des ions et des molécules dans le compartiment adluminal du tube séminifère. Diverses substances d'origine sertolienne sont susceptibles d'agir sur les cellules germinales : métabolites du glucose, protéines de liaison aux vitamines, ABP, facteurs de croissance.

La cellule de Sertoli élabore des facteurs qui contrôlent la prolifération et/ou la différenciation des cellules germinales. Ainsi, elle produit une protéine spécifique, le stem cell factor (SCF), qui se présente sous deux formes, l'une liée à la membrane plasmique, l'autre soluble. Le récepteur du SCF, appelé c-kit, est un récepteur tyrosine-kinase exprimé sur les cellules germinales primordiales et les spermatogonies A. Le système SGC/c-kit est impliqué dans la migration et la prolifération des cellules germinales primordiales et, durant la période post-natale, dans la multiplication des spermatogonies A.

L'inhibine et l'activine synthétisées par la cellule de Sertoli différenciée exercent également leurs propriétés régulatrices sur la multiplication des cellules germinales, la première étant inhibitrice et la seconde activatrice. Les facteurs de croissance sertoliens pourraient agir directement sur les cellules germinales dans la mesure où elles sont pourvues de récepteurs. L'EGF, l'IGF1 et le β FGF régulent positivement la prolifération des cellules germinales alors que le TGF β a un effet inverse.

En retour, les cellules germinales exercent un contrôle paracrine sur l'activité fonctionnelle des cellules de Sertoli. In vivo, la taille, la forme et les caractéristiques structurales des cellules de Sertoli varient au cours du cycle de l'épithélium séminifère. L'expression des ARNms spécifiques et de leurs protéines est modulée en fonction du stade du cycle de l'épithélium séminifère.

La technique de trans illumination associée à la microdissection de fragments de tube séminifère de rat a permis de démontrer que, suivant les types de stades de l'épithélium séminifère, la production d'inhibine, d'activateur du plasminogène, ou de transferrine et la capacité de réponse des cellules de Sertoli à la testostérone et à la FSH varient très fortement.

La co-culture de cellules de Sertoli et de cellules germinales (spermatocytes pachytènes, jeunes spermatides) conduit à un accroissement de la libération d'ABP et de transferrine aussi bien dans les conditions basales qu'en présence de FSH et de testostérone. Cet effet résulte du contact direct des cellules entre elles et de la présence de médiateurs libérés par les cellules germinales.

Les spermatides matures contribuent de façon évidente au contrôle de l'activité sertolienne. Les corps résiduels, reliquats cytoplasmiques des spermatides matures, co-cultivés avec les cellules de Sertoli ont la capacité d'engendrer la production d'interleukine-1a dans les cellules de Sertoli. Cette cytokine est elle-même un puissant inducteur de la sécrétion d'interleukine-6. Or, il a été montré, par ailleurs, que l'interleukine-1a stimule la réplication de l'ADN dans les spermatocytes préleptotènes tandis que l'interleukine-6 a un effet opposé.

Des facteurs de croissance en provenance des cellules germinales pourraient aussi contrôler l'activité sertolienne. Le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) présent dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes, diminue l'activité aromatasique et la production d'inhibine induite par FSH et augmente au contraire la production de lactate et d'une protéine de liaison à l'IGF (IGFBP3) ainsi que l'expression des récepteurs à FGF. Ce dernier détecté dans les spermatogonies et les spermatocytes pachytènes stimule toutes les fonctions sertoliennes. Les spermatocytes pachytènes et les spermatides secrètent l'EGF qui stimule la production d'IGF1 et d'inhibine dans les cellules de Sertoli. Enfin, le Nerve Growth Factor (NGF) sécrété par les spermatocytes pachytènes et les jeunes spermatides se fixe sur des récepteurs sertoliens qui sont exprimés au moment où survient la méiose (stades VII et VIII du cycle de l'épithélium séminifère du rat). L'expression de ces récepteurs est régulée négativement par la testostérone.

7. CONTROLE NON ENDOCRINE NON PARACRINE DE LA SPERMATOGENESE

7.1. Limites des processus précédents de contrôle.

- S'il existe bien une régulation endocrine de la spermatogenèse, cette dernière ne dépend pas uniquement que des hormones considérées ; en effet, aucun traitement hormonal n'a pu à ce jour permettre une récupération ou une reprise d'une spermatogenèse altérée, hormis des situations exceptionnelles et bien connues (hypogonadisme hypogonado – hypophysaire).
- La régulation paracrine intra gonadique de la spermatogenèse est comme nous l'avons vu étroitement associée aux (ou dépendante des, voire le relais terminal local des) hormones précédemment décrites.
- Il existe donc d'autres facteurs ou processus intervenant dans la régulation de la spermatogenèse, mais qui ne sont pas actuellement reconnus comme des « systèmes régulateurs ».
- Parmi ces derniers, nous considérerons deux facteurs potentiels dont les données sont suffisantes pour les considérer dorénavant et déjà comme des régulateurs de la spermatogenèse : le système vasculaire d'une part, le système thermorégulateur d'autre part.

7.2. Régulation vasculaire de la spermatogenèse.

Caractéristiques de la vascularisation testiculaire.

7.2.1 Extra – gonadique.

Une artère unique dans laquelle la pression systolique est abolie, entourée intimement (par les intima) d'une multitude de veinules constituant le plexus pampiniforme qui est le lieu d'échanges à contre – courant. La nature de deux des échanges est bien connue :

- transfert hormonaux, en particulier de testostérone ; ce transfert de testostérone a lieu des veines vers l'artère, ce qui amène une augmentation importante de la concentration en testostérone dans le sang artériel arrivant au testicule ;
- échanges de chaleur à contre – courant avec transfert du sang artériel (le plus chaud) vers le sang veineux (le moins chaud).

Dans certaines espèces de mammifère, des communications ont été mis en évidence tant au niveau anatomique que fonctionnel entre les veines et l'artère au niveau du plexus pampiniforme ; ces shunts artério – veineux permettent, comme le montrent les données expérimentales, de détourner avant son arrivée au testicule une partie du sang artériel directement dans les veines testiculaires ; ceci entraîne une réduction du débit sanguin intra –testiculaire.

7.2.2 Intra – gonadique.

L'architecture fibreuse du testicule (découpage en lobules) par les cloisons (septa) fibro conjonctives détermine l'architecture vasculaire intra testiculaire :

- disposition des artères, artérioles, capillaires et veinules dans chaque lobule au niveau de l'espace interstitiel ;
- spécificité des capillaires, dont l'endothélium est continu dans l'espace interstitiel ; mais ils peuvent être localisés dans la paroi propre des tubules séminifères, auquel cas ils pourront avoir un endothélium fenêtré ou non selon le stade de l'épithélium séminifère en regard.

7.2.3 Débit sanguin intra – testiculaire.

Le sang arrivant dans le testicule a pour fonction :

- l'apport de tous les éléments nécessaires aux cellules testiculaires somatiques et germinales pour réaliser leurs multiples synthèses et multiplications cellulaires (acides aminés, vitamines, minéraux, hormones, oxygène, cholestérol ...) ;
- le transport des substances synthétisées et sécrétées par les différentes cellules somatiques intra testiculaires (hormones, protéines, etc ...)

Hors, l'artère testiculaire, qui est unique, est l'unique voie de tous ces apports indispensables aux fonctions testiculaires. Les quantités apportées seront ainsi directement dépendantes du débit sanguin intra testiculaire.

Les mécanismes de contrôle de la régulation du débit sanguin capillaire (intra testiculaire) ne sont pas connus actuellement.

7.3. Régulation thermique de la spermatogenèse.

7.3.1 Caractéristiques de l'eutherme testiculaire humaine.

L'eutherme testiculaire (température à laquelle s'effectuent physiologiquement les fonctions testiculaires) est constituée par une température testiculaire inférieure de 3 à 5°C à la température corporelle, comme chez la plupart des mammifères. Cette hypothermie physiologique de fonctionnement du testicule est due à deux systèmes thermorégulateurs.

7.3.2 Systèmes thermorégulateurs testiculaires.

Deux systèmes sont directement impliqués dans la régulation de la température testiculaire.

- *Le système vasculaire :*

Localisé dans le cordon spermatique, il est constitué par le plexus pampiniforme, déjà décrit, au niveau duquel ont lieu des transferts de chaleur à contre courant, i.e. du sang artériel vers le sang veineux, ce qui amène à un pré-refroidissement du sang artériel avant son arrivée au testicule.

L'efficacité de ce système d'échange est d'environ 95% (i.e. 95% de la différence de température entre les sangs est l'objet d'un transfert).

Le système vasculaire ne peut fonctionner que si la température du sang veineux est inférieure à celle du sang artériel ; cette condition est assurée par le deuxième système :

- *Le système scrotal :*

Les caractéristiques structurales, vasculaires, nerveuses et glandulaires du scrotum vont faire que ce dernier assure le maintien de l'eutherme testiculaire :

- par évacuation sanguine scrotale de toute chaleur apportée de façon exogène au scrotum (environnement) au moyen de la régulation de la surface d'échange cutanée (dartos et plissements) et de la modification du débit sanguin scrotal (vascularisation scrotale indépendante de la vascularisation testiculaire) ;
- par évacuation de la chaleur intra testiculaire, constituée à la fois par la chaleur apportée par le sang artériel et par la chaleur consécutive au métabolisme cellulaire ; cette évacuation se fait par la mise en œuvre de modification de la surface d'échange cutanée (dartos et plissements), du débit sanguin scrotal, d'une sudation basale plus importante que dans tout autre territoire cutané et d'une évaporation de la sueur ainsi sécrétée.

La mise en jeu de ces phénomènes thermorégulateurs est due à la présence de récepteurs cutanés thermiques localisés dans la peau scrotale.

La régulation de ces différents mécanismes est actuellement non connue.

7.3.3 Conséquences de la dysrégulation thermique du testicule.

Lorsque la température du testicule est supérieure à la valeur de la limite supérieure de l'eutherme testiculaire, il apparaît une altération de la quantité et de la qualité des spermatozoïdes produits, c'est à dire une altération de la spermatogenèse. Le degré d'altération et la spécificité de l'atteinte des caractéristiques spermatiques est fonction chez l'homme de l'intensité et de la durée de l'élévation anormale de la température testiculaire.

BILAN D'UNE INFERTILITE MASCULINE

Docteur Roger MIEUSSET

Centre de Stérilité Masculine, Hôpital Paule de Viguié, Toulouse

1. INTRODUCTION

L'infécondité d'un couple est liée à un facteur uniquement masculin dans environ 30% des cas; dans 40% des cas, les causes seront mixtes, c'est à dire impliquant des facteurs à la fois masculins et féminins. A partir de ces données épidémiologiques, il paraît évident, face à une plainte d'infécondité d'un couple en âge de procréer, de faire un bilan chez chacun des partenaires du couple. Le bilan masculin consiste en fait à rechercher les causes ou facteurs éventuellement responsables d'une difficulté de l'homme à faire un enfant. Cette recherche doit être menée de façon logique et systématique. Comme dans toute activité médicale, ce bilan comprend une analyse de l'histoire de l'individu, un examen clinique et des examens para cliniques.

2. ANALYSE DE L'HISTOIRE INDIVIDUELLE

Cette analyse va se décomposer en plusieurs temps qui aborderons successivement l'homme au sein du couple actuel, au sein d'un éventuel couple antérieur, au sein de sa famille et fratrie, dans ces antécédents médicaux, dans sa vie professionnelle, et ses habitudes de vie.

2.1. Au sein du couple actuel : trois éléments fondamentaux :

- la **fertilité** : il est important de connaître le statut de la fertilité dans le couple : nombre de grossesses menées à terme, interruptions volontaires de grossesses, fausse-couches spontanées (FCS), et le caractère désiré ou non de ces grossesses.
- le **délai nécessaire pour concevoir** (DNC) : c'est le temps qui s'est écoulé depuis l'arrêt de toute méthode de contraception au sein du couple, durée pendant laquelle le couple a cherché à faire un enfant. Un DNC supérieur à deux ans est le signe d'une difficulté à l'obtention d'un enfant ; il implique la nécessité d'entreprendre une recherche des facteurs étiologiques. Pour des valeurs du DNC inférieures à 2 ans, les explorations ne sont pas à entreprendre systématiquement.
- La **sexualité** : l'information a recherchée, lors d'une première consultation pour infécondité de couple, est l'existence de rapports sexuels et leurs fréquence. L'absence de rapports sexuels amène à suspendre toute exploration complémentaire et à orienter le couple vers une prise en charge qualifiée qui peut être d'ordre sexologique et/ou psychologique.

2.2. Au sein d'un couple antérieur

- la *fertilité* : il est important de connaître le statut de la fertilité dans un couple antérieur (nombre de grossesses menées à terme, interruptions volontaires de grossesses, FCS) et le caractère désiré ou non de ces grossesses antérieures. Si, au sein de ce couple antérieur il existait une infécondité, il est important de savoir si depuis la séparation de ce couple, la partenaire a eu une grossesse.

2.3. Au sein de la famille et de la fratrie.

- Bien qu'il n'existe que peu de données actuelles concernant la nature familiale de certaines hypofécondités masculines, on recherchera les *signes évocateurs d'un caractère familial* de cette difficulté à faire un enfant avec la taille des fratries des deux parents (oncles et tantes paternels et maternels), l'existence d'une descendance dans cette fratrie parentale (cousins et cousines germains), l'existence et la taille d'une fratrie du patient (frères et sœurs), ainsi que la descendance éventuelle de cette fratrie (neveux et nièces).
- On sera aussi attentif à l'absence involontaire de toute fratrie et à l'existence d'une grande différence d'âge entre les membres d'une même fratrie au sein des différentes générations, ainsi qu'à l'existence de traitements pour infécondité du couple parental, en particulier de la mère, qui auraient permis l'obtention ou le maintien d'une grossesse dont le patient est l'issue ;
- Enfin, on recherchera systématiquement les cas éventuels de stérilité ou d'hypo -fécondité parmi les frères et sœurs.

2.4. Antécédents médicaux.

Parmi les antécédents médicaux et chirurgicaux, certains sont connus pour être des facteurs de risques pour la fertilité masculine, c'est à dire qu'ils sont susceptibles d'être responsables d'une infécondité masculine.

2.4.1 Facteurs médicaux :

Certaines affections peuvent par elles-mêmes être responsables de perturbations de la spermatogenèse ; lorsque ces perturbations existent elles sont constituées entre autres par une oligospermie (infécondité) ou un azoospermie (stérilité). Ces affections sont actuellement considérées comme des facteurs de risque pour la fertilité masculine. On en distinguera deux grands types :

- *Les affections testiculaires* :
 - les troubles de la migration du testicule, dont la forme la plus connue est la cryptorchidie;
 - la torsion aiguë du testicule, qui peut sous sa conséquence la plus grave (nécrose testiculaire) conduire à l'orchidectomie (ablation du testicule);

- l'orchite ou orchi-épididymite, dont l'évolution peut aboutir à une fonte secondaire du testicule.
- *Les affections de l'appareil génital mâle :*
 - principalement les antécédents de type infectieux sous forme soit d'infections urinaires fréquentes ou récidivantes, soit de prostatite (affection qui peut survenir dès l'âge de 20 ans) ;
 - mais aussi les lésions consécutives à des traumatismes du petit bassin.

2.4.2 Facteurs iatrogènes :

Les facteurs iatrogènes sont des conséquences non désirées de traitements médicaux ou chirurgicaux réalisés pour des affections qui sont le plus souvent sans rapports avec les testicules ou l'appareil génital mâle. Il s'agit donc d'effets secondaires indésirables. Il est impératif ***avant toute utilisation de tels traitements*** d'informer le patient des risques encourus et de lui proposer une « préservation » potentielle de sa fertilité par congélation du sperme.

- *Médicaux :*
 - radiothérapie :
 - unique : elle entraîne altération de la spermatogenèse se traduisant selon la dose par une oligospermie transitoire (8cGy) ou une azoospermie (80cGy). Au-delà d'une dose testiculaire de 3 Gy, la récupération de la spermatogenèse n'est que partielle (oligo asténo téra to zoospermie), et quasi nulle pour 6 Gy.
 - répétée : le fractionnement d'une irradiation augmente l'effet stérilisant et la survenue de FCS. Il existe un effet-dose : l'arrêt complet de la spermatogenèse survient pour une dose totale reçue par les testicules de 35cGy, et sa traduction en sera une azoospermie ; cet arrêt est irréversible à partir de 2 Gy.
 - chimiothérapie antiméiotique :
 - tous les traitements comprenant des substances antiméiotiques altèrent la spermatogenèse ;
 - parmi ceux-ci, les agents alkylants sont les plus susceptibles d'entraîner un arrêt définitif de la spermatogenèse qui se traduira par une azoospermie.
 - médicaments anti-infectieux :
 - certains médicaments anti-infectieux sont connus pour entraîner des altérations quantitatives ou qualitatives de la spermatogenèse, perturbations qui sont réversibles après l'arrêt du traitement ;
 - il s'agit des nitrofuranes, de la salazopyrine et du kétoconazole.
 - médicaments du système nerveux central :

- certains médicaments du système nerveux central peuvent être responsables de troubles de la sexualité (baisse de la libido, perte de l'éjaculation) ou de perturbations de la spermatogenèse (oligo-asthéo-térato-zoospermie), ou des deux à la fois ; ces modifications sont réversibles après l'arrêt du traitement ;
- il s'agit des IMAO, des imipraniques, du lithium, du Dogmatil^R, du Primpéran^R, des neuroleptiques et des anticonvulsifs.
- médicaments hormonaux ;
 - les stéroïdes, androgènes et oestrogènes, freinent la spermatogenèse ; il peut en être de même avec les progestatifs ;
 - ces effets sont réversibles après l'arrêt du traitement.
- médicaments autres :
 - certains peuvent être responsables de trouble de la libido, comme les anti-hypertenseurs et les hypocholestérolémians ;
 - d'autres entraînent des oligo-asthéo-térato-zoospermie lors de traitements prolongés ; il s'agit par exemple du Tagamet^R et de la colchicine ;
 - tous ces effets sont réversibles après l'arrêt des traitements.
- *Chirurgicaux* :
 - directs :
 - cure de hernie inguinale ou d'hydrocèle dans le jeune âge, avec essentiellement risque de lésion du canal déférent ;
 - cure de varicocèle (varice située au niveau de veines spermatiques) avec essentiellement risque de lésion artérielle ;
 - ablation d'un kyste avec risque de lésion artérielle ou déférentielle s'il s'agit d'un kyste du cordon, et risque de lésion épидидymaire s'il s'agit d'un kyste de l'épididyme.
 - indirects :
 - troubles de l'éjaculation secondaires à chirurgie locale (curage ganglionnaire lombo-aortique, chirurgie du col vésical, adénomectomie ...) ;
 - troubles de l'érection secondaires à chirurgie par voie pelvienne ou périnéale ;
 - infections génito-urinaires (prostatite ou épидидymite) post opératoires secondaires à des sondages urinaires répétés ou permanents.

2.5. Histoire professionnelle

De nombreuses situations professionnelles ou conditions de travail peuvent présenter un risque pour la fertilité de l'homme. Parmi ces facteurs professionnels, on distingue ceux qui sont la conséquence d'agents physiques ou chimiques, et ceux qui résultent de certaines situations particulières.

2.5.1 Agents physiques :

- radiations ionisantes, que l'irradiation soit aiguë ou chronique ;
- radiations non ionisantes, comme les micro ondes ;
- température ambiante très élevée (sidérurgie, céramique) .

2.5.2 Agents chimiques :

- les métaux : une altération de la spermatogenèse a été démontrée pour le plomb, le cadmium, et le mercure ; elle est soupçonnée pour le manganèse et les composés chromés ;
- les herbicides, pesticides et apparentés : il s'agit d'une classe de substances très nombreuses, aux effets potentiellement toxiques sur la spermatogenèse encore peu étudiés. Le dibromochloropropane (DBCP), le dibromoéthane, la chlordécone et les carbamates sont des toxiques avérés de la spermatogenèse, de même que certains solvants comme le sulfure de carbone. D'autres substances sont soupçonnées d'augmenter le nombre de fausses-couches chez les partenaires d'hommes exposés (chloroprène, chlorure de vinyle, dinitrotoluène, caprolactam, dinil).

2.5.3 Situations particulières :

- certaines conditions de travail sont soupçonnées de représenter un risque pour la fertilité en raisons de facteurs physiques et/ou chimiques mal identifiés encore ;
- il s'agit des postes de conduite d'engins soit agricole, soit de chantiers, des postes de soudeurs à l'arc, ou des postes en usines textiles.

2.6. Habitudes de vie.

Les habitudes de vie ont peu été étudiées dans leurs relations à la fertilité masculine.

- L'usage du tabac (nombre de leucocytes élevé dans le sperme, infections plus fréquentes des glandes annexes), la consommation excessive d'alcool (altération directe et indirecte de la spermatogenèse), et l'obésité (réduction du volume testiculaire et de la production spermatique) sont des facteurs de risques pour la fertilité ;
- Mais ces facteurs de risque sont aussi constitués par des habitudes ou postures qui vont induire une augmentation anormale de la température scrotale de façon répétée telles que : bains chauds, sauna ...
- Les comportements alimentaires font actuellement l'objet d'études débutantes, un certain nombre d'aliments contenant des substances naturelles ou artificielles soit hormonales soit capables de mimer les effets des hormones (perturbateurs hormonaux) ; en fait, ces substances sont particulièrement persistantes car bio accumulées dans la chaîne alimentaire naturelle et dans le tissu graisseux humain.

3. EXAMEN CLINIQUE

L'examen clinique comprendra trois temps, d'observation, de palpation et de mesures.

3.1. Observation

3.1.1 Aspect général :

- taille, poids, aspect androïde ou gynoïde ;
- aspect de la pilosité, existence d'une gynécomastie ;
- présence de cicatrices (cryptorchidie, hernie inguinale, varicocèle).

3.1.2 Scrotum :

- configuration ample ou courte, présence d'un panicule adipeux sus-pubien ;
- **anomalie** : déformation dans la région du cordon spermatique, signe d'une varicocèle important sous-jacent.

3.1.3 Testicules :

- leur localisation physiologique est au fond du scrotum en permanence ;
- une première **anomalie** est représentée par une localisation scrotale haute ou supra-scrotale, voire inguinale ;
- une ascension inconstante des testicules en situation supra-scrotale constitue deuxième **anomalie**.

3.2. Palpation

3.2.1 Scrotum

- la consistance de la peau scrotale fine ou épaisse est à noter ;
- le kyste sébacée ou l'angiokératome sont indolores et sans répercussion sur la fertilité ;
- **anomalie** : le contenu scrotal peut comprendre un épanchement liquidien, ou hydrocèle, dont le diagnostic clinique sera fait par transillumination scrotale. Un examen complémentaire échographique peut parfois s'avérer nécessaire ; l'évacuation de cet épanchement par ponction est contre – indiquée (récidive, infection) sauf exception.

3.2.2 Testicules

- chacun se palpe entre le pouce d'une part, l'index et le majeur d'autre part ;
- la palpation n'est pas douloureuse ;
- on évalue la consistance, classiquement ferme et rénitente ;
- **anomalie** : une sensation de dureté ou au contraire de mollesse sont des signes péjoratifs de l'état fonctionnel du testicule. Toute modification localisée de la consistance à type de dureté nécessite un examen complémentaire échographique (risque de tumeur testiculaire) ;

- **anomalie** : l'apparition d'une zone douloureuse lors de la palpation nécessite un examen complémentaire échographique (risque de tumeur testiculaire) ;

3.2.3 Epididymes

- le testicule étant maintenu entre le pouce, l'index et le majeur d'une main, on localise classiquement la tête de l'épididyme en palpant le testicule avec le pouce et l'index de l'autre main, en partant du pôle inférieur du testicule et en remontant vers le pôle supérieur : on rencontre la tête de l'épididyme après avoir perçu un sillon. On palpe alors l'épididyme de haut en bas sur toute sa longueur, de la tête à la queue. La région du corps épидидymaire peut être difficile à percevoir, ou être nettement séparée du testicule.
- Un épидидyme normal est de consistance légèrement dépressible ou molle, jamais douloureux ;
- **Anomalies épидидymaires :**
 - a) *kyste* :
 - perception d'une petite boule, tendue, très peu dépressible, insensible la plupart du temps, située soit sur le trajet de la tête épидидymaire, soit en para- épидидymaire ;
 - il s'agit essentiellement de collection liquidienne (à l'intérieur de résidu embryologique) comme le confirme l'échographie ;
 - en dehors d'indications particulières (douleurs, compression), on s'abstiendra de toute ponction (récidive, infection) ou exérèse chirurgicale (lésion épидидymaire grevant la fertilité future).
 - b) *nodule* :
 - variable en taille et en nombre, de consistance très dure, indolore ;
 - signes évocateurs d'infections anciennes (scléroses secondaires ?) ;
 - peuvent être localisés sur tout le trajet épидидymaire ;
 - exérèse inutile et non dépourvue de risque pour la fertilité future.
 - c) *dilatation épидидymaire* :
 - elle se caractérise par une turgescence de partie ou totalité de la tête épидидymaire , voire s'étendant au corps et à la queue ; uni ou bilatérale ;
 - elle est perçue sous la forme d'une masse bien délimitée, tendue, résistante à la pression qui peut réveiller une douleur suivant un trajet funiculaire (i.e. du cordon déférent) ;
 - elle peut être confondue avec un lipome accolé à un épидидyme normal (diagnostic différentiel par échographie) ;

La palpation doit suivre cette dilatation de l'épididyme jusqu'à son extrémité inférieure ; cette dernière peut en effet présenter deux situations différentes:

α - elle est prolongée par un épидидyme ou un déférent normal :

- diagnostic de présomption : obstruction épидидymaire uni ou bilatérale;

- examens complémentaires : d'une part, le dosage des marqueurs biochimiques du plasma séminal montrant un effondrement (en cas de bilatéralité de l'atteinte) des substances d'origine épидидymaire (L-carnitine, α glucosidase, glycérophospho-choline) ; d'autre part l'échographie scrotale qui confirme la dilatation épидидymaire ;
- diagnostic de certitude : l'exploration chirurgicale au cours de laquelle sont réalisés à la fois un geste préventif (prélèvement de spermatozoïdes épидидymaires qui sont ensuite congelés) et curatif : rétablissement de la perméabilité canalaire par anastomose le plus souvent entre l'épididyme et le déférent (AED : anastomose épидидymo-déférentielle).

β - elle ne présente aucune continuité :

- le reste de l'épididyme et/ou le déférent ne sont pas perçus ;
- diagnostic de présomption : agénésie partielle de l'épididyme qui est très fréquemment associée à une agénésie complète du déférent et de la vésicule séminale homolatéraux, voire du canal éjaculateur homolatéral, et même du rein homolatéral.
- examens complémentaires : l'examen de sperme, avec mesure attentive du volume (effondré) et du pH (acide) de l'éjaculat, et le dosage des marqueurs biochimiques du plasma séminal montrant un effondrement des substances d'origine épидидymaire, vésiculaire (fructose, choline) et une augmentation relative des substances d'origine prostatique (citrates, zinc) ; un bilan échographique endorectal est indispensable à l'identification précise des lésions avant toute exploration complémentaire génétique.
- exploration complémentaire génétique : la mise en évidence, lors d'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), d'une prévalence anormalement augmentée de porteurs hétérozygotes pour les mutations impliquées dans la mucoviscidose (gène CFTR), nécessite le dépistage systématique de cette anomalie avant tout acte thérapeutique.
- le traitement consiste en un prélèvement de spermatozoïdes au niveau de la partie turgescente de l'épididyme, puis congélation du prélèvement ; à distance, une procréation médicalement assistée sera réalisée.

3.2.4 Canal Déférent.

- en poursuivant la palpation de l'épididyme au-delà de la queue, on perçoit l'anse épидидymo-déférentielle, conduit plus ou moins aplati, contourné, parfois pelotonné, qui des prolonge par un canal de consistance ferme, dure, classiquement « en corde de fouet », le canal déférent ;
- de diamètre variable, ce dernier peut être très fin et difficilement perceptible ; la palpation est indolore ;
- **anomalie** : épaisissement, présence de nodules sont des signes évocateurs d'infections anciennes.

3.2.5 Cordon spermatique

Il contient plusieurs éléments dont deux sont à retenir : le canal déférent et le réseau veineux.

- *Canal déférent :*

On poursuit la palpation, entreprise depuis l'épididyme, jusqu'à la région pré-inguinale afin de s'assurer de la continuité de ce canal.

- *Réseau veineux :*

- en palpant le cordon spermatique entre le pouce et l'index et le majeur, on perçoit les veines spermatiques ;
- **anomalie** : l'une ou plusieurs peuvent être dilatées : on parle de *varicocèle*, qui peut induire si elle est très volumineuse une déformation scrotale visible à l'observation ; la palpation retrouvera une ou plusieurs veines dilatées, parfois très contournées ;
- si la dilatation est plus modérée, on s'aidera pour le diagnostic à la palpation de la manœuvre de Valsalva (inspiration bloquée) qui induit une mise en tension de la ou des veines ;
- quelle qu'en soit la taille, cette varicocèle peut s'étendre dans le seul cordon spermatique ou se poursuivre dans la cavité scrotale ;
- on sera attentif à la consistance et à la taille du testicule homolatéral à la varicocèle qui sont des indicateurs de l'état fonctionnel du testicule sous jacent.

3.3. Mesures

A l'examen clinique proprement dit s'ajoutent la mesure des testicules et des températures scrotales. Ces deux mesures sont réalisées sur un patient nu, allongé et détendu.

3.3.1 Volumes testiculaires.

Le volume de chaque testicule est évalué soit directement, soit indirectement à partir de mesures qui peuvent être réalisées par quatre instruments :

- l'orchidomètre de Prader, à type de boulier, conçu pour surveiller le développement volumique des testicules en période pubertaire ; il n'est pas utilisable chez l'adulte, en raison de l'imprécision pour les volumes élevés ;
- l'orchidomètre de Takihara, disque plein évidé de trous ovoïdes de taille croissante, permet d'obtenir des mesures plus précises que celles de Prader, mais limitées par le nombre de modèles volumiques proposés ;
- le pied à coulisse permet de mesurer les axes longitudinal (inféro-supérieur) et transversal (intéro-externe) de chaque testicule ; l'imprécision est liée à l'inclusion du scrotum dans la mesure ; le volume est obtenu selon une formule mathématique.

- l'échographie scrotale permet de réaliser des mesures des différents axes testiculaires ; l'imprécision de la mesure est liée à la difficile différenciation entre tissu testiculaire et tissus sus jacents (scrotaux) ; le volume est obtenu selon une formule mathématique.

Un volume testiculaire est considéré comme :

- normal s'il est $>$ à 15 ml ;
- hypotrophique s'il est compris entre 6 et 15 ml ;
- atrophique s'il est inférieur à 6 ml.

Anomalies du volume testiculaire.

- Il existe souvent une différence de taille entre les deux testicules ; elle n'est à considérer comme pathologique que si l'un des volumes testiculaires présente une différence de plus de 20% avec l'autre.
- Une hypotrophie ou une atrophie testiculaires impliquent des examens complémentaires (bilan hormonal, génétique, échographique).

Intérêts du volume testiculaire.

- Le volume testiculaire est un outil important d'évaluation de la spermatogenèse : la quantité de spermatozoïdes produits et le pourcentage de gamètes mobiles sont positivement corrélés au volume testiculaire ;
- Le volume testiculaire a aussi un caractère prédictif à l'égard de la production de spermatozoïdes :
 - l'atrophie bilatérale est associée à une absence de production de spermatozoïdes (se traduisant par une azoospermie) dans 90% des cas ;
 - l'hypotrophie bilatérale est associée à une altération de la spermatogenèse à type d'absence de production (azoospermie) dans 50% des cas et de réduction marquée (oligozoospermie) du nombre de spermatozoïdes produits (<20 millions/ml) dans 40% des cas ;
- enfin, le volume testiculaire est l'un des éléments essentiels, avec la dilatation épидидymaire, du diagnostic différentiel entre azoospermie excrétoire (i.e. secondaire à obstruction canalaire bilatérale) et azoospermie sécrétoire (i.e. conséquence d'une altération de la production).

3.3.2 Températures scrotales

La mesure de la température scrotale chez l'homme infécond est encore un examen peu développé, bien que la spermatogenèse soit thermodépendante chez l'homme comme chez la plupart des mammifères :

- réduction du nombre et de la qualité des spermatozoïdes produits lors d'élévations importantes des températures corporelle, scrotale ou testiculaire ;

- existence d'une température scrotale anormalement élevée chez environ un tiers des hommes inféconds, élévation associée à une réduction quantitative et qualitative des spermatozoïdes produits ainsi qu'à une augmentation des taux de FSH et LH sériques.

Les **moyens fiables de mesure** de la température scrotale sont représentés par

- un thermomètre à mercure spécifique (invagination de la peau scrotale autour du réservoir, après préchauffage du thermomètre à 37°C) ;
- par l'utilisation de sondes thermiques fixées sur la peau scrotale et reliées à un boîtier de lecture ;
- la thermographie ne permet que des mesures comparatives d'un testicule par rapport à l'autre, et l'obtention de valeurs chiffrées peu précises.

Normalité de la température scrotale :

La température scrotale est influencée par la posture, l'habillement, l'activité et la température ambiante. C'est pourquoi une mesure dans des conditions strictement standardisées est indispensable à la validité de la mesure. Dans ces conditions, la limite supérieure de la température scrotale est de 35,0°C, soit 2°C en dessous de la température corporelle centrale. Toute élévation de la température scrotale au-delà de cette valeur est susceptible d'altérer la spermatogenèse et/ou la fertilité.

4. CONCLUSIONS

L'analyse de l'histoire individuelle, l'examen clinique et les mesures précitées ont été réalisés lors de la première consultation pour infécondité. Les renseignements apportés vont permettre d'une part d'orienter les examens biologiques et complémentaires à réaliser, d'autre part d'interpréter les résultats de ces examens.

Cette première partie du bilan d'une infécondité masculine est aussi très importante pour l'explication au patient du type et de la chronologie des examens à réaliser, souvent fonction de chaque cas particulier, dans une perspective de diagnostic étiologique et de prise en charge thérapeutique.

Parmi ces examens paracliniques, est réalisé tout d'abord un examen de sperme. Secondairement, d'autres explorations biologiques ou échographiques seront envisagées en fonction des résultats du bilan clinique et de l'analyse du sperme.

5. EXAMENS PARACLINIQUES

5.1. Analyses du prélèvement de sperme.

De première intention, il fait toujours appel au spermogramme (nombre, vitalité, mobilité des spermatozoïdes) et au spermocytogramme (morphologie des spermatozoïdes).

Principales anomalies:

- *Oligoathénotérazoospermie* (OATS) : constitue l'anomalie spermatique la plus souvent rencontrée en infécondité masculine ; est constituée par une réduction du nombre et des

pourcentages de spermatozoïdes mobiles et à morphologie normale. Cette anomalie n'est spécifique d'aucune atteinte particulière. L'oligozoospermie est sévère quand le nombre de spermatozoïdes est inférieur à 5 millions par ml, ce qui constitue un facteur d'infécondité (réduction significative des chances de grossesse in vivo).

- *Azoospermie* : absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat ; peut avoir une origine relevant d'un trouble de la production (azoospermie sécrétoire), de l'excrétion (azoospermie obstructive) ou des deux (azoospermie mixte). Le diagnostic étiologique nécessite le plus souvent le recours à d'autres examens complémentaires de type spermioologiques, hormonaux, échographiques, génétiques. La prise en charge thérapeutique sera d'une part différente selon l'étiologie et d'autre part adaptée en prenant en compte les spécificités individuelles et du couple.
- D'autres anomalies sont retrouvées à type de *nécrozoospermie* (augmentation du pourcentage de gamètes morts), d'*autoagglutinats* spontanés des spermatozoïdes (rechercher la présence d'anticorps sur les différentes parties des spermatozoïdes) ou d'*aspermie* consécutive à une anéjaculation avec sensations orgasmiques (éjaculation rétrograde) ou non (trouble d'ordre psychogène).

Ces analyses du prélèvement de sperme comprennent donc en première intention le spermogramme et le spermocytogramme; elles pourront être complétées en fonction des résultats et des informations du bilan clinique par une spermoculture (recherche de germes dans le sperme), par une analyse des marqueurs biochimiques du plasma séminal (mesure de substances sécrétées plus spécifiquement par certains organes du tractus génital mâle).

5.2. Bilan hormonal.

- Il n'est indiqué que si la numération de spermatozoïdes est inférieure à 10 millions/ml.
- Il doit être limité à un dosage de la FSH.
- Les dosages autres (testostérone, LH, prolactine, estradiol) et les tests hormonaux dynamiques ne relèvent que de cas spécifiques.

5.3. Bilan génétique.

- le caryotype n'est indiqué qu'en cas d'oligozoospermie avec moins de 10 millions de spermatozoïdes/ml et d'azoospermie sécrétoires, en raison d'une plus grande fréquence des anomalies chromosomiques dans ces deux populations que dans la population à concentration normale de spermatozoïdes.
- Les analyses géniques, à type de recherche de mutations du gène CFTR (mucovicirose) ou de microdélétions du chromosome Y, ne sont indiquées que dans des situations très spécifiques.

5.4. Bilan échographique et radiologique.

- les *explorations radiologiques de l'hypophyse* ne sont à réaliser que dans les cas très particuliers à type d'hypogonadisme acquis ou d'hyperprolactinémie authentifiée ; ces affections sont très rares.
- *L'échographie scrotale* est à réaliser
 - impérativement en cas de zone douloureuse ou indurée révélée à la palpation d'un testicule, en cas de découverte d'une gynécomastie, ou lors d'une plainte pour modification du volume d'un testicule (risque : processus tumoral);
 - systématiquement en cas d'antécédent de trouble de la migration testiculaire ou d'atrophie testiculaire (risque : processus tumoral);
 - logiquement lors d'anomalies à la palpation des épидидymes.
- *L'échographie endorectale* : va permettre de visualiser la prostate, les vésicules séminales, les canaux déférents et éjaculateurs ; répond à deux types d'indications :
 - systématique devant une anomalie congénitale de l'appareil génito-urinaire;
 - indispensable au diagnostic étiologique d'obstruction en cas d'azoospermie ;
 - d'un apport encore discuté lors d'un contexte infectieux de l'appareil génital.

VARICOCELE

Pr Pierre PLANTE

Service d'Urologie Andrologie, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse

1. INTRODUCTION

La varicocèle est rare avant la puberté [78,79]. Son incidence augmente dès le début de la puberté.

La varicocèle est une anomalie présente chez 2 à 22% des adultes de la population générale [3, 4] et 15% des adolescents [5]. (Tableau 1)

Elle est plus fréquente chez les hommes ayant une infertilité, atteignant 40% chez ceux qui ont une anomalie au spermogramme [6, 7].

L'incidence ne varie en fonction de l'ethnie mais pourrait être augmentée chez les adolescents qui pratiquent le football intensivement [80, 81,91].

Les varicocèles cliniques se développent unilatéralement à gauche dans 85%-90% des cas.

Une varicocèle clinique droite est rare et s'observe en générale dans le cadre d'une varicocèle bilatérale, elle est exceptionnellement isolée et fait alors évoquer un situs inversus, une malformation veineuse ou une tumeur retro péritonéale [79].

La varicocèle est une anomalie qui peut avoir des conséquences andrologiques: défaut de croissance et de développement testiculaire homolatéral, infertilité, douleurs scrotales.

L'incidence des douleurs scrotales associées à la varicocèle est de 2 à 10% [9]. Le traitement peut être indiqué dans ce cas, mais peu d'études concernant l'efficacité sur la douleur scrotale ont été publiées. le présent chapitre porte sur la prise en charge de la varicocèle chez l'homme infertile.

2. ETHIOPATHOGENIE :

L'action de la varicocèle sur la fertilité masculine n'est pas connue mais des publications de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS[8] indiquent clairement que la varicocèle est associée à une augmentation des anomalies spermatiques, une diminution du volume testiculaire et une dégradation de la fonction des cellules de Leydig.

L'élévation de la température testiculaire et le reflux veineux spermatique semblent jouer un rôle important dans la dysfonction testiculaire occasionnée par la varicocèle, Cependant, la physiopathologie exacte des lésions induites par la varicocèle n'est à ce jour pas complètement élucidée [82].

Les lésions histologiques du testicule chez un patient qui présente une varicocèle atteignent l'ensemble des types et des compartiments cellulaires : dégénération et desquamation des cellules germinales dans la lumière des tubules, arrêt de la spermatogenèse à différents stades, épaissement de la membrane basale des tubes séminifères, vacuolisation des cellules de Sertoli, hyperplasie ou plus rarement atrophie des cellules de Leydig, lésions dégénératives des capillaires et des veinules[83,84,85]. Les lésions histologiques sont habituellement moins sévères chez l'adolescent et n'affectent le plus souvent que le testicule homolatéral à la varicocèle et se majorent avec l'âge [86].

Les anomalies retrouvées au spermogramme sont dominées par l'oligospermie et l'asthénospermie. Ces anomalies ne sont pas constantes. Seuls 15 à 20 % des hommes qui présentent une varicocèle consultent pour infertilité [79]. Ainsi la majorité des hommes porteurs d'une varicocèle sont fertiles, bien qu'ils aient une numération de spermatozoïdes légèrement plus faible que la population générale [89].

La corrélation entre l'importance de la varicocèle et la sévérité des anomalies du spermogramme n'est pas établie avec certitude [87,88].

3. COMMENT DIAGNOSTIQUER LA VARICOCELE ?

Un consensus sur les procédures de diagnostic et la classification de la varicocèle a été défini par l'Organisation Mondiale de la Santé [10]. La classification suivante [11, 10] est utilisée en pratique clinique :

- Infraclinique : varicocèle ni palpable ni visible au repos ou pendant la manoeuvre de Valsalva, mise en évidence par des tests ou des examens complémentaires (tel que l'examen doppler)
- grade 1 : varicocèle palpable pendant la manoeuvre de Valsalva
- grade 2 : varicocèle palpable au repos mais non visible
- grade 3 : varicocèle visible et palpable au repos.

Le bilan d'un patient ayant une varicocèle doit comporter un interrogatoire et un examen clinique soigneux centré sur la sphère urogénitale, ainsi que deux spermogrammes. L'examen clinique doit être réalisé sur le patient en décubitus dorsal et en position debout.

Lorsque la varicocèle est palpable, l'examen des bourses perçoit un lacis veineux variqueux sous cutané. Ce paquet variqueux disparaît ou est très significativement diminué lorsque le patient se met en position de décubitus dorsal. Si la varicocèle n'est pas clairement palpable, il

est alors demandé au patient de réaliser une manœuvre d'hyperpression abdominale (manœuvre de Valsalva) en position debout, de façon à sensibiliser l'examen clinique.

Seules les varicocèles palpables ont fait la preuve d'une association avec l'infertilité masculine [12-14]. Ainsi, les autres tests diagnostiques tels que l'échographie scrotale, la thermographie, l'examen doppler, la scintigraphie et la veinographie spermatique ne doivent pas être utilisés dans le cadre de la détection des varicocèles infracliniques. L'échographie scrotale peut cependant être indiquée lorsque l'examen clinique du scrotum est particulièrement difficile (Film 1) et ne peut conclure, et pour le dépistage des tumeurs testiculaires non palpables dont la fréquence est plus élevée chez les hommes infertiles [15]. La veinographie spermatique peut également être utile pour mettre en évidence des variations anatomiques du réseau veineux spermatique expliquant la récurrence ou la persistance de la varicocèle après traitement. Il s'agit alors d'un examen réalisé comme premier temps du traitement par sclérothérapie ou embolisation (antégrade ou rétrograde).

4. QUELLES SONT LES INDICATIONS THERAPEUTIQUES ?

Chez l'adulte

Lorsqu'un couple consulte pour infertilité et que l'homme présente une varicocèle, plusieurs conditions doivent être réunies pour porter l'indication du traitement :

- la varicocèle doit être palpable à l'examen clinique du scrotum,
- le couple doit avoir une infertilité d'au moins un an,
- la femme doit avoir une fertilité normale ou une cause potentiellement curable d'infertilité,
- le patient doit avoir des anomalies spermatiques au spermogramme.

Le traitement de la varicocèle chez l'homme infertile n'est pas indiqué lorsque la varicocèle est infra-clinique.

En dehors de la démarche de procréation d'un couple infertile, un patient ayant une varicocèle palpable associée à des anomalies spermatiques au spermogramme et posant la question de sa fertilité ultérieure peut être également un candidat au traitement de la varicocèle.

Chez l'adolescent

Les adolescents ayant une varicocèle uni- ou bilatérale et chez qui est mis en évidence, de façon objective, une réduction de la taille du testicule homolatéral à la varicocèle, doivent également être considérés comme candidats au traitement [16-19]. S'il n'y a pas clairement de

réduction du volume testiculaire, ils doivent être suivis annuellement avec mesure objective du volume testiculaire et éventuellement avec un spermogramme dans le but de détecter le signe le plus précoce d'altération testiculaire secondaire à la varicocèle.

Le traitement de la varicocèle doit être proposé dès les premières détections d'anomalie testiculaire (2 ml de différence de volume ou 2 déviation standard) ou spermatique [20-25].

Certains auteurs considèrent autres paramètres pour les décisions thérapeutiques chez l'adolescent comme le test de stimulation à la LH-RH, le dosage sérique de LH, FSH et Inhibine et le grade élevé de la varicocèle [79,90].

Deux études prospectives randomisées ont montré une augmentation de la taille testiculaire homo- et controlatérale chez des adolescents ayant bénéficié d'un traitement de la varicocèle comparativement à ceux qui n'ont pas été traités [26, 17]. Une étude de suivi de cohorte mesurant la taille testiculaire d'enfants en croissance a mis en évidence un arrêt du développement testiculaire coïncidant avec l'apparition d'une varicocèle et une normalisation de la taille testiculaire après traitement [27].

5. LES DIFFERENTS TRAITEMENTS

Il y a deux approches thérapeutiques de la varicocèle : la chirurgie et l'embolisation percutanée. Le traitement chirurgical de la varicocèle peut être réalisé par différentes voies d'abord : rétropéritonéale, inguinale ou subinguinale, ou par laparoscopie. Le traitement par embolisation percutanée est réalisé par cathétérisme puis embolisation de la (ou des) veine(s) spermatique(s) refluate(s). Aucune de ces méthodes n'a fait la preuve de sa supériorité par rapport aux autres dans l'aptitude à améliorer la fertilité [28-32].

Traitement chirurgical

Il nécessite souvent une anesthésie générale ou loco-régionale, mais le traitement sous anesthésie locale est possible [29].

La plupart des experts réalisent une chirurgie par voie inguinale ou sub-inguinale utilisant des loupes grossissantes ou un microscope opératoire, de façon à préserver artères et lymphatiques et à réduire le risque d'échec ou de récurrence [33-43]. Le traitement par laparoscopie comporte un risque de complications intra-péritonéales majeures telle une plaie intestinale, vésicale ou vasculaire. Bien que rares, ces complications sont sévères et peuvent nécessiter une laparotomie correctrice [44-48].

Traitement par embolisation percutanée

L'embolisation percutanée permet de traiter la varicocèle avec moins de douleur qu'après une chirurgie classique par voie inguinale. Cette technique de radiologie interventionnelle, réalisée

sous anesthésie locale ambulatoire, nécessite un opérateur très expérimenté. Mais même dans ce cas, le cathétérisme des vaisseaux spermatiques ne peut pas toujours être réalisé [49-57].

Complications

Les complications potentielles du traitement des varicocèles sont peu fréquentes et habituellement sans gravité. L'ensemble des techniques chirurgicales expose à un faible risque d'infection de paroi, d'hydrocèle, de persistance ou de récurrence de la varicocèle et, rarement, d'atrophie testiculaire (Tableau 2).

6. RESULTATS DU TRAITEMENT :

L'ensemble des traitements permet de traiter efficacement plus de 90% des varicocèles [36]. Les résultats de l'embolisation percutanée sont cependant variables et dépendent de l'expérience et de la compétence du radiologue interventionnel. La plupart des études rapportent que les paramètres du spermogramme sont améliorés dans la majorité des cas après traitement de la varicocèle [12, 13, 58, 14].

Fertilité du couple

De nombreuses études concernant l'amélioration de la fertilité après traitement de la varicocèle ont été publiées. Les conclusions de la plupart d'entre elles ne sont malheureusement pas exploitables, soit en raison d'un effectif de patients insuffisant, soit en raison de l'absence de randomisation ou de population contrôle. Il n'a donc pas été possible, à ce jour, de conclure clairement quant à l'amélioration de la fertilité après traitement de la varicocèle. Cinq études prospectives randomisées sur le traitement des varicocèles de l'adulte ont donné des résultats contradictoires [59-63]. Dans une série, incluant 10 centres avec randomisation externe d'hommes ayant une infertilité avec oligospermie modérée (5-20 x 10⁶/ml) et une varicocèle de grade 2 à 3, le traitement immédiat de la varicocèle a été significativement plus efficace que le traitement différé d'un an sur le taux de grossesse à terme et la fécondabilité (taux de grossesses par cycle). Une méta-analyse controversée des cinq études n'a pas retrouvé de bénéfice significatif en faveur du traitement [64,92]. Plusieurs études suggèrent que des anomalies du bilan endocrinien (FSH, Inhibine, test LHRH) peuvent être prédictifs au bénéfice du traitement [65, 66].

Une étude prospective randomisée concernant le traitement de la varicocèle infra-clinique n'a constaté aucun bénéfice sur la fertilité après traitement [67].

La fertilité féminine : facteur de confusion dans l'analyse des résultats

L'analyse de l'étude sur l'infertilité masculine réalisée par l'OMS [68] indique qu'il y a un excès de couples où les deux partenaires ont un facteur d'infertilité par rapport au taux attendu dans la population générale. Ces données suggèrent qu'une cause mineure de réduction de la fertilité, comme la présence d'une varicocèle, ne se manifestera que chez les couples où il existe également un facteur d'infertilité féminine [69]. Un certain nombre d'études ont comparé le traitement de la varicocèle à l'abstention thérapeutique chez des patients présentant une varicocèle palpable et des anomalies spermatiques alors que la fertilité féminine était normale [59, 58]. La plupart mettaient en évidence une amélioration de la fertilité après traitement de la varicocèle. La majorité de ces études ne sont cependant pas randomisées.

Une méta-analyse de 12 études comparatives avec un recul d'un an retrouvait un taux de grossesse de 33% (intervalle de confiance (IC) de 95%, écart type (ET) de 28 à 39%), chez les couples dont l'homme avait eu un traitement de la varicocèle, et 16% (IC de 95%, ET de 13 à 20%) chez les couples dont l'homme n'était pas traité pour sa varicocèle [70].

Deux études comparatives randomisées ont étudié les hommes ayant une varicocèle palpable avec anomalie spermatique au spermogramme et fertilité féminine normale [61, 62]. La première ne retrouvait pas d'amélioration du taux de grossesse après traitement de la varicocèle mais une amélioration significative du volume testiculaire et des paramètres spermatiques [62]. L'autre étude, utilisant un modèle en "crossover", montrait une amélioration significative de la fertilité après traitement de la varicocèle [61]. Le taux de conception chez les couples dont l'homme avait eu un traitement de la varicocèle était de 60% dans la première année suivant l'intervention comparativement à seulement 10% dans le groupe contrôle des patients présentant une varicocèle non traitée.

Traitement de la varicocèle et reproduction médicalement assistée

Le traitement de la varicocèle ou la réalisation d'une procréation médicalement assistée sont des options pour la prise en charge d'un couple ayant une infertilité masculine et dont l'homme est porteur d'une varicocèle. Le principal argument en faveur du traitement de la varicocèle réside dans le fait de traiter une condition pathologique, susceptible de réaliser un traitement définitif de l'infertilité, à l'opposé des techniques de reproduction médicalement assistée qui doivent être répétées à chaque désir de grossesse. Les autres arguments sont : les inconnues concernant les effets à long terme de la FIV et de l'ICSI sur la descendance (effets résultants de ces techniques) et la possibilité d'un meilleur rapport coût/efficacité du traitement de la varicocèle par rapport aux techniques de PMA [69, 70]. Enfin, la varicocèle non traitée peut entraîner un déclin rapide de la spermatogenèse risquant de compromettre la fertilité masculine ultérieure [71-73]. Le traitement de la varicocèle n'est habituellement pas indiqué en première intention chez les couples pour lesquels une technique de FIV est rendue nécessaire afin de pallier un facteur féminin [82]. Cependant, il y a certaines circonstances où

le traitement de la varicocèle devra être envisagé avant d'initier une assistance médicale à la procréation, même si un facteur féminin est présent. Il a été rapporté notamment que le traitement de la varicocèle permet de restaurer une faible quantité de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat chez les patients ayant une azoospermie non obstructive due à une hypospermatogénèse [74-77], permettant d'éviter dans certains cas la réalisation d'une ICSI avec prélèvement de spermatozoïdes testiculaires.

7. SURVEILLANCE APRES TRAITEMENT

Après traitement de la varicocèle, le suivi des patients doit permettre de rechercher la persistance ou la récurrence de la varicocèle. Dans ces cas, il est recommandé de réaliser une veinographie spermatique pour identifier le site du reflux veineux persistant. Un traitement complémentaire (chirurgical ou embolisation percutanée) de cette veine refluyente peut être envisagé. Le contrôle de l'amélioration des paramètres spermatiques doit être réalisé par un spermogramme trois mois après traitement, puis tous les trois mois pendant au moins un an.

8. CONCLUSIONS

Un certain nombre de données tendent à démontrer que la présence d'une varicocèle est associée, chez certains hommes, à une altération progressive de la fonction testiculaire à partir de l'adolescence avec pour conséquence une réduction de la fertilité. Il semble cependant que l'altération de la fertilité due à la varicocèle se manifeste surtout chez les couples infertiles s'il existe une atteinte de la fertilité féminine ou si d'autres facteurs masculins d'infertilité sont associés. Bien que le traitement de la varicocèle chez les adolescents puisse prévenir une infertilité potentielle, le risque de traitement inutile est important s'il est systématique.

Le traitement chirurgical ou par embolisation percutanée sont deux options possibles dans le traitement de la varicocèle à condition, dans les deux cas, de disposer d'un opérateur expérimenté et entraîné.

POINTS FORTS :

1 L'évaluation de routine d'un homme ayant une varicocèle doit comporter un interrogatoire complet comprenant les antécédents médicaux et reproductifs, un examen clinique et au moins deux spermogrammes. L'échographie peut être utile chez l'homme infertile pour dépister les pathologies associées, notamment les tumeurs testiculaires.

2 Le traitement de la varicocèle doit être proposé si toutes les conditions suivantes sont présentes : 1/ La varicocèle est palpable ; 2/ l'infertilité du couple est documentée ; 3/ Il n'existe pas de problème d'infertilité féminine ou celle-ci est potentiellement curable ; 4/ Il existe au moins une anomalie des paramètres spermatiques au spermogramme.

3 Le traitement de la varicocèle doit être proposé aux adolescents ayant une varicocèle et une diminution du volume testiculaire homolatéral. Les adolescents ayant une varicocèle associée à un testicule de volume normal doivent être surveillés annuellement avec mesure objective du volume testiculaire et/ou un spermogramme s'il est réalisable.

4 Le traitement chirurgical ou par embolisation percutanée sont deux options possibles dans le traitement de la varicocèle à condition, dans les deux cas, de disposer d'un opérateur expérimenté et entraîné.

5 Le traitement de la varicocèle peut être considéré comme le traitement de première intention chez un patient ayant une oligo-asthéo-téatospermie modérée sans facteur d'infertilité féminine associé. Le traitement de la varicocèle pourra être envisagé de façon concomitante à une AMP pour améliorer la fécondance du sperme

6 La persistance ou la récurrence de la varicocèle peut être traitée par chirurgie ou par embolisation percutanée à condition de réaliser une veinographie spermatique pour identifier le site du reflux veineux persistant. Après traitement de la varicocèle, un spermogramme doit être réalisé à trois mois, puis tous les trois mois pendant un an ou jusqu'à survenue de la grossesse.

TABLEAUX :

Tableau 1 : Incidence de la varicocèle dans la population générale :

Référence	Nombre de patients	Age	Incidence
Oster 1971	837	10-19	16.2%
Steen 1976	4067	12-25	14.7%
Yerokhin 1979	10000	10-17	12.4%
Belloli 1993	9861	10-16	16.0%
Niedzielski 1997	2478	10-20	17.8%

Tableau 2 : Technique chirurgicale, complications, taux de récurrence et coût.

Référence	technique	Taux d'hydrocèle	Taux de récurrence
Paduch 1997	retro péritonéal	7%-10%	9%-11%
Palmer 1997	inguinal	3%-7%	9%-12%
Marmar 1994	Inguinal microscopique	<1%	0.6%-2.1%
Belloli 1996	Laparoscopique	1.25%	1.25%-9%
Feneley 1997	Embolisation	-	19%

REFERENCES :

1. DOHLE G., WEIDNER W., JUNGWIRTH A., COLPI G., PAPP G., POMEROL J., HARGREAVE T. : EAU guidelines on male infertility. In : EAU Guidelines, European Association of Urology, 2004 ; 30-32.
2. MALE INFERTILITY BEST PRACTICE POLICY COMMITTEE OF THE AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION : Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine : Report on varicocele and infertility. Fertil. Steril., 2004 ; 82 : S142-145.
3. PETERSON A.C., LANCE R.S., RUIZ H.E. : Outcomes of varicocele ligation done for pain. J. Urol., 1998 ; 159 : 1565-1567.
4. HARGREAVE T. : Varicocele. In: Male Infertility. Hargreave T., ed. Berlin, Springer Verlag, 1994.
5. KURSH E.D. : What is the incidence of varicocele in a fertile population? Fertil. Steril., 1987 ; 48 : 510-511.
6. FONTAINE E., BENOIT G., JARDIN A., BEURTON D. : La varicocèle de l'adolescent. Prog Urol, 2000 ; 10 : 1099-1107.
7. NAGLER H.M., LUNTZ R., MARTINIS F. : Varicocele. In : Infertility in the male. Howard S., ed. St Louis, Mosby, 1997 ; 336-359.

8. NIESCHLAG E., HERTLE L., FISCHEDICK A., BEHRE H.M. : Treatment of varicocele : counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum. Reprod.*, 1995 ; 10 : 347-353.
9. WHO : The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil. Steril.*, 1992 ; 57 : 1289-1293.
10. WHO : WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.
11. HUDSON R.W., PEREZ-MARRERO R.A., CRAWFORD V.A., MCKAY D.E. : Hormonal parameters in incidental varicoceles and those causing infertility. *Fertil. Steril.*, 1986 ; 45 : 692-700.
12. MARMAR J.L., BENOFF S. : Varicoceles. *J. Urol.*, 2006 ; 175 : 818-819.
13. NAGLER H.M. : Varicocele. Where, why and, if so, how ? *J. Urol.*, 2004 ; 172 : 1239-1240.
14. WAGNER L. : Varicocèle : traiter ou ne pas traiter ? Quand et comment ? *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2004 ; 32 : 252-255.
15. HADDAD O., LEROY X., LEMAITRE L., BISERTE J., RIGOT J.M. : Infertilité et tumeurs du testicule : A propos de 25 patients. *Prog. Urol.*, 2005 ; 15 : 1096-1100.
16. OKUYAMAA., NAKAMURA M., NAMIKI M., TAKEYAMA M., UTSUNOMIYA M., FUJIOKA H., ITATANI H., MATSUDA M., MATSUMOTO K., SONODA T. : Surgical repair of varicocele at puberty : preventive treatment for fertility improvement. *J. Urol.*, 1988 ; 139 : 562-564.
17. PADUCH D.A., NIEDZIELSKI J. : Repair versus observation in adolescent varicocele : a prospective study. *J. Urol.*, 1997 ; 158 : 1128-1132.
18. SIGMAN M., JAROW J.P. : Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. *J. Urol.*, 1997 ; 158 : 605-607.
19. YAMAMOTO M., HIBI H., KATSUNO S., MIYAKE K. : Effects of varicocelectomy on testis volume and semen parameters in adolescents : a randomized prospective study. *Nagoya J. Med. Sci.*, 1995 ; 58 : 127-132.
20. BONG G.W., KOO H.P. : The adolescent varicocele: to treat or not to treat. *Urol. Clin. North Am.*, 2004 ; 31 : 509-515.
21. CAYAN S., ACAR D., ULGER S., AKBAY E. : Adolescent varicocele repair : long-term results and comparison of surgical techniques according to optical magnification use in 100 cases at a single university hospital. *J. Urol.*, 2005 ; 174 : 2003-2007.
22. DIAMOND D.A., ZURAKOWSKI D., ATALA A., BAUER S.B., BORER J.G., CILENTO B.G. JR., PALTIEL H., PETERS C.A., RETIK A.B. : Is adolescent varicocele a progressive disease process ? *J. Urol.*, 2004 ; 172 : 1746-1748.
23. KU J.H., KIM S.W., PARK K., PAICK J.S. : Benefits of microsurgical repair of adolescent varicocele : comparison of semen parameters in fertile and infertile adults with varicocele. *Urology*, 2005 ; 65 : 554-558.
24. SCHIFF J., KELLY C., GOLDSTEIN M., SCHLEGEL P., POPPAS D. : Managing varicoceles in children : results with microsurgical varicocelectomy. *BJU Int.*, 2005 ; 95 : 399-402.
25. ZAUPA P., MAYR J., HOLLWARTH M.E. : Antegrade scrotal sclerotherapy for treating primary varicocele in children. *BJU Int.*, 2006 ; 97 : 809-812.
26. LAVEN J.S., HAANS L.C., MALI W.P., TE VELDE E.R., WENSING C.J., EIMERS J.M. : Effects of varicocele treatment in adolescents : a randomized study. *Fertil. Steril.*, 1992 ; 58 : 756-762.
27. BUTLER G., RATCLIFFE S. : *Serono Symposia Reviews*, 1984.
28. GHANEM H., ANIS T., EL-NASHAR A., SHAMLOUL R. : Subinguinal microvaricocelectomy versus retroperitoneal varicocelectomy: comparative study of complications and surgical outcome. *Urology*, 2004 ; 64 : 1005-1009.

29. GONTERO P., PRETTI G., FONTANA F., ZITELLA A., MARCHIORO G., FREA B. : Inguinal versus subinguinal varicocele vein ligation using magnifying loupe under local anesthesia : which technique is preferable in clinical practice ? *Urology*, 2005 ; 66 : 1075-1079.
30. HOPPS C.V., LEMER M.L., SCHLEGEL P.N., GOLDSTEIN M. : Intraoperative varicocele anatomy : a microscopic study of the inguinal versus subinguinal approach. *J. Urol.*, 2003 ; 170 : 2366-2370.
31. WATANABE M., NAGAI A., KUSUMI N., TSUBOI H., NASU Y., KUMON H. : Minimal invasiveness and effectivity of subinguinal microscopic varicocelectomy : a comparative study with retroperitoneal high and laparoscopic approaches. *Int. J. Urol.*, 2005 ; 12 : 892-898.
32. WILLIAMS D.H., KARPMAN E., LIPSHULTZ L.I. : Varicocele: surgical techniques in 2005. *Can. J. Urol.*, 2006 ; 13 : 13-17.
33. AMELAR R.D. : Early and late complications of inguinal varicocelectomy. *J. Urol.*, 2003 ; 170 : 366-369.
34. BASSI R., RADICE F., BERGAMI G., DE GRAZIA F., PAPA B. : Surgical treatment of varicocele. Our experience in the last 10 years. *Minerva Chir.*, 1996 ; 51 : 533-536.
35. COLPI G.M., CARMIGNANI L., NERVA F., PIEDIFERRO G., CASTIGLIONI F., GRUGNETTI C., GALASSO G. : Surgical treatment of varicocele by a subinguinal approach combined with antegrade intraoperative sclerotherapy of venous vessels. *BJU Int.*, 2006 ; 97 : 142-145.
36. GABRIELE R., CONTE M., EGIDI F., PIETRASANTA D., BORGHESE M. : Results of surgical treatment of varicocele in male infertility. *G. Chir.*, 2005 ; 26 : 431-433.
37. GOLDSTEIN M. : Varicocelectomy : General considerations. In : *Surgery of male infertility*. Goldstein M., ed. Philadelphia, WB Saunders, 1995 ; 169-172.
38. GOLDSTEIN M., GILBERT B.R., DICKER A.P., DWOSH J., GNECCO C. : Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis : an artery and lymphatic sparing technique. *J. Urol.*, 1992 ; 148 : 1808-1811.
39. GROBER E.D., CHAN P.T., ZINI A., GOLDSTEIN M. : Microsurgical treatment of persistent or recurrent varicocele. *Fertil. Steril.*, 2004 ; 82 : 718-722.
40. GROBER E.D., O'BRIEN J., JARVI K.A., ZINI A. : Preservation of testicular arteries during subinguinal microsurgical varicocelectomy : clinical considerations. *J. Androl.*, 2004 ; 25 : 740-743.
41. MCDOUGALL E. : Minimally invasive therapy. *J. Urol.*, 1995 ; 153 : 712- 713.
42. SCHWENTNER C., OSWALD J., LUNACEK A., DEIBL M., BARTSCH G., RADMAYR C. : Optimizing the outcome of microsurgical subinguinal varicocelectomy using isosulfan blue : a prospective randomized trial. *J. Urol.*, 2006 ; 175 : 1049-1052.
43. WALLIJN E., DESMET R. : Hydrocele : a frequently overlooked complication after high ligation of the spermatic vein for varicocele. *Int. J. Androl.*, 1978 ; 1 : 411-415.
44. AL-HUNAYAN A., ABDULHALIM H., KEHINDE E.O., EL-BARKY E., AL-AWADI K., AL-ATEEQI A. : Two-trocar laparoscopic varicocelectomy: cost-reduction surgical technique. *Urology*, 2006 ; 67 : 461-465.
45. HASSAN J.M., ADAMS M.C., POPE J.C.T., DEMARCO R.T., BROCK J.W., 3RD : Hydrocele formation following laparoscopic varicocelectomy. *J.Urol.*, 2006 ; 175 : 1076-1079.
46. MCMANUS M.C., BARQAWI A., MEACHAM R.B., FURNESS P.D., 3RD, KOYLE M.A. : Laparoscopic varicocele ligation : are there advantages compared with the microscopic subinguinal approach ? *Urology*, 2004 ; 64 : 357-360.
47. MIERSCH W.D., SCHOENEICH G., WINTER P., BUSZELLO H. : Laparoscopic varicocelectomy : indication, technique and surgical results. *Br. J. Urol.*, 1995 ; 76 : 636-638.
48. TAN S.M., NG F.C., RAVINTHARAN T., LIM P.H., CHNG H.C. : Laparoscopic varicocelectomy: technique and results. *Br. J. Urol.*, 1995 ; 75 : 523-528.

49. FENELEY M.R., PAL M.K., NOCKLER I.B., HENDRY W.F. : Retrograde embolization and causes of failure in the primary treatment of varicocele. *Br. J. Urol.*, 1997 ; 80 : 642-646.
50. GAZZERA C., RAMPADO O., SAVIO L., DI BISCEGLIE C., MANIERI C., GANDINI G. : Radiological treatment of male varicocele : technical, clinical, seminal and dosimetric aspects. *Radiol. Med. (Torino)*, 2006 ; 111 : 449-458.
51. LENK S., FAHLENKAMP D., GLIECH V., LINDEKE A. : Comparison of different methods of treating varicocele. *J. Androl.*, 1994 ; 15 : 34S-37S.
52. LENZ M., HOF N., KERSTING-SOMMERHOFF B., BAUTZ W. : Anatomic variants of the spermatic vein : importance for percutaneous sclerotherapy of idiopathic varicocele. *Radiology*, 1996 ; 198 : 425-431.
53. NABI G., ASTERLINGS S., GREENE D.R., MARSH R.L. : Percutaneous embolization of varicoceles : outcomes and correlation of semen improvement with pregnancy. *Urology*, 2004 ; 63 : 359-363.
54. SEYFERTH W., JECHT E., ZEITLER E. : Percutaneous sclerotherapy of varicocele. *Radiology*, 1981 ; 139 : 335-340.
55. SIGMUND G., BAHREN W., GALL H., LENZ M., THON W. : Idiopathic varicoceles : feasibility of percutaneous sclerotherapy. *Radiology*, 1987 ; 164 : 161-168.
56. TAUBER R., JOHNSEN N. : Antegrade scrotal sclerotherapy for the treatment of varicocele : technique and late results. *J. Urol.*, 1994 ; 151 : 386-390.
57. THON W., SIGMUND G., BAHREN W., STEINMANN J. : Perkutane sklerotherapie bei vena testicularis insuffizienz. Percutaneous sclerotherapy of testicular vein insufficiency. *Akt. Urol.*, 1986 ; 17 : 240-243.
58. SCHLESINGER M.H., WILETS I.F., NAGLER H.M. : Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *Urol. Clin. North Am.*, 1994 ; 21 : 517-529.
59. BREZNIK R., VLAISAVLJEVIC V., BORKO E. : Treatment of varicocele and male fertility. *Arch. Androl.*, 1993 ; 30 : 157-160.
60. HARGREAVE T. : Varicocele : Overview and commentary on the results of the WHO varicocele trial. In : *Current advances in Andrology. Proceedings of the VIth International Congress of Andrology, Salzburg, Austria.* Baker G., ed. Bologna, Monduzzi Editore, 1997 ; 31-44.
61. MADGAR I., WEISSENBERG R., LUNENFELD B., KARASIK A., GOLDWASSER B. : Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil. Steril.*, 1995 ; 63 : 120-124.
62. NIESCHLAG E., HERTLE L., FISCHEDICK A., ABSHAGEN K., BEHRE H.M. : Update on treatment of varicocele : counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum. Reprod.*, 1998 ; 13 : 2147-2150.
63. NILSSON S., EDVINSSON A., NILSSON B. : Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the internal spermatic vein: fact or fiction ? *Br. J. Urol.*, 1979 ; 51 : 591-596.
64. EVERS J.L., COLLINS J.A. : Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility : a systematic review. *Lancet*, 2003 ; 361 : 1849-1852.
65. HUDSON R.W. : Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligozoospermic men with varicoceles. *Fertil. Steril.*, 1996 ; 66 : 299-304.
66. KASS E. : Pediatric varicocele. In : *Pediatric Urology.* Koff S., ed. Oxford, Butterworth Heinemann, 1996 ; 608-617.
67. YAMAMOTO M., HIBI H., HIRATA Y., MIYAKE K., ISHIGAKI T. : Effect of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate in patients with subclinical varicocele : a randomized prospective controlled study. *J. Urol.*, 1996 ; 155 : 1636-1638.
68. WHO : Towards more objectivity in diagnosis and management of male fertility. Results of a World Health Organization multicentre study. *Int. J. Androl.*, 1987.
69. O'BRIEN J.H., BOWLES B., KAMAL K.M., JARVI K., ZINI A. : Microsurgical varicocelectomy for infertile couples with advanced female age : natural history in the era of ART. *J. Androl.*, 2004 ; 25 : 939-943.

70. SCHLEGEL P.N. : Is assisted reproduction the optimal treatment for varicocele- associated male infertility ? A cost-effectiveness analysis. *Urology*, 1997 ; 49 : 83-90.
71. CHEHVAL M.J., PURCELL M.H. : Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele : evidence of progressive testicular damage. *Fertil. Steril.*, 1992 ; 57 : 174-177.
72. GORELICK J.I., GOLDSTEIN M. : Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil. Steril.*, 1993 ; 59 : 613-616.
73. WITT M.A., LIPSHULTZ L.I. : Varicocele : a progressive or static lesion ? *Urology*, 1993 ; 42 : 541-543.
74. KIM E.D., LEIBMAN B.B., GRINBLAT D.M., LIPSHULTZ L.I. : Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J. Urol.*, 1999 ; 162 : 737-740.
75. MATTHEWS G.J., MATTHEWS E.D., GOLDSTEIN M. : Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Fertil. Steril.*, 1998 ; 70 : 71-75.
76. NIEDERBERGER C. : Induction of spermatogenesis in azoospermic men after internal spermatic vein embolization for the treatment of varicocele. *J. Urol.*, 2005 ; 174 : 1942.
77. PASQUALOTTO F.F., SOBREIRO B.P., HALLAK J., PASQUALOTTO E.B., LUCON A.M.: Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocelectomy repair : an update. *Fertil. Steril.*, 2006 ; 85 : 635-639.
78. VASAVADA S., ROSS J., NASRALLAH P., KAY R.,: Prepubertal varicoceles. *Urology* ,1997,50,774-777
79. FONTAINE E., BENOIT G., JARDIN A., BEURTON D. : La varicocèle de l'adolescent. *Progres en Urologie*, 2000, 10,1099-1107
80. RISSER W.L., LIPSHULTZ L.I. : Frequency of varicocele in black adolescents. *J. Adolesc. Health care* ,1984,5,28-29
81. SCARAMUZA A., TAVAN R., MARCHI A. : Varicoceles in young soccer players. *Lancet*, 1996 ,348,1180-1181
82. WAGNER L., TOSTAIN J. : Varicocèle et infertilité masculine . *Progrès en Urologie* 2007,17,1-6
83. CAMERON D.F., SNYDLE F.E., ROSS M.H., DRYLIE D.M. : Ultrastructural alterations in the adluminal testicular compartment in men with varicocele. *Fertil. Steril.*, 1980,33,526-533
84. HADZISELIMOVIC F., HERZOG B., LIEBUNDGUT B., JENNY P., BUSER M.: Testicular and vascular changes in children and adults with varicocele. *J Urol.*, 1989,142,583-585
85. JOHNSON S.G., AGGER P.: Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation after varicocele . *Fertil. Steril.*, 1978,29,58-63.
86. KASS E J., CHANDRAR S., BELMAN A.B.: Testicular histology in the adolescent with a varicocele . *Pediatrics*, 1987,79,996-998
87. STECKEL J., DICKER A.P., GOLDSTEIN M.: Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. *J.Urol.*, 1993,149,769-771
88. VERECKEN R.L., BOECKX G.: Does fertility improvement after varicocele treatment justify preventive treatment at puberty? *Urology*, 1986,28,122-126
89. PRYOR J.L., HOWARD S.S.: Varicocele. *Urol. Clin. North. Am.* ,1987, 138, 1038-1040.
90. PADUCH D., SKOOG S.: Current management of adolescent varicocele. *Reviews in Urology* 2001,vol3 ,120-133.
91. LIANG C., WANG K., CHEN J.: Epidemiological study of external genital diseases in 5172 adolescents. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1997,77,15-7
92. FICARRA V., CERRUTO MA., LIGUORI G., MAZZONIG., MINUCCI S., TRACIA A., GENTILE V. : Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review--a contrary opinion. *Eur. Urol.* 2006,49, 258-63.

ASPECTS GENETIQUES DE L'INFERTILITE MASCULINE

Dr Louis BUJAN

CECOS Midi-Pyrénées, Hôpital Paule de Viguière, Toulouse

1. INTRODUCTION

Environ 15% de couples vont être amenés à consulter pour des problèmes d'infécondité.

Approximativement, dans un cas sur deux l'homme sera impliqué dans l'infécondité du couple de manière isolée ou associée. L'origine de la fécondité chez l'homme peut être due à différentes causes. Les causes infectieuses sont bien connues, les affections pathologiques touchant le tractus génital et les antécédents andrologiques représentant un facteur de risque pour la fertilité sont également connus. Des causes environnementales ont été également décrites et un accent particulier est mis dans la recherche des liens entre environnement et spermatogenèse. Cependant l'étiologie de nombreuses stérilités masculines n'est pas précisément définie. Dans ce contexte, plusieurs causes génétiques de stérilité masculine sont actuellement bien connues et répertoriées mais probablement d'autres seront découvertes avec l'avancée des moyens d'investigations géniques et surtout la description parfaite des tableaux phénotypiques et familiaux.

Chez l'animal, l'invalidation génique a mis en évidence l'implication de très nombreux gènes dans la fonction de reproduction.

La fonction de reproduction masculine va nécessiter chez l'homme la mise en place des organes génitaux, de la spermatogenèse, l'intégrité du tractus génital et enfin l'intégrité des fonctions du spermatozoïde.

Certaines affections peuvent être découvertes très tôt après la naissance, comme par exemple l'insensibilité aux androgènes qui peut entraîner des tableaux variables allant de l'hermaphrodisme complet à une éventuelle infécondité. Ces tableaux sont découverts en règle générale en pédiatrie.

Nous ne nous intéresserons ici qu'aux facteurs génétiques de la stérilité masculine chez les hommes venant consulter pour infécondité.

De manière très schématique, l'on pourrait diviser les causes génétiques des anomalies de la fonction de reproduction de l'homme adulte en 4 secteurs :

- 1°- les causes pré-testiculaires,
- 2°- les causes testiculaires,
- 3°- les causes post-testiculaires,
- 4°- les syndromes particuliers du spermatozoïde.

Il faut souligner d'emblée que la recherche d'une origine génétique à la stérilité suppose que celle-ci ait été diagnostiquée et le tableau clinique et biologique parfaitement décrit. C'est en effet sur les éléments du tableau clinique et biologique, sur l'histoire du patient et de la famille, que la stratégie d'exploration génétique va être mise en place.

Enfin, il est utile de préciser qu'un examen génétique nécessite d'une part, une prescription médicale et d'autre part, le consentement du patient sur lequel cet examen va être réalisé.

Il est absolument indispensable d'informer dès le départ le patient des possibles résultats attendus de l'examen génétique.

Ces résultats devront être remis au patient lors de la consultation et la mise en évidence d'une anomalie impose une consultation avec un généticien. Il est important d'avoir à l'esprit que les résultats vont intéresser les patients mais également peuvent être d'un grand intérêt pour la famille et la descendance.

2. CAUSE PRE-TESTICULAIRE

2.1. Syndrome de Kallmann de Morsier

Le plus souvent le patient consultera pour un retard pubertaire et cette pathologie sera en règle générale connue antérieurement à la recherche d'une fertilité.

Il s'agit d'une hypogonadisme hypothalamique par déficit en GNRH. Ce déficit en GNRH s'accompagne le plus souvent d'une anosmie due à l'atrophie du bulbe olfactif. Des anomalies cranio-faciales ont été également décrites (fente palatine, voute ogivale, anomalie du ventricule) et peuvent être associées à la présence d'une cryptorchidie ou d'anomalie rénale. Cette affection est rare et touche environ 1 homme sur 10 000.

La fréquence plus importante chez l'homme comparé à la femme a fait suspecter un gène sur le chromosome X. Ainsi un gène a été mis en évidence dans le syndrome de Kallman lié à l'X, : Kal-1 ou Kal-X qui est situé sur le chromosome Xp22.3. Ce gène code pour une protéine responsable de la migration des neurones à GNRH de la plaque olfactive vers l'hypothalamus.

Des formes sporadiques du syndrome de Kallman ont été décrites avec l'absence de mutation dans le gène Kal-1 ou des formes à transmission non liée à l'X.

Par ailleurs en dehors du syndrome de Kallmann, il est à noter de manière exceptionnelle la possibilité de mutation dans le gène du récepteur au GNRH

2.2. Anomalies géniques des gonadotrophines ou de leur récepteur.

Ces affections sont extrêmement rares. Elles peuvent se traduire en ce qui concerne la LH, par des anomalies de l'appareil génital pouvant créer une hermaphrodisme et par un retard pubertaire.

Les anomalies concernant la FSH semblent avoir été décrites dans la stérilité féminine, chez l'homme elle sont responsables d'une altération de la spermatogenèse qui ne semble pas affecter la fertilité.

2.3. Syndrome poly-malformatif avec hypogonadisme

2.3.1 Syndrome de Bardet-Biedl.

Il s'agit d'un syndrome exceptionnel autosomique récessif se traduisant par une obésité, une polydactylie, un retard mental, une rétinite pigmentaire, des malformations rénales et un hypogonadisme d'origine hypothalamique.

Cet hypogonadisme est associé le plus souvent chez l'homme à une cryptorchidie, un micro-pénis et un hypospadias dont le degré peut être variable.

Au niveau moléculaire, ce syndrome est hétérogène et il semble y avoir plusieurs loci impliqués dans ce syndrome sur les chromosomes 11, 16, 3 et 15.

2.3.2 Syndrome de Prader-Willi

Il s'agit d'une affection rare associant une obésité, un retard mental, une hypotonie, des petites mains et des petits pieds ainsi qu'un déficit en GNRH.

Les $\frac{3}{4}$ des patients porteurs d'un syndrome de Prader-Willi sont porteurs d'une délétion du bras long du chromosome 15 ayant pour conséquence probable, la non expression de gènes paternels. Il peut également y avoir des anomalies cranio-faciales.

2.3.3 Ataxie cérébelleuse

Il s'agit d'un syndrome associant trouble de la parole et de l'équilibre avec un tableau d'hypogonadisme. Si ce syndrome est découvert tôt on se retrouve devant une insuffisance hypothalamo-hypophysaire. Découvert plus tard, il s'agit d'une insuffisance hypothalamique. L'affection est autosomique récessive, la consanguinité la favorisant.

2.4. Pathologies hématologiques

Certaines pathologies hématologiques peuvent entraîner des atteintes au niveau hypothalamique ou testiculaire.

2.4.1 Anémie falciforme.

Affection rare, plus fréquente auprès de la population noire ou elle touche une personne sur 600. Elle est due à un défaut du gène de l'hémoglobine porté par le chromosome 11 et c'est une affection autosomique récessive. Le mécanisme physiopathologique va être la création de micro-infarctus au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou du testicule. Cette affection peut entraîner une infécondité.

2.4.2 Bêta-thalassémie.

Cette affection autosomique dominante est fréquente dans la population méditerranéenne puisqu'elle peut toucher 3 à 5 personnes sur 100. Par ailleurs elle est aussi fréquent dans le sud-est asiatique, l'Afrique et les Antilles. Des mutations sur le gène de la chaîne bêta, porté par le chromosome 11, sont responsables de l'anomalie. Elle va se traduire par une anémie et une surcharge en fer et dans le cas

des thalassémies sévères (formes homozygotes) va entraîner des dépôts ferriques au niveau de l'hypophyse et du testicule pouvant avoir comme conséquence des problèmes d'infécondité.

3. LES CAUSES TESTICULAIRES

3.1. Tableaux exceptionnels poly-malformatifs

Plusieurs tableaux polymalformatifs peuvent être associés à une infécondité masculine. Il n'est pas possible de les décrire tous mais ces tableaux sont parfaitement connus des généticiens. Comme illustration nous en décrivons deux qui peuvent éventuellement consulter pour infécondité :

3.1.1 Syndrome de Noonan

Il s'agit d'un syndrome touchant une personne sur 1 000 ou 5 000, responsable de malformations congénitales, matérialisé par une petite taille, un hypertélorisme (écartement des yeux), une débilité, un retard mental, un ptérygium coli. (élargissement du cou avec éventuellement replis) et une malformation cardiaque avec une sténose de la valve pulmonaire et atrophie myocardique.

Environ la moitié des hommes sont inféconds, cette infécondité étant associée à une cryptorchidie et une atrophie testiculaire. Cette affection est autosomique dominante avec un gène identifié sur le chromosome 12 (50% des patients ont une mutation dans le gène PRPN11 protéine kinase phosphatase non receptor type 11) mais d'autres associations ont été mises en évidence avec la neurofibromatose de type 1 ou des délétions au niveau du chromosome 22.

3.1.2 Myotonie atrophique ou maladie de Steinert.

Il s'agit d'une affection autosomique dominante d'expressivité variable. Le gène DMPK, codant pour une protéine kinase, est localisé sur le chromosome 19. L'expressivité va dépendre du nombre de séquences CTG répétées. Cette affection va se traduire par une myotonie avec une lenteur et difficulté de décontraction lors des mouvements volontaires, plus tardivement une atrophie musculaire qui touche plus particulièrement les muscles de la face et du cou dans un premier temps. Elle peut être associée à des problèmes de cataracte, de conduction cardiaque et au niveau testiculaire, à une atrophie testiculaire avec la sclérose du tube séminifère.

3.2. Anomalies chromosomiques

Ces anomalies vont intéresser soit le nombre des chromosomes, soit la structure des chromosomes. Les anomalies de structure vont pouvoir être visualisées lors de l'examen cytogénétique ou dans le cas d'anomalies très minimes comme les micro-délétions, lors d'examens en biologie moléculaire.

Ces anomalies ont pour conséquence une altération de la spermatogenèse, soit parce que le remaniement chromosomique va supprimer un ou plusieurs gènes impliqués dans la spermatogenèse, soit parce que le remaniement va empêcher le bon appariement des chromosomes homologues lors de la méiose et déclencher un arrêt mécanique de la méiose.

3.2.1 Anomalies du caryotype

Les infections des chromosomes sexuels (gonosomes) sont plus fréquentes lors de l'azoospermie alors que les anomalies des autosomes, elles sont plus fréquentes dans les oligospermies que dans le cadre des azoospermies.

Dans une série étudiée dans notre centre par le Dr Georges Bourrouillou, 7,7% des patients présentaient une anomalie chromosomique mise en évidence au niveau du caryotype.

La fréquence de ces anomalies va bien entendu dépendre du tableau biologique et clinique de l'infécondité masculine comme l'on peut le voir sur les tableaux suivants.

Ces anomalies chromosomiques sont bien entendu plus fréquentes dans le cadre des azoospermies non obstructives et des oligospermies sévères non obstructives.

	Azoospermie		Oligoasthénospermie			Total
	Obstructive	Non obstructive	Sévère <5M/ml	Modérée 5-10M/ml	Légère >10-20M/ml	
Nombre de sujets	144	648	648	628	583	2651
Anomalies chromosomes sexuels						
X		91	10			101
Y	1	10	11	7	1	30
Anomalies des autosomes						
Translocations Robertsonienne		3	26	8	1	38
Translocations réciproques	2	4	10	6	1	23
Autres			6	6		12
Nombre total anomalies	3	108	63	27	3	204
Pourcentage	2.1	16.7	9.7	4.3	0.5	7.7

Distribution des anomalies chromosomiques chez 2651 homme consultant pour infécondité au centre de Toulouse, étude dirigée par Dr. Georges Bourrouillou (Vincent et al. J. Andrology, Jan. Fév. 2002)

- *Les anomalies des chromosomes sexuels :*

Elles intéressent particulièrement en premier lieu la mise en évidence d'un chromosome X surnuméraire, c'est à dire le syndrome de klinefelter qui peut être total de formule 47,XXY ou en mosaïque de formule 47,XXY/46,XY.

Ce syndrome de klinefelter intéresse environ 10% des azoospermies non obstructives mais peut être impliqué dans certaines oligospermies sévères non obstructives. Il représente 82% des anomalies des patients ayant une azoospermie non obstructive à caryotype anormal.

Classiquement les sujets Klinefelter se présentent avec une taille relativement grande, les testicules sont petits et fermes, ils peuvent avoir une déformation thoracique et la présence de varices au niveau des membres inférieurs.

Un certain degré de débilité a pu être décrit, mais en fait l'expérience montre que tout homme consultant avec une azoospermie non obstructive pouvait indépendamment du phénotype avoir un syndrome de klinefelter.

D'autres tableaux peuvent être décrits comme le syndrome de YY qui concerne 0,8 sujets sur 1000. La formule est 47,XYY. Ces sujets sont de grande taille et la fréquence augmentée dans la population d'hommes présentant une azoospermie par rapport à la population normale est discutée limitant ainsi la responsabilité de cette anomalie chromosomique dans l'azoospermie.

A l'inverse, les sujets 46,XX présentant paradoxalement un phénotype masculin, sont de petite taille. L'absence de l'Y a pour conséquence l'azoospermie, le phénotype masculin étant dû le plus souvent à la greffe d'un fragment du bras court du chromosome Y comportant le gène de différenciation testiculaire sur un des chromosome X.

Par ailleurs, on peut trouver également des azoospermies non obstructives dans le cas de chromosome Y portant des anomalies structurales parmi lesquelles des macro-délétions du bras long du chromosome Y.

	Azoospermie		Oligoasthénospermie			Total
	Obstructive	Non-obstructive	Sévère <5M/ml	Modérée 5-10M/ml	Légère >10-20M/ml	
Nombre de sujets	144	648	648	628	583	2651
Chromosome X		91	10			101
47,XXY		83	5			88
47,XXY/46,XY		2	5			7
46,XX		5				5
Anomalies de structure		1				1
Chromosome Y	1	10	11	7	1	30
47,XYY			2	7		
45,XO		1				
45,XO/46,XX		3	1			
Mosaiques		5	2			
Anomalies de structure		1	6			
Inv(Y) (p11 ;q11)	1				1	
Nombre total anomalies	1	101	21	7	1	131

Distribution des anomalies des gonosomes chez 2651 homme consultant pour infécondité au centre de Toulouse, étude dirigée par Dr. Georges Bourrouillou (Vincent et al. J. Andrology, Jan. Fév. 2002)

- *Les anomalies des autosomes*

Le plus fréquemment il s'agit de translocation Robertsonienne (greffe des deux chromosomes acrocentriques). La plus fréquente impliquée est la translocation 13-14.

Il peut s'agir également de translocation réciproque ou d'inversions chromosomiques.

Ces affections sont plus fréquentes dans le cas des oligospermies sévères non obstructives que dans le cadre des azoospermies non obstructives.

	Azoospermie		oligoasthénospermie			Total
	Obstructives	Non obstructives	Sévère <5M/ml	Modérée 5-10M/ml	Légère >10-20M/ml	
Nombre de sujets	144	648	648	628	583	2651
Translocations Robertsoniennes		3	26	8	1	38
T(13 ;14)		2	22	6		30
Autres		1	4	2	1	8
Translocations réciproques	2	4	10	6	1	23
Inversions			6	2		8
Marqueurs				4		4
Nombre total	2	7	42	20	2	73

Distribution des anomalies des autosomes chez 2651 homme consultant pour infécondité au centre de Toulouse, étude dirigée par Dr. Georges Bourrouillou (Vincent et al. J. Andrology, Jan. Fév. 2002)

3.2.2 Microdélétion du chromosome Y

En 1976 Tiépolo et Zuffardi observant des macro-délétions au niveau du bras long du chromosome Y, avaient émis l'hypothèse de la présence d'un gène impliqué dans l'azoospermie. Ils ont dénommé cette zone AZF pour azoospermia factor.

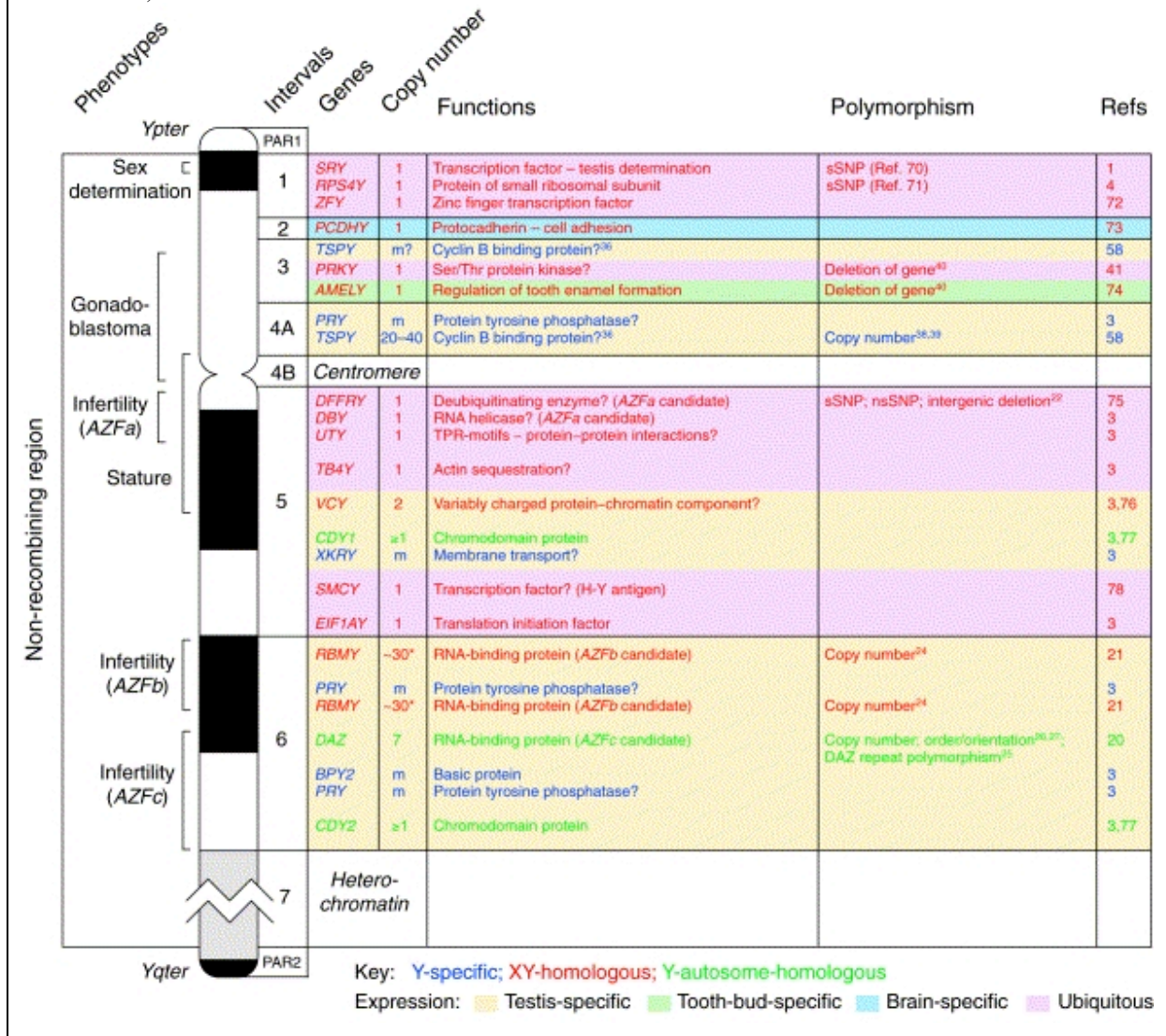
Le chromosome Y est le plus petit des chromosomes humains. Il est à noter que les chromosomes X et Y dériveraient d'une paire d'autosome mais auraient subi au fil du temps de nombreuses modifications avec en ce qui concerne l'Y, la perte de nombreux gènes encore présents sur le chromosome X.

La structure du chromosome Y est très particulière. Il possède de très nombreuses séquences répétées qui pourraient être à l'origine de son instabilité durant l'évolution et de la fréquence des délétions. Certains prévoient la disparition du chromosome Y à l'échelle de temps compatible avec l'évolution.

De nombreux gènes ont été mis en évidence dans le chromosome Y humain (voir www.gdb.org). Le chromosome Y présente des régions d'homologies au niveau desquelles les deux chromosomes X et Y vont s'appareiller durant la méiose. Ce sont les régions PAR pour pseudo-autosomal régions. La

région pseudo-autosomale 1 se trouve à l'extrémité du bras court du chromosome Y. La région pseudo-autosomale 2 est située à l'extrémité télomérique du bras long du chromosome Y.

Représentation du chromosome Y humain d'après Jobling MA et Tyler-Smith 2000 (*Trends in Genetics*, 16 : 356-362) :



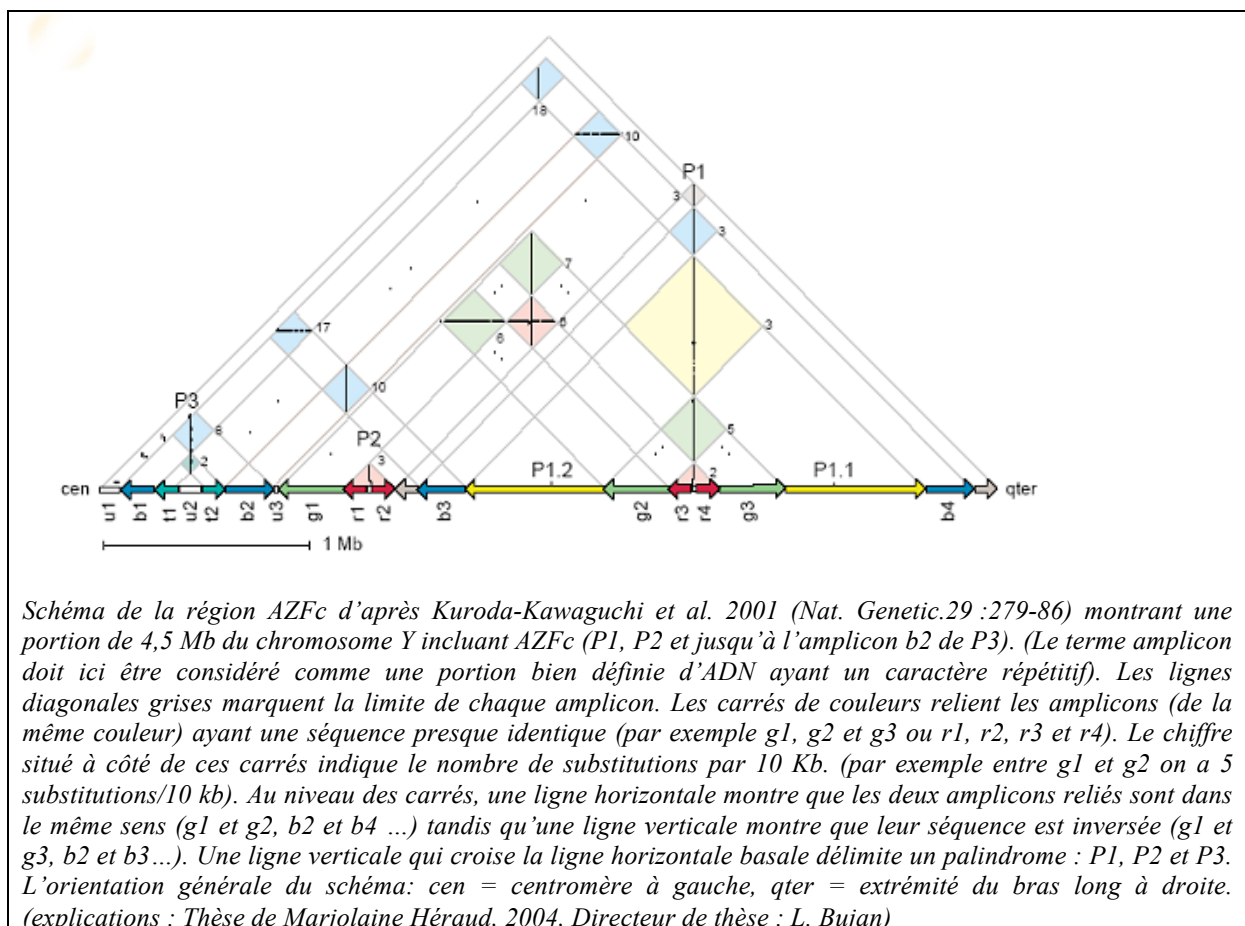
La région non recombinate du chromosome Y, région ne s'échangeant pas avec le chromosome X, a été baptisée male specific region (MSY) car cette région est spécifique de la lignée masculine. Elle contient des séquences transposées du chromosome X identiques à 99% à la région d'origine sur le X et représentant 10 à 15% de MSY, des séquences dégénérées de l'X avec identité des séquences variant de 60 à 96%, occupant 20% de MSY et enfin des séquences palindromiques dispersées dans la région MSY dont elles occupent 30%.

Six palindromes (Segment d'ADN double brin dont la séquence des nucléotides présente une symétrie bilatérale par rapport à un point central) contiennent des gènes dont l'expression est spécifiquement testiculaire

Parmi les régions de MSY, il faut noter au niveau du bras court un certain nombre de gènes intéressants pour la fonction masculine comme le SRY (sex determining region of Y chromosome) qui est le

facteur de détermination de la gonade primitive dans le sens mâle, le TSPY (testis specific protein Y encoded) est un gène répété, 20 à 40 copies, codant pour une protéine qui permettrait l'entrée en méiose des spermatogonies et qui pourrait également être impliqué dans l'apparition de tumeur testiculaire et de gonadoblastome. Puis au niveau de la région non recombinante du bras long, se trouve une région de chromatine au sein de laquelle ont été identifiés la plupart des gènes responsables des fonctions des chromosomes Y. Plus particulièrement, au niveau de cette zone a été identifiée la région AZF avec 3 sous-régions :

- **AZFa** qui semble se différencier des autres régions AZF par son caractère non répétitif et contenant plusieurs gènes d'intérêt : USP9Y, DBY, UTY et AZFaT1.
- **AZFb** contient des séquences en palindrome ainsi que des séquences uniques et on va retrouver à ce niveau 23 gènes théoriquement fonctionnels, dont 13 spécifiques de cette zone, qui pourraient avoir une action sur la spermatogenèse comme par exemple RBMY (RNA binding motif Y). Ces gènes RBMY codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN et sont impliquées dans la spermatogenèse.
- **AZFc** se situe au niveau de la partie distale de la région spécifique de l'Y, elle contient 8 familles de gènes et elle a une structure de type palindromique (voir schéma).



Plusieurs gènes ont été décrits à ce niveau, comme les gènes DAZ qui sont répétés au niveau de la zone AZFc. Ces gènes sont exprimés exclusivement dans les cellules germinales et codent pour des protéines de transport de l'ARN permettant une régulation des ARN messagers. L'équivalent de DAZ chez la drosophile (gène BOULE) est impliqué dans le développement de la méiose. Il est à noter que chez la souris un gène DAZ impliqué dans la spermatogenèse est porté par un chromosome autologue et qu'il existe chez l'homme un gène DAZ sur le chromosome 3 (DAZla : DAZ like autosome).

Grâce à la mise en évidence de marqueurs génomiques, la recherche de micro-délétions du chromosome Y est possible et cette recherche va intéresser les zones AZFa, AZFb et AZFc.

La zone AZFa est moins fréquemment délétée que les autres régions AZF. Cependant les délétions complètes d'AZFa semblent associées à un syndrome d'absence des cellules germinales, soit le syndrome « Sertoli Cell Only ».

Les délétions de la région AZFb ont été rapportées actuellement comme responsables d'une absence de spermatozoïde dans les testicules.

En général, plus la délétion est large, plus les chances d'atteinte sévère de la spermatogenèse sont élevées avec le risque d'absence de spermatozoïdes intra-testiculaires.

AZFc est plus fréquemment délétée que les autres régions. Suivant l'étendue de la délétion et probablement le nombre de copies de gènes disparus, le tableau phénotypique est variable avec une azoospermie ou une oligospermie en règle sévère.

4. CAUSES POST-TESTICULAIRES

Il s'agit-là des affections touchant le tractus génital, essentiellement l'agénésie bilatérale des déférents.

4.1. Agénésie des canaux déférents

Ce tableau biologique clinique associe dans la forme classique, une absence de déférent à la palpation clinique avec en règle générale, une absence des queues épидидymaires et au niveau biologique, un petit volume d'éjaculat avec un pH acide. Le tableau clinique et biologique peut parfois être moins évident. Les marqueurs biochimiques et l'échographie sont les outils diagnostiques indispensables pour décrire parfaitement les lésions.

Holsclaw, dès 1971, faisant des autopsies de patients atteints de mucoviscidose, avait observé l'absence bilatérale des déférents chez environ 98% des patients et interpellé les urologues sur la nécessité de penser à la mucoviscidose lorsqu'un tableau clinique d'absence des déférents était retrouvé chez l'homme infertile. Il a fallu attendre 20 ans pour que Dumur et al. décrive une fréquence augmentée de mutation delta F 508 dans le gène CFTR chez les patients présentant une azoospermie due à une agénésie des déférents.

Depuis, ce tableau a été parfaitement décrit.

La recherche de mutations dans le gène CFTR (Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Régulateur) est obligatoire dans ce contexte. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 7. Il

s'exprime essentiellement dans les cellules épithéliales des canaux pancréatiques, des glandes salivaires, de l'intestin, de la vésicule biliaire et du tractus génital. Il code pour une protéine transmembranaire, localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales, protéine qui est un canal ionique, plus précisément un canal à chlorure, mais qui présente d'autres fonctions. Plus de mille mutations ont été décrites au niveau du gène CFTR. L'identité des mutations est variable suivant l'origine des populations.

L'agénésie bilatérale des canaux déférents est une affection congénitale de transmission autosomique récessive retrouvée chez environ un homme sur mille. Elle représente environ 6 à 8% des azoospermie obstructives. La recherche de mutation du gène CFTR chez les patients présentant une agénésie bilatérale des déférents, montre que :

80% des patients présentent une mutation en simple ou double dose.

20 à 30% des patients présentent 2 mutations. Environ 50% présentent une seule mutation mais chez 30% de ces patients un polymorphisme au niveau de l'intron 8 juste en amont de l'exon 9 est retrouvé. Ce polymorphisme se caractérise par une séquence constituée selon les cas de 5, 7, 9 thymidines. Une relation inverse entre la quantité de transcrit CFTR et la longueur de cette séquence explique que le variant 5T soit impliqué dans la pathologie.

Chez les patients qui ne présentent qu'une seule mutation, on ne peut pas exclure la présence d'une autre mutation mais qui n'a pas été trouvée si le gène n'est pas screené dans son intégralité.

20% des patients ne vont présenter aucune mutation. Dans 10% des cas, on retrouve le polymorphisme 5T.

Dans 10 à 20% des cas, aucune mutation ou polymorphisme particulier n'est retrouvé. Dans ce dernier cas, il est obligatoire de s'assurer de la bonne définition du tableau clinique et biologique. S'il s'agit d'une anomalie unilatérale sans aucune anomalie controlatérale sur la voie génitale; on retrouve le plus fréquemment une agénésie rénale du même côté. Dans ce contexte d'anomalie unilatérale et d'agénésie rénale, le gène CFTR n'est pas en cause. Il s'agit d'un trouble de l'embryogenèse.

S'il existe une anomalie controlatérale sans anomalie rénale, il est licite d'approfondir la recherche dans le cadre du CFTR. Il faut souligner que la détection d'une mutation dépend des moyens mis en œuvre pour la rechercher. En effet, dans un travail de Mireille Claustres et al., reprenant l'analyse de 800 patients, un diagnostic de routine des mutations dans le gène CFTR retrouve 48% des patients porteurs de 2 mutations, 25% de patients porteurs d'1 mutation et 27% des patients ne présentant pas de mutation. Sur 327 patients, une analyse complète du gène a été conduite. Elle met en évidence une fréquence beaucoup plus importante de la présence de mutations puisqu'on retrouve 2 mutations pour 71% des patients ; 1 mutation pour 16% des patients et l'absence de mutation pour 7% des patients.

Ainsi, il faut souligner l'importance de la qualité de l'analyse génique, qui doit tenir compte de l'origine géographique des patients et de la précision du tableau clinique. Enfin il faut rappeler que le taux d'hétérozygotie dans la population générale est d'environ 1/25 personnes. Cela en fait probablement une des mutations les plus fréquentes.

4.2. Autres causes post-testiculaire :

4.2.1 Obstruction idiopathique de l'épididyme

Le syndrome de Young, syndrome particulièrement rare se caractérisant par une obstruction épидидymaire secondaire a été présenté comme une affection génétique. Il semblerait actuellement que l'on s'oriente pour expliquer ce syndrome, sur une exposition d'origine environnementale.

4.2.2 La polykystose rénale.

Il s'agit d'une affection autosomique dominante bien connue et l'on peut décrire dans cette affection, des kystes de l'épididyme ou des vésicules séminales qui pourraient être responsables d'obstructions. Ceci dit, en règle générale, peu de patients sont vus pour des problèmes d'infécondité.

5. SYNDROMES PARTICULIERS DU SPERMATOZOÏDE

5.1. La dyskinésie flagellaire.

Il s'agit d'un tableau génétiquement très hétérogène.

L'akinésie ciliaire est responsable d'une infertilité due à l'absence de mobilité des spermatozoïdes. Il s'agit d'un tableau autosomique récessif dont différentes variantes ont été décrites.

Les dyskinésie flagellaires peuvent être associées dans différents syndromes comme le syndrome de Kartagener (associant une broncheectasie, des sinusites, des polypes nasaux, un situs inversus ou une cardiextrie) autosomique récessif avec un gène sur le chromosome 8 (Kal8) ou le syndrome de Usher (associant une rétinite pigmentaire ayant pour conséquence une cécité progressive, une surdité) autosomique récessif avec de nombreux gènes impliqués.

Les recherches sont en cours pour étudier l'implication de gènes codant pour la dynéine (DNAI2, DNEL1 localisés sur le chromosome 17) ou d'autres gènes dans le tableau des dyskinésies flagellaires primaires.

5.2. Spermatozoïdes Microcéphales : globozoospermie

Syndrome particulier où la tête du spermatozoïde est ronde, de petite taille et dépourvue d'acrosome. Plusieurs cas familiaux étant décrits une origine génétique est soupçonnée d'autant plus que l'invalidation du gène pour la protéine kinase casein Kinase II chez la souris mâle provoque un tableau similaire. La recherche de mutations chez l'homme n'a pas pour le moment apporté de réponses mais les investigations se poursuivent.

D'autres pathologies pourraient avoir une origine génétique comme le tableau de spermatozoïdes morphologiquement très altérés ou les macrocéphales où la consanguinité pourrait jouer un rôle.

6. CONCLUSION

Il est très probable que l'évolution des outils de recherche moléculaire permettra l'identification de nouvelles stérilités d'origine masculine. Au-delà des progrès techniques cela ne sera possible que si

une description parfaite des tableaux cliniques et biologiques est réalisée en même temps qu'une analyse du contexte familial. A ce stade la recherche génétique nécessite des andrologues parfaitement formés et rigoureux.

Tout investigation génétique nécessite le consentement du patient, celui-ci étant informé des raisons du test et des résultats attendus au cours d'une consultation. Le résultat ne sera diffusé qu'après du patient quitte à lui d'informer son entourage.

Actuellement un nombre important de stérilités d'origine génétiques peuvent être diagnostiquées. Il est hors de propos de demander un test diagnostique sans avoir posé l'indication sur les arguments cliniques et biologiques.

Le caryotype et la recherche de microdélétions du chromosome Y doivent être demandés devant une azoospermie non obstructives ou une oligospermie sévères (concentration des spermatozoïdes $<5 \times 10^6/\text{ml}$) également non obstructive.

La recherche de mutations dans le CFTR sera indiquée devant le tableau de l'ABVD ou les tableaux proches.

Enfin des recherches plus spécifiques seront demandées devant les syndromes plus rares décrits ci-dessus.

L'intérêt de l'examen génétique dans le cas des hommes consultant pour infécondité est triple :

- 1) Pour l'homme : explication sur l'étiologie de la stérilité. Cette explication est importante pour les patients. De plus, cela peut parfois aider l'homme à faire le deuil de sa fertilité.
- 2) Pour la descendance éventuelle : S'il est possible d'utiliser des spermatozoïdes pour avoir une grossesse il est nécessaire d'évaluer auparavant le risque pour le conceptus. Exemples : a) patient présentant une ABVD et hétérozygote composite pour le CFTR ayant une compagne hétérozygote pour le CFTR : risque de 50% pour l'enfant d'avoir au minimum une ABVD et au maximum une mucoviscidose, ceci dépendant des mutations en cause. Dans ce cas un diagnostic pré-implantatoire (DPI) peut être proposé, ceci impliquant que les mutations ont bien été identifiées. b) un patient porteur d'une translocation 13/14 présente un risque pour l'enfant d'une formule chromosomique déséquilibrée pouvant être responsable d'une pathologie chez l'enfant. Le risque est variable en fonction de l'anomalie chromosomique allant de la FCS à l'enfant malformé. Un conseil génétique posera l'indication éventuelle d'un DPI ou un DPN (diagnostic prénatal). c) la présence d'une microdélétion du chromosome Y aura pour conséquence évident la transmission de la pathologie si l'enfant est un garçon. Par ailleurs une possible instabilité de l'Y a été mise en évidence dans le cas des microdélétions ce qui peut avoir comme conséquence des anomalies des chromosomes sexuels chez l'enfant.
- 3) Pour la Famille : suivant l'anomalie dépistée, l'homme, et lui seul, pourra être amené en informer sa famille et à conseiller une consultation des membres de la famille avec un généticien et ce d'autant plus que ceux ci sont en âge de procréer. Par exemple, la

translocation portée par l'homme infécond peut être retrouvée chez sa sœur et être à l'origine d'une malformation de l'enfant qu'elle concevrait. Ne pas informer l'homme de la nécessité d'un conseil génétique familial serait une faute reconnue si une pathologie survenait dans un tel contexte.

Toute anomalie génétique découverte lors du bilan d'infertilité imposera une consultation avec le généticien qui sera compétent pour évaluer et informer précisément le patient sur les risques encourus pour lui, son enfant à venir et les autres membres de la famille.

MUCUS CERVICAL ET EXPLORATIONS

Dr Myriam DAUDIN

CECOS Midi-Pyrénées, Hôpital Paule de Viguié, Toulouse

Une condition essentielle pour la rencontre du spermatozoïde et de l'ovocyte est la pénétration et la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales féminines. Cette étape nécessite une bonne acceptabilité du mucus cervical, une mobilité satisfaisante des spermatozoïdes.

L'exploration de cette étape est un des premiers temps du bilan de la fertilité du couple. Elle est réalisée par le **test post-coïtal** et le **test de pénétration simple et croisé in vitro**.

1. LE MUCUS CERVICAL

1.1. Origine

Le mucus cervical est sécrété au niveau du col utérin, il est élaboré au niveau de l'épithélium cervical cylindrique cilié. La muqueuse endocervicale forme un système de cryptes qui sont des invaginations de l'épithélium dans le chorion. Leur morphologie dépend du stade du cycle menstruel et de l'âge de la femme.

1.1.1 L'épithélium est constitué de :

- Cellules sécrétrices : leur taille varie selon l'intensité de leur activité sécrétoire. Le mucus s'accumule au pôle apical de la cellule dans des saccules qui éclatent à la surface cellulaire.
- Cellules ciliés : elles disposent de 60 à 80 cils apicaux, dont le battement rythmique est orienté vers l'orifice externe du col.
- Cellules de réserve.

1.1.2 Déterminisme de la sécrétion

Les hormones ovariennes contrôlent la sécrétion du mucus cervical. Les oestrogènes sont à l'origine d'une glaire filante, abondante, favorable aux spermatozoïdes. La progestérone induit une glaire visqueuse défavorable aux spermatozoïdes.

La sécrétion du mucus est faible en début de cycle : 20 mg/jour, elle est de 60 mg/jr de J5 à J9. Ensuite elle augmente de façon importante pour atteindre jusqu'à 700mg/jr au moment de l'ovulation. Elle diminue ensuite pour être à nouveau très faible à partir de J18.

Toute anomalie de la balance oestro-progestative au détriment des oestrogènes peut entraîner la production en milieu de cycle d'une glaire trop faible, trop visqueuse, susceptible d'induire une infertilité.

1.2. Nature et composition chimique du mucus cervical

La glaire est un hydrogel composé d'une trame visqueuse structurale solide emprisonnant dans ses mailles une phase liquide.

1.2.1 Phase liquide

Eau : > 90% et 98% au moment de l'ovulation.

Substances anorganiques : Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Cu²⁺.

Composés organiques en faible quantité : glucose, glycogène, acides aminés, protéines solubles, albumine, enzymes, lipides.

1.2.2 Phase solide

La trame solide est constituée de glycoprotéines. La microscopie électronique à balayage a permis de montrer la réalité de la structure filamenteuse de la trame solide du mucus cervical. Cette trame subit des modifications au cours du cycle ovarien (aspect, disposition, arrangement des filaments).

En phase ovulatoire, le mucus est constitué de fibrilles de diamètre de 800 à 2000Å formant un réseau de mailles orientées parallèles à l'axe du canal cervical avec des fibres transversales de 200 à 1000Å.

Les mailles sont de l'ordre de 10µm et permettent la migration des spermatozoïdes.

En phase post ovulatoire, les fibrilles sont désorganisées, opposant aux spermatozoïdes une succession d'obstacles empêchant leur pénétration. Les mailles sont de l'ordre de 0,5µm. La glaire n'est pénétrable par les spermatozoïdes qu'en période ovulatoire, lorsque les mailles sont supérieures aux dimensions de la tête.

1.3. Propriétés physiques du mucus cervical

Les propriétés physiques subissant des variations cycliques répondant au cycle hormonal ovarien.

1.3.1 pH

Il est de l'ordre de 7,3 à 8 en période ovulatoire. Il est plus acide en période pré et post menstruelle. On a une élévation du pH de bas en haut du canal cervical. La présence de sang modifie le pH dans le sens de l'alcalinité. Toute infection microbienne modifie le pH (soit alcalin, soit acide).

1.3.2 Cristallisation

Lors de la dessiccation à l'air, le mucus forme des cristaux de chlorure de potassium et de sodium. En période ovulatoire, ces cristaux forment des arborisations typiques « en feuille de fougère ». Cette capacité d'arborisation est liée aux taux des oestrogènes qui provoquent une charge suffisante en électrolytes dans la glaire. Son étude intervient dans le score d'Insler. **Score d'Insler :**

Score 0 : absence de cristallisation.

Score 1 : atypique

Score 2 : a+b+quelques c

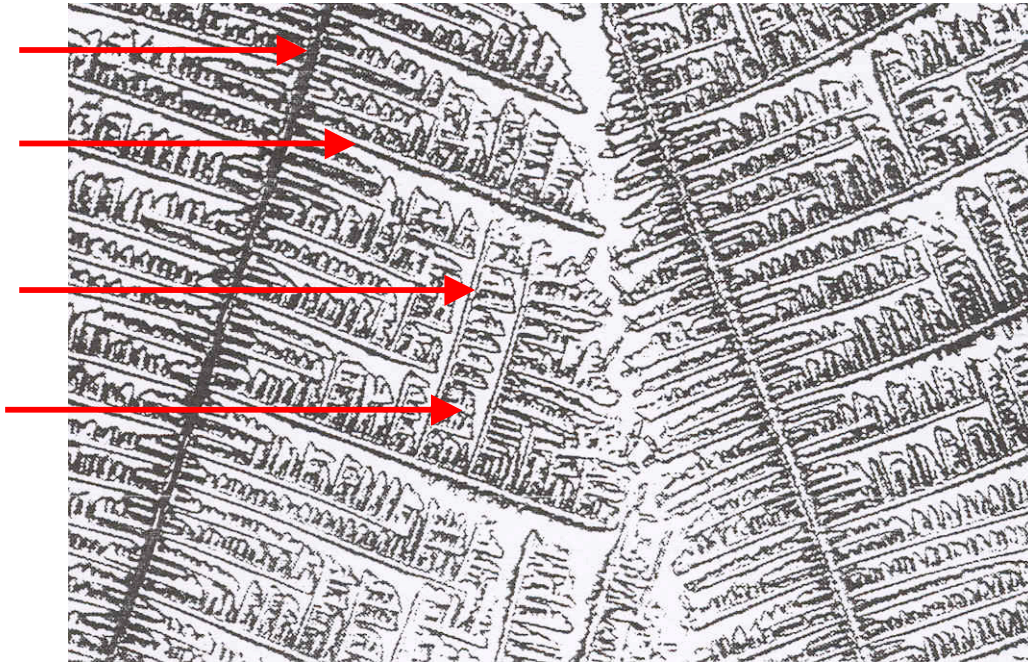
Score 3 : a+b+c+d

CRISTALLISATION

a
b

c

d



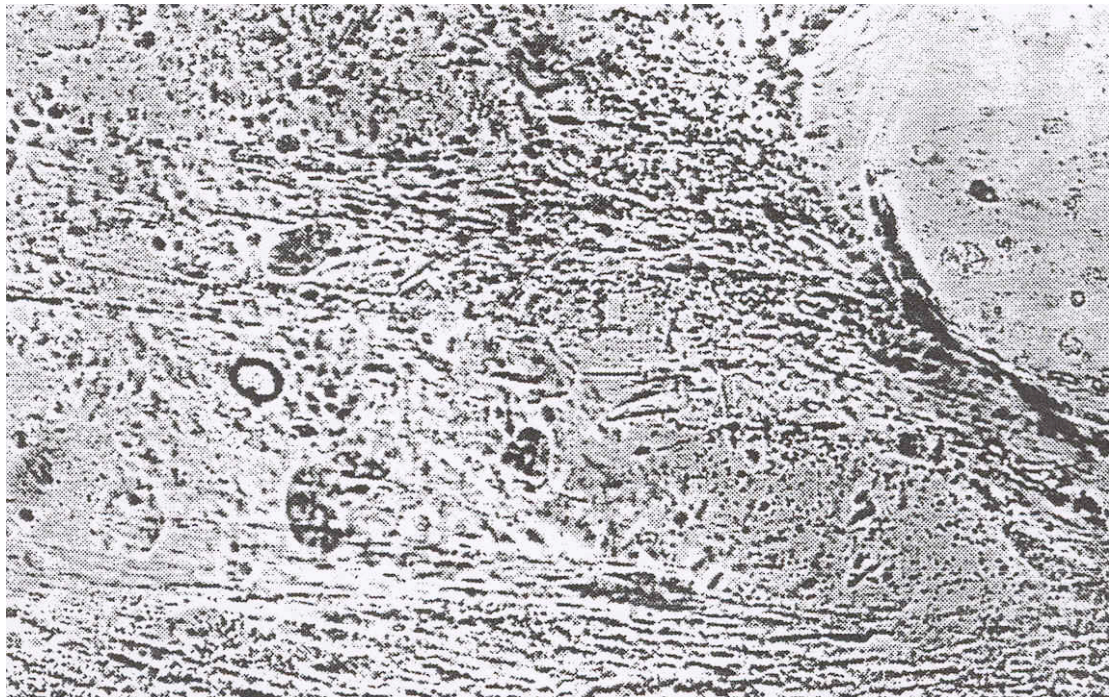
Score 3 : a : structure de 1^{er} ordre ; b : structure de 2^{ème} ordre ; c : structure de 3^{ème} ordre ; d : structure de 4^{ème} ordre



Score 2 : a + b + quelques c



Score 1 : a + b



Score 0

1.3.3 Viscosité

Elle est influencée par l'arrangement moléculaire et les concentrations protéiques et ioniques du mucus cervical. Elle serait déterminée par la proportion des sels dissous dans la phase aqueuse. Elle est inversement proportionnelle à la filance.

1.3.4 Filance

C'est la capacité d'étirement de la glaire cervicale avant d'atteindre le point de rupture. Elle s'évalue lorsqu'on ouvre au maximum les mors de la pince avec laquelle on examine la glaire cervicale. Cette filance augmente progressivement pendant le cycle pour atteindre un pic aigu en période ovulatoire, puis diminue régulièrement. Ce critère intervient dans le score d'Insler :

de 1 à 4 cm : score 1

de 5 à 10 cm : score 2

sup. à 10 cm : score 3.

Le mucus cervical est très hétérogène et on a montré que des cryptes cervicales voisines de quelques mm peuvent produire des mucus fondamentalement différents.

1.4. Propriétés physiologiques du mucus cervical

Travaux de F.C. Chrétien : J. Gyn. Obst. Biol. Repr. 1977, 6, 451-488.

Le mucus cervical constitue un facteur essentiel pour favoriser l'action des spermatozoïdes et synchroniser la rencontre des gamètes. Elle est le siège de divers mécanismes qui conditionnent ou favorisent la fertilité, à savoir :

- 1 – établissement d'un environnement protecteur pour les spermatozoïdes qui doivent fuir les conditions hostiles rencontrées dans le vagin.
- 2 – constitution d'une barrière cyclique empêchant l'accès des spermatozoïdes à l'utérus en dehors de la période de fécondité.
- 3 – protection des spermatozoïdes contre une éventuelle phagocytose par les cellules de la lignée blanche.
- 4 – filtration sélective des spermatozoïdes en fonction de leur vitalité.
- 5 – constitution d'une réserve de spermatozoïdes
- 6 – modification fonctionnelle des spermatozoïdes.
- 7 – protection mécanique de la cavité utérine contre une infection microbienne, doublée d'une action bactéricide.

1.4.1 Protection des spermatozoïdes contre l'hostilité du milieu vaginal

Le cul de sac vaginal est un milieu très acide de l'ordre de 3 à 4,5. Après un rapport sexuel, le pH du milieu vaginal reste acide de l'ordre de 6,1 – 6,2, même si les sécrétions alcalines qui accompagnent l'orgasme peuvent contribuer à diminuer l'acidité du milieu vaginal. Les spermatozoïdes sont immobilisés dans un délai de 1 à 2 heures après l'éjaculation.

La survie des spermatozoïdes est conditionnée par une « fuite en avant » qui ne peut trouver d'issue favorable qu'au niveau de l'épanchement muqueux qui sourd du col, s'écoule sur la lèvre postérieure et qui plongeant dans la flaque séminale joue en quelque sorte le rôle d'une mèche absorbante.

Le pH du mucus est important pour la suite des événements : un mucus trop acide, immobilise les spermatozoïdes, une légère alcalinité augmente leur mobilité.

Le pouvoir tampon du sperme protège les spermatozoïdes contre l'acidité vaginale. Le système coagulation-liquéfaction joue aussi son rôle en maintenant la première fraction éjaculée, plus riche en spermatozoïdes au contact du col. Les spermatozoïdes proches de la glaire sont ainsi libérés en premier et peuvent rapidement la pénétrer.

Du fait de son alcalinité, le mucus pourrait avoir un rôle activateur, stimulant les spermatozoïdes et les aider à vaincre la résistance que leur oppose la nature visco-élastique de cette dernière.

1.4.2 Condamnation cyclique de l'accès à la cavité utérine

La dimension des mailles de la trame est un paramètre mouvant au cours du cycle. Maximale au moment de l'ovulation, elle diminue ensuite jusqu'à la fin du cycle pour augmenter jusqu'à l'ovulation suivante.

Le diamètre des mailles est de 0,5 μm pendant la période menstruelle, à J10 de 2 μm , à J13 de 6 μm , à J14 plus de 10 μm , à J15 de 6 μm . La tête du spermatozoïde est de 2 à 5 μm de large.

Le relâchement de la trame du maillage facilite le transit des spermatozoïdes.

1.4.3 Protection des spermatozoïdes contre une éventuelle phagocytose

Du fait de la présence de leucocytes, provenant soit de l'exocol, soit de la cavité utérine, de nombreux spermatozoïdes sont phagocytés ou immobilisés. L'arrivée des spermatozoïdes dans le col entraîne rapidement une augmentation des leucocytes. Les spermatozoïdes immobiles sont entraînés vers l'exocol en se cantonnant dans la partie centrale de la colonne. Les spermatozoïdes morts se rassemblent comme les leucocytes dans la partie centrale de la lumière cervicale. Les spermatozoïdes remontent le canal endocervical le long des parois de la muqueuse, zones où les conditions d'oxygénation sont maximales.

Le mucus s'écoule plus rapidement dans la partie centrale de la lumière cervicale entraînant avec lui les cellules mortes ou peu mobiles, les spermatozoïdes évitant ce courant descendant empruntent les zones marginales du mucus exsudé où la résistance à l'avancement est moindre.

Les spermatozoïdes trouvent des cryptes sécrétrices dans lesquelles nombre d'entre eux s'engagent et séjournent avant de reprendre leur progression dans un environnement pratiquement libre de leucocytes qui les met à l'abri d'une phagocytose.

1.4.4 Filtration sélective des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes porteurs d'anomalies de la pièce intermédiaire et du flagelle ne migrent pratiquement pas. Par contre les spermatozoïdes porteurs d'anomalies au niveau de la tête paraissent capables de pénétrer normalement.

Cette sélection basée principalement sur les anomalies flagellaires a pour conséquence que des spermatozoïdes non féconds porteurs d'anomalies céphaliques puissent se retrouver sur le lieu de fécondation.

Il a été établi une corrélation entre le type de mouvement et l'aptitude des spermatozoïdes à migrer dans le mucus cervical. Un faible déplacement latéral de la tête dans le liquide séminal serait un élément de mauvais pronostic signifiant une mauvaise relation entre le développement de l'onde flagellaire et sa propagation.

1.4.5 Constitution d'une réserve de spermatozoïdes

La distribution des spermatozoïdes dans les cryptes est loin d'être uniforme : certaines cryptes en sont "bourrées", d'autres à peu près vides, et l'on trouve le plus souvent d'avantage de spermatozoïdes dans le premier tiers du canal cervical.

3 facteurs peuvent favoriser la colonisation des cryptes :

- les cryptes et les replis muqueux constituent des réceptacles naturels capables de piéger les spermatozoïdes.
- la rareté des leucocytes dans les cryptes en fait des aires privilégiées où les spermatozoïdes ont de meilleures chances d'éviter la phagocytose
- les spermatozoïdes suivent l'orientation des filaments micellaires. Les filaments sont d'abord parallèles à l'axe du canal cervical, ils se recourbent ensuite perpendiculairement à ce dernier au niveau des cryptes qui leur donne naissance et y conduisent les spermatozoïdes.

Grâce à ce flux constant de spermatozoïdes stockés dans l'endocol, la colonisation des voies hautes se ferait de façon progressive.

1.4.6 Maintien de la vitalité des spermatozoïdes et modifications fonctionnelles des spermatozoïdes

Le cervix apparaît être la région du tractus génital féminin la plus favorable aux spermatozoïdes. Des conditions favorables d'oxygénation sont rencontrées le long des cryptes cervicales. Les spermatozoïdes ayant traversé le mucus cervical sont aptes à se fixer sur des zones pellucides et à décondenser leur noyau dans un système hétérosécifique. On peut donc penser que la capacitation débute dès la traversée du mucus cervical.

1.4.7 Protection antimicrobienne de la cavité utérine

Le mucus cervical paraît constituer une barrière s'opposant à l'invasion bactérienne et fongique depuis le vagin vers le haut du tractus et la cavité abdominale. Il semble qu'il y ait 3 agents responsables de l'action antibactérienne du mucus cervical : la lactoferrine, la peroxydase, la lysozyme.

La lactoferrine :

Protéine soluble dont la molécule supporte 2 ions ferriques. La synthèse s'effectuerait au niveau des cryptes. Elle inhibe la croissance de nombreuses bactéries en privant le milieu de culture du fer qu'il contient.

La peroxydase : enzyme que l'on retrouve dans les leucocytes , également présente dans le mucus cervical.

La lysozyme : élaborée par la partie basse de la muqueuse endocervicale. Cette enzyme est capable d'hydrolyser certains chaînons essentiels de la paroi des bactéries gram positives et négatives.

Intervient également un système mécanique. La résistance offerte à l'ascension des bactéries de grande taille par la trame solide du mucus cervical lorsque la densité est maximale, en fin de cycle par exemple.

Le rôle antibactérien est sous la dépendance de l'environnement hormonal, lié au cycle ovarien. L'efficacité antibactérienne du mucus est minimale en période d'ovulation.

Chacune des particularités morphologiques et biologiques du conduit cervical, chacune des propriétés biochimiques et biophysiques de la sécrétion qu'il élabore semble concourir à favoriser la rencontre des gamètes à l'époque optimale et dans les meilleures conditions.

Ce passage obligé à travers la glaire cervicale est un élément clef de la procréation naturelle.

2. EXPLORATION ET PATHOLOGIE DU MUCUS CERVICAL

2.1. Evaluation clinique du mucus cervical

L'évaluation clinique du mucus cervical doit se faire suivant des critères précis tel que le score cervical d'Insler qui apprécie quatre paramètres :

- - l'ouverture du col
- - l'abondance de la glaire
- - la filance
- - la cristallisation

2.2. Score d'Insler

Score	1	2	3
Ouverture du col	Ponctuel	Perméable	Béant
Abondance	Minime	En goutte	En cascade
Filance	1 à 4 cm	5 à 10 cm	>10 cm
Cristallisation	linéaire	partielle	totale

Une glaire préovulatoire doit avoir un score minimal de 10/12.

A pH normal, il y a une bonne corrélation entre le score et l'imprégnation oestrogénique et entre le score et la migration linéaire des spermatozoïdes.

2.3. Programmation des tests

Le jour de l'examen est fixé sur l'étude de la courbe de température des deux cycles antérieurs, la sécrétion maximale de mucus cervical se situant dans les 2 à 3 jours précédant le point le plus bas de la courbe de température, avant la remontée thermique.

La pratique des tests fonctionnels est inutile si la glaire ne présente pas les caractéristiques de la période ovulatoire. Il faut revoir la patiente plus tardivement dans le cycle en cas de programmation trop précoce ou le cycle suivant si le décalage thermique a déjà eu lieu.

2.4. Le test de Hühner ou test post-coïtal

Représente le premier test fonctionnel à réaliser lors du bilan du couple infertile. Sa valeur a été reconnue pour la première fois par Sims en 1868. Il a ensuite été oublié pendant de longues années avant d'être repris par Hünher en 1913.

C'est un examen facile, peu coûteux, qui doit être fait dans un laboratoire spécialisé. Il permet d'apprécier l'aptitude des spermatozoïdes à pénétrer et à survivre dans le mucus cervical dans des conditions physiologiques.

2.4.1 Conditions de réalisation

Prélèvement effectué avec du matériel à usage unique tel que l'aspiglaire CCD.

2 prélèvements : - endocervical : aspirer la glaire en retirant la sonde : on aura successivement la glaire interne, moyenne, externe.

- cul de sac vaginal.

Le prélèvement est réalisé 6 à 12 heures après un rapport sexuel précédé d'une abstinence sexuelle de 3 à 5 jours.

2.4.2 Réalisation

Préparer 4 lames, une pour le cul de sac, 3 autres pour les autres glaires

-déposer les différentes glaires sur les lames en découpant chaque fragment

au bout : glaire externe

au milieu : glaire moyenne

au fond : glaire interne

- mesurer le pH de la glaire interne (N = 7,7)

- avec 2 lamelles moyennes étaler les différentes glaires et poser les 2 lamelles sur chaque lame

- observer le prélèvement du cul de sac vaginal au X 40 : présence ou absence de spermatozoïdes

- observer chaque glaire comme suit : au X40 observer 10 champs (dénombrer avec compteur dans chaque champ)

- compter les spermatozoïdes. Apprécier la mobilité dans chaque champ.

- évaluer le nombre des spermatozoïdes mobiles /champ.

- évaluer le nombre de leucocytes/champ

Après examen de la glaire interne, retirer la lamelle et faire sécher la lame pour le test de cristallisation (observation au X 20 contraste de phase). Noter sur 3 et reporter le score cervical sur 12.

2.4.3 Interprétation des résultats

L'interprétation est faite à partir des résultats rendus sur l'observation de la glaire interne.

Test positif : à partir de 6 spermatozoïdes à **mobilité progressive**/champ au X 40

(nombre défini à partir d'une moyenne sur 10 champs) au niveau de la glaire interne.

Test déficient : au niveau de la glaire interne : présence d'un nombre de spermatozoïdes mobiles directionnels inférieur à 6 ou présence de spermatozoïdes mobiles sur place ou immobiles.

Test négatif : absence de spermatozoïdes dans la glaire interne.

En cas d'anticorps anti-spermatozoïdes (soit au niveau du sperme, soit au niveau du mucus), la pénétration du mucus est nulle ou faible avec dans ce cas une immobilisation et/ou une mobilité anormale des spermatozoïdes dans le mucus.

2.4.4 Conduite à tenir

- *devant un test positif*

On demande un spermogramme, spermocytogramme. Des anomalies morphologiques de la tête des spermatozoïdes n'interfèrent pas avec la pénétration mais peuvent être responsables de stérilité. Exemples : absence d'acrosomes.

- *devant un test négatif ou déficient*

Le test est négatif parce qu'il n'y a pas de spermatozoïdes dans l'éjaculat (azoospermie) ou parce que les spermatozoïdes n'ont pu pénétrer la glaire jusqu'à la glaire interne pour des raisons qu'il reste à déterminer.

Le test est déficient quand le nombre des spermatozoïdes mobiles est anormalement faible ou leur mobilité est très basse ou nulle.

Dans ces deux cas on demande un examen de sperme : spermogramme, spermocytogramme, spermoculture. En cas de suspicion d'infection de la glaire, on réalise un bilan complet à la recherche d'une cervicite.

On peut retrouver chez l'homme :

- une azoospermie
- des paramètres altérés (oligo-nécro-asthénospermie), une hypospermie sévère, un trouble de la liquéfaction.
- des signes d'appels d'anticorps antispermatozoïdes (ASA) : asthénospermie plus ou moins sévère, présence d'agglutinats spontanés ou à la 4^{ème} heure.
- une spermoculture positive
- mais aussi des paramètres spermatiques normaux.

Face à une azoospermie, on met en place le bilan d'exploration de l'azoospermie.

En cas d'infection (dans le sperme et/ ou dans la glaire) on refait un TPC après traitement.

Pour les autres situations, on demande la réalisation d'un test in vitro simple et croisé, afin de déterminer quelle est l'origine de la défaillance : spermatique, cervicale ou mixte.

2.5. Test de compatibilité in vitro simple et croisé

Il s'agit de tester la glaire de la femme et le sperme de l'homme en les croisant avec un sperme témoin et une glaire témoin. Le prélèvement de la glaire impose l'évaluation du score d'Insler et la mesure du pH de la glaire.

2.5.1 Evaluation des paramètres

Le Shaking test est positif lorsque l'on observe des spermatozoïdes qui ne peuvent pas pénétrer la glaire et qui présentent des mouvements atypiques d'agitation saccadée sur place.

Ce phénomène est dû à la présence d'anticorps recouvrant les spermatozoïdes ou à la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le mucus cervical. La positivité est une indication de recherche d'anticorps antispermatozoïdes.

Quatre paramètres de la compatibilité glaire/sperme sont évalués et cotés:

- **La progression** : c'est le nombre de cm parcourus dans la glaire par les spermatozoïdes.
 - 0 cm = 0
 - > 0 à 1 cm = 1
 - de 1 à 4 cm = 2
 - supérieur à 4 cm = 3
- **La densité de pénétration** : nombre de spermatozoïdes ayant pénétré tout le long de la colonne de migration.
 - 0 spermatozoïdes = 0
 - de 1 à 10 spermatozoïdes = faible = 1
 - de 11 à 50 spermatozoïdes = moyenne = 2
 - > 50 spermatozoïdes = élevée = 3
- **La capacité de pénétration** : c'est la différence entre la densité des spermatozoïdes situés au point le plus haut de la colonne de migration et la densité de ceux situés au point de contact.
 - nulle = 0
 - faible = 1
 - moyenne = 2
 - élevée = 3
- **La survie** : c'est le maintien de la mobilité des spermatozoïdes appréciée 4 heures après mise en contact à 37°C.
 - spermatozoïdes tous immobiles = 0
 - spermatozoïdes sur place = 1

- spermatozoïdes progressifs peu orientés = 2
- spermatozoïdes progressifs et orientés = 3

2.5.2 Résultats

On évalue le Shaking test et la compatibilité glaire/sperme des trois situations :

- la glaire examinée avec le sperme examiné
- le sperme examiné avec la glaire témoin
- la glaire examinée avec le sperme témoin.

Le TIV est considéré normal si après 30 min, une grande majorité des spermatozoïdes ont atteint le sommet de la colonne de migration (6 cm) avec un mouvement orienté et si, après 4 heures de contact, la mobilité des spermatozoïdes reste progressive et orienté. Les différents cas de figures peuvent être résumés par ce tableau permettant l'établissement de l'origine spermatique, cervicale ou mixte.

Glaire examinée + sperme examiné	-	-	-	+
Glaire témoin + sperme examiné	-	+	+	+
Glaire examinée + sperme témoin	+	-	+	+
Origine	sperme	glaire	mixte	TPC à refaire

2.5.3 Conduite à tenir

2.5.4.1 Origine cervicale

- *Le mucus cervical est quantitativement insuffisant :*
 - cause anatomique : sténose cervicale, col de DES syndrome, destruction des cryptes glandulaires par conisation, endocervicite, curetage de l'endocol.
 - cause hormonale : insuffisance oestrogénique, défaut de réceptivité de la muqueuse.
- *Le mucus cervical est qualitativement inadéquat, cet état peut relever de plusieurs causes :*
 - infection de la glaire : en raison de vaginite, cervicite. On aura des signes cliniques d'appels et on retrouvera en quantité anormalement élevée des polynucléaires au niveau de la glaire. Demander un examen bactériologique, mycologique.
 - cause immunologique : Les anticorps anti-spermatozoïdes devront être recherchés dans le sérum, le mucus cervical, le plasma séminal, la surface des spermatozoïdes. La présence d'anticorps dans le mucus cervical est une contre-indication aux inséminations intra-utérines car ces mêmes anticorps sont la plupart du temps présents dans les différentes sécrétions de l'appareil génital.

- dysmucorrhée : correspond à une sécrétion de glaire géloïde, opaque qui ne réagit à aucun traitement oestrogénique ou antibiotique. La culture est en général stérile. Relèverait d'une anomalie de l'arrangement de la trame glycoprotéique. Est une bonne indication des inséminations intra-utérines.
- anomalie du pH < 7 : pourrait-être en relation avec la métaplasie cervicale observée chez les femmes en période d'activité génitale. Traitement par absorption de 1,5 à 2 litres par jour de Vichy Célestin dans les trois jours précédent l'ovulation.

2.5.4.2 Origine spermatique

En fonction des signes d'appels, spermatiques et cliniques on va demander une spermoculture, une recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes, un bilan andrologique complémentaire.

2.5.4.3 Origine mixte

On réalise l'exploration citée ci-dessus.

2.5.4.4 En cas de test normal

Le test post coïtal est à refaire (mauvaise programmation ?), on s'assure par ailleurs qu'il n'y a pas de dysfonctionnement sexuel (réalité du rapport sexuel ? réalité de l'éjaculation antérograde lors du rapport sexuel ?).

3. CONCLUSION

L'exploration de l'interaction mucus cervical/sperme constitue un temps essentiel du bilan de l'infécondité du couple et doit être faite très précocement.

Le test post-coïtal doit être réalisé en premier. Le test de pénétration in-vitro simple et croisé permet une analyse semi-quantitative des paramètres vus, détecte les phénomènes d'immobilisation immunologique et oriente vers une origine spermatique, cervicale ou mixte.

En fonction de traitements possibles ou non, se posera l'indication d'une prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation soit par insémination intra-utérine, soit par FIV ou par ICSI.

BILAN FEMININ D'INFERTILITE

*Docteur Florence LESOURD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguié, Toulouse*

Un couple sur dix consulte dans son existence pour une difficulté à concevoir. La fécondabilité (probabilité de conception par cycle) normale étant en moyenne de 25%. 10% des couples qui consultent ont réellement une fécondabilité réduite, inférieure à 10%. Au bout d'un an d'infécondité, la fécondabilité moyenne est estimée à 12%, au bout de 2 ans à 8%, au bout de 5 ans à 4%. Au delà de 2 ans d'infécondité, les chances de grossesse spontanée sont faibles et la proportion de couples réellement infertiles devenant élevée il est licite d'envisager une prise en charge médicale des couples. Elle s'appuie sur un bilan d'infertilité qui a pour objectif de mettre en évidence des étiologies masculines ou féminines d'hypofertilité. La fertilité est en effet une notion exprimée pour un couple, une hypofertilité d'un des partenaires pouvant être "compensée" par une fertilité normale de l'autre partenaire et aboutir à une grossesse. Les étiologies d'hypofertilité se répartissent équitablement entre l'homme et la femme. Tout bilan d'infertilité doit donc comporter des examens destinés à la femme, à l'homme mais également au couple même si l'un des deux présente à priori une étiologie évidente d'infertilité. Les consultations s'adressent au couple, les deux partenaires devant être présents, examinés et explorés. Notre sujet se limite à l'exploration de la femme.

Coté féminin, quatre paramètres doivent être explorés dans un bilan de base permettant d'orienter le diagnostic dans 80% des cas. Les 20% restants pour lesquels le bilan de base sera complètement normal nécessiteront des explorations plus complexes.

Le bilan de base recherche : (1) des anomalies mécaniques, organiques ou fonctionnelles, (2) des anomalies de l'ovulation, qu'elles soient d'origine hypothalamique, hypophysaire ou ovarienne, (3) des anomalies utérines gênant l'implantation, (4) des anomalies cervicales altérant la sécrétion de la glaire ou la pénétration des spermatozoïdes et des maladies plus générales comme l'endométriose altérant de différentes façon la fertilité féminine.

Tout bilan commence par un interrogatoire et un examen clinique.

1. INTERROGATOIRE

1.1. Antécédents familiaux

Ils concernent les parents et la fratrie.

- maladies graves ou héréditaires
- diabète
- fertilité

1.2. Antécédents médicaux

- Maladies générales : cœur, poumons, diabète, troubles psychopathologiques, maladie endocrinienne

1.2.1 Habitus

Médicaments, tabac, drogues, alcool.

1.2.2 Antécédents chirurgicaux non gynécologiques

- appendicite, hernie inguinale, péritonite, occlusion...

1.2.3 Antécédents gynécologiques

- dates des premières règles, spontanées ou provoquées
- durée et régularité des cycles : courts (<25 jours), normaux (26 à 35 jours), longs (>35 jours). Si les cycles sont irréguliers noter la durée minimale et maximale, l'ancienneté de cette irrégularité et son mode d'installation.
- en cas d'aménorrhée noter la date et les modalités de survenue, les circonstances déclenchantes (modification du poids, troubles du comportement alimentaire, choc psychologique), les signes fonctionnels associés (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale, acné, hirsutisme...)
- abondance des règles, métrorragies, dysménorrhée précoce ou tardive
- contraception : type, date de début et de fin, tolérance ou complications éventuelles
- pathologie et traitements gynécologiques antérieurs : kystes ovariens et type de traitement médical ou chirurgical, hormonothérapie, pathologies cervicales et type de traitement (électrocoagulation, vaporisation laser, conisation), coelioscopie avec ou sans coeliochirurgie, hystérocopie, curetage, pathologies infectieuses ou signes évocateurs (douleurs pelviennes, fièvre, leucorrhées...)
- sexualité : âges des premiers rapports, multiplicité des partenaires, ancienneté du couple actuel, fréquence et qualité des rapports

1.2.4 Antécédents obstétricaux

Pour chaque grossesse préciser la date, le délai pour son obtention, sa nature spontanée ou induite, son déroulement et son issue. Noter si elle est survenue ou non avec le partenaire actuel.

L'interrogatoire s'achève sur l'histoire de l'infertilité actuelle, son ancienneté, la fréquence et la répartition des rapports dans le cycle (centrés ou non sur l'ovulation), les investigations déjà réalisées, où, quand et comment (récupérer tous les résultats, les comptes-rendus), les traitements déjà réalisés, où, quand et comment, leurs résultats (récupérer les comptes rendus).

L'interrogatoire se conclue : « *il s'agit d'une infertilité primaire ou secondaire datant de tant de temps et s'inscrivant dans tel contexte* ».

2. EXAMEN CLINIQUE

2.1. Examen général

poids, taille, index de masse corporelle, morphotype, pilosité (type et répartition)

2.2. Examen gynécologique

- examen des organes génitaux externes
- examen sous spéculum : aspect du col, glaire, leucorrhées (à prélever si suspectes ou symptomatiques)
- toucher pelvien : volume et mobilité utérins, palpation des paramètres et si possible des ovaires, palpation des ligaments utéro-sacrés.
- examen mammaire : palpation, recherche d'une galactorrhée

Noter si le toucher est facile ou pas (paroi, coopération de la patiente), douloureux ou pas.

Conclure par : « *examen normal ou pas* » et pourquoi.

3. EXAMENS COMPLEMENTAIRES DU BILAN DE BASE

3.1. Exploration de l'ovulation

3.1.1 Courbe de température

Son utilisation est basée sur le principe de l'augmentation thermique due à la sécrétion de progestérone par le corps jaune post ovulatoire. Les progestatifs exogènes peuvent avoir le même effet hyperthermiant que la progestérone endogène à l'exception de la rétroprogestérone (Duphaston*). Ils ne doivent donc pas être pris pendant les périodes d'exploration. Pour être interprétable, la température doit être prise toujours avec le même thermomètre et de la même façon (voie rectale), avant le lever (température basale), à heure si possible assez constante, rapportée sur une feuille adaptée où seront notés tous les phénomènes intercurrents. Plusieurs courbes (au moins 3) sont

nécessaires à une bonne interprétation. La courbe normale est biphasique, le décalage entre les 2 phases est de 0,3 à 0,5°C, il se fait en 24 à 48 heures, le plateau se maintient plus de 10 jours. L'ovulation se situe dans les 5 jours entourant le nadir (point le plus bas) de la courbe, le plus souvent la veille de l'ascension thermique.

La courbe ne permet qu'un diagnostic d'ovulation à posteriori.

Une courbe plate, monophasique correspond le plus souvent à une anovulation, un raccourcissement de la phase folliculaire (<10 jours) peut être un signe d'insuffisance ovarienne débutante...

L'origine du trouble de l'ovulation sera identifié par une échographie et un bilan hormonal.

3.1.2 Echographie pelvienne

Elle permet de préciser l'anatomie des différents organes pelviens et leur pathologie éventuelle. Elle renseigne sur la structure des ovaires (surface, aspect du stroma, nombre et répartition de petits follicules), structure parfois intimement liée à un trouble de l'ovulation (ovaires micro-polykystiques, ovaires déficients). Elle doit alors être réalisée par voie endovaginale avant le sixième jour du cycle.

L'ovaire micro-polykystique a un volume augmenté, une hyperplasie du stroma, de multiples (>10) petits follicules répartis en couronne, en périphérie de l'ovaire.

L'ovaire multifolliculaire a un volume normal, un stroma normal, plusieurs petits follicules régulièrement répartis dans le parenchyme.

L'ovaire déficient est petit (<3cm³) avec peu de follicules parfois 1 gros follicule préovulatoire à J6 (cycle court).

L'échographie peut aussi être utilisée pour le monitoring d'un cycle spontané. Elle suit le développement folliculaire pendant le cycle : *Sur des ovaires normaux, de J1 à J5 pas de follicule visible, à J8 1 follicule de 8 à 10mm, J10 et au delà individualisation du follicule dominant dont le diamètre atteint 15mm et qui grossit d'environ 2mm/jour. En période péri-ovulatoire la taille du follicule peut atteindre 25 ou 26mm. Après l'ovulation, le follicule s'affaisse, un peu de liquide folliculaire peut être visualisé dans l'espace péri-ovarien ou le cul de sac de Douglas. Le corps jaune n'est pas toujours visible, sa paroi est irrégulière et il est rempli d'échos.*

3.1.3 Bilan hormonal

Il n'est pas systématique. Il est réalisé soit devant une anomalie des cycles ou de la courbe de température, soit devant des signes cliniques anormaux (hyper pilosité, galactorrhée...), soit enfin devant une infertilité inexplicée. Il est fait en début de cycle entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour et comporte toujours un dosage de la FSH, de l'estradiol, de la LH sur pool, et de la prolactine. En fonction des cas, un dosage des androgènes, des hormones thyroïdiennes, de l'inhibine B voir des tests dynamiques (test à la GnRH) peuvent être demandés en plus.

Toute anomalie doit être vérifiée sur un cycle ultérieur.

Une FSH élevée (>10mUI/l) avec un estradiol normal ou élevé sont des marqueurs évocateurs d'insuffisance ovarienne. Ils sont parfois associés à un effondrement de l'inhibine B.

Une FSH ou une LH basses sont en faveur d'une pathologie hypophysaire ou hypothalamique.

Une LH élevée (>6 mUI/l) est en faveur d'un syndrome des ovaires polykystiques (OPK) d'autant qu'elle s'associe à un LH/FSH>1 ou à une réponse explosive de la LH au test au GnRH.

Une prolactine élevée en dehors de traitements hyperprolactinémisants doit être explorée afin d'éliminer un adénome hypophysaire. Elle peut, lorsqu'elle est modérée, s'inscrire dans un tableau d'OPK (dosage LH+androgènes) ou d'hypothyroïdie (dosage TSH).

Sur ces données on peut essayer de définir le trouble de l'ovulation :

- *Dysovulation mineure :*
 - Irrégularité des cycles \pm 4 jours
 - Et/ou décalage lent de la température > 48 heures
 - Et/ou plateau court \leq 8 jours
 - Et/ou présence d'un follicule \geq 10mm entre J8 et J10 avec une croissance lente (<2mm/jour) sur le cycle spontané monitoré.
- *Dysovulation majeure*
 - Irrégularité des cycles > 4 jours
 - Ou cycles longs >35 jours
 - Ou alternance de cycles dysovulatoires et anovulatoires
 - Ou apparition tardive au delà de J12 d'un follicule \geq 10mm avec croissance lente et ou incomplète sur le cycle monitoré.
- *Anovulation*
 - Aménorrhée
 - Ou courbes plates
 - Ou absence d'apparition d'un follicule \geq 10mm pendant le cycle monitoré.

3.2. Exploration de la glaire (cf cours de Myriam DAUDIN)

Elle repose sur le test de Hünher (test post-coïtal) : étude de la qualité de la glaire (score d'Insler), de son pH, et de la mobilité des spermatozoïdes dans la glaire après un rapport. Cet examen est réalisé en période pré ovulatoire, dans les 10 heures suivant un rapport. La glaire est prélevée à l'orifice du col, son abondance et sa filance sont notées. Elle est déposée sur une lame pour étude de sa cristallisation classiquement en feuille de fougère. Le score d'Insler est calculé en notant de 1 à 3 chaque paramètre : ouverture du col, abondance de la glaire, filance et cristallisation. Un score supérieur à 9/12 est satisfaisant et traduit une ovulation de bonne qualité. Le nombre et la mobilité des spermatozoïdes par champs de microscope permettent d'apprécier la compatibilité glaire/sperme si le spermogramme est

normal. Un test est considéré comme positif lorsqu'il y a au moins 5 spermatozoïdes mobiles par champ.

En cas d'absence totale de spermatozoïdes y compris dans les culs de sacs vaginaux, éliminer une absence de rapport vaginal ou une pathologie du sperme (oligo ou azoospermie). Si tous les spermatozoïdes sont immobiles, contrôler le pH de la glaire (normale >7) et le spermogramme (mobilité et vitalité initiale) éventuellement rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes.

En cas de test de Hünher négatif avec un spermogramme normal et une glaire normale, demander un test de pénétration croisée in vitro qui teste les spermatozoïdes du partenaire avec une glaire témoin puis la glaire de la partenaire avec des spermatozoïdes témoins. Ce test permet de connaître l'origine féminine ou masculine de l'incompatibilité glaire/sperme.

3.3. Exploration de la cavité utérine et des trompes.

3.3.1 Hystérosalpingographie (HSG)

Elle est pratiquée en début de cycle, en dehors de tout saignement, de tout signes infectieux et de préférence sous antibiotiques. Elle est incontournable dans le bilan de base mais elle n'est pas dénuée de risques infectieux. Elle peut nécessiter un traitement « anti-allergique » préalable.

Elle renseigne sur la taille et la morphologie utérines, sur l'endomètre (synéchie, polype, myome...) et sur les trompes (passage et brassage). Lorsqu'elle fait suspecter une obstruction tubaire elle peut être complétée par une salpingographie sélective (cathétérisme de l'ostium tubaire).

L'HSG donne des critères d'opérabilité des trompes.

3.3.2 Coelioscopie et l'hystérocopie

Ce ne sont pas des examens de première intention. La coelioscopie nécessite une anesthésie générale. L'hystérocopie peut être couplée à la coelioscopie (elle doit être réalisée avant) ou faite seule. La coelioscopie permet d'explorer les trompes, des ovaires, la cavité abdominale et le péritoine. Elle doit toujours être associée à une épreuve au bleu de Méthylène.

Elle peut être complétée par une salpingoscopie (examen de la lumière tubaire par voie antéro- ou rétrograde et par un opérateur entraîné).

La coelioscopie est indiquée : - dans les pathologies tubaires dépistées sur l'HSG. Elle est réalisée quand le bilan d'infertilité du couple est complet et uniquement si ce bilan permet une prise en charge de l'infertilité. Elle peut être associée à un geste opératoire (adhésiolyse, plastie tubaire, destruction de foyers d'endométriose).

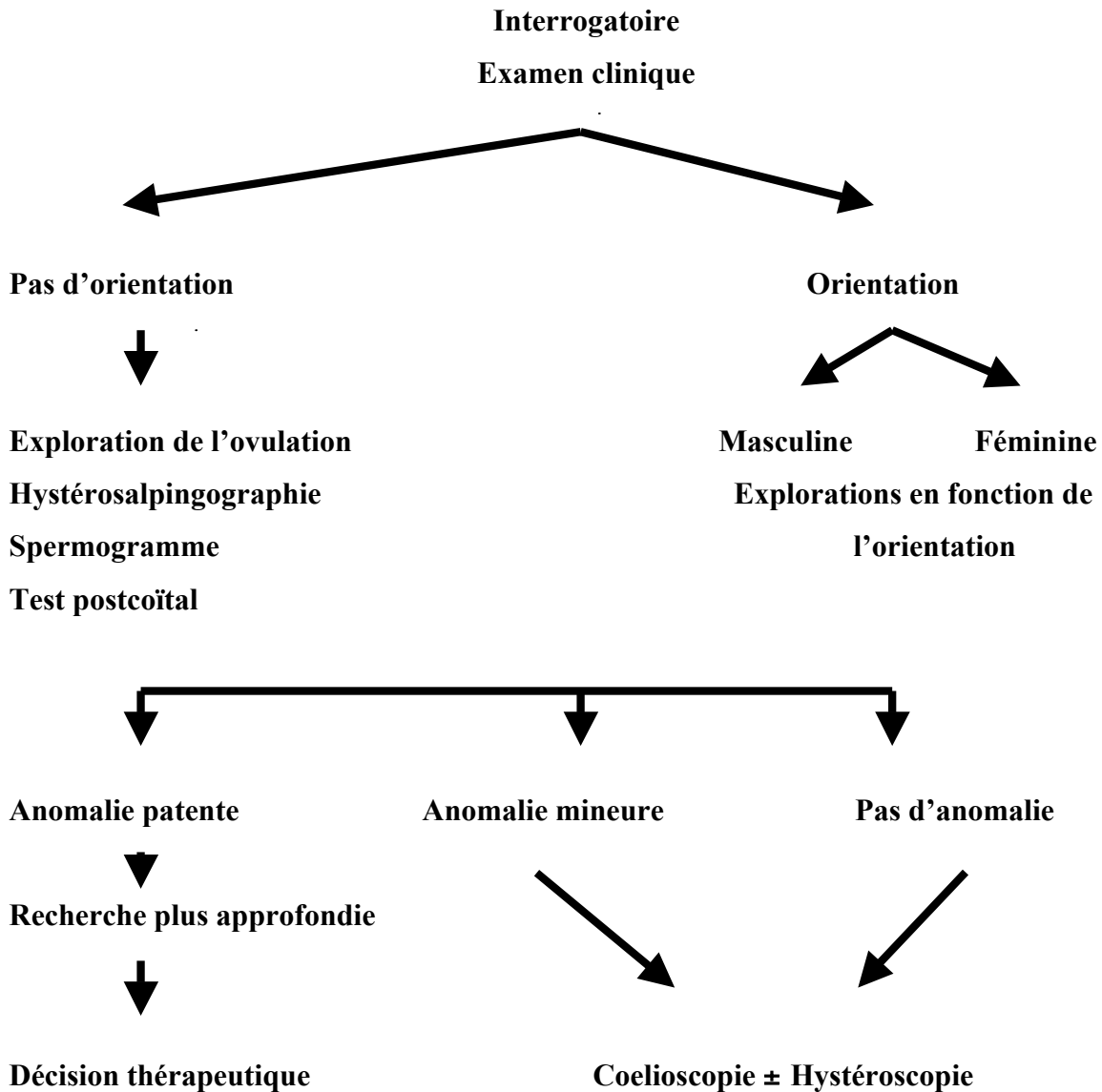
- dans les suspicions d'endométriose pelvienne
- dans les infertilités inexplicables (bilan complet normal) pour certains.

L'hystérocopie est indiquée : - dans des pathologies utérines dépistées sur l'HSG (polype, synéchie, myome)

- dans certaines infertilités inexplicables (recherche d'endométrite chronique)

De ce bilan complet découleront des choix thérapeutiques qui ne pourront être faits qu'en intégrant les données du bilan masculin.

4. CONDUITE D'UN BILAN D'INFERTILITE EN PRATIQUE



INSEMINATION INTRA-UTERINE

*Docteur Florence LESOURD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguié, Toulouse*

L'insémination intra-utérine connaît un regain d'intérêt grâce à une meilleure connaissance de la physiologie des différentes étapes précédant la fécondation et aux progrès techniques réalisés tant au niveau des stimulations de l'ovulation qu'au niveau de la préparation du sperme. C'est une méthode plus simple et moins invasive que la Fécondation in vitro mais elle nécessite la même rigueur dans la méthodologie diagnostique et dans le choix des indications.

L'insémination intra-utérine (IIU) est un premier niveau de traitement dans l'assistance médicale à la procréation (AMP) mais elle n'est pas un passage obligé avant le recours à la Fécondation in vitro (FIV) dans des indications non tubaires.

1. BASES PHYSIOLOGIQUES DE L'IIU

Le principe de l'insémination intra-utérine est de déposer du sperme préparé in vitro (sélection-capacitation des spermatozoïdes) dans la cavité utérine au moment de l'ovulation de façon à rapprocher les spermatozoïdes mobiles capacités de leur site de fécondation.

La préparation du sperme est indispensable. En effet les spermatozoïdes ne sont pas féconds tant qu'ils sont dans le plasma séminal. In vivo ils acquièrent leur pouvoir fécondant lors de leur transit dans les voies génitales féminines. Cette étape de maturation appelée capacitation aboutit à l'hyperactivation du spermatozoïde et à l'extériorisation de récepteurs permettant sa fixation sur la zone pellucide. La capacitation correspond en fait à la levée de facteurs décapacitants (protéines protectrices du spermatozoïde) présents dans le liquide séminal et/ou déposés sur la membrane du spermatozoïde au cours de son transit dans l'épididyme.

2. TECHNIQUE DE L'IU

0,2 à 0,4 ml de sperme préparé sont introduits dans un cathéter (cathéter de transfert d'embryons de Frydman le plus souvent) et inséminés doucement dans la cavité utérine à l'aide d'une seringue à insuline. Une pince de Pozzi peut être posée sur le col pour le redresser si nécessaire. La patiente reste allongée 10 à 30 minutes après l'IU. Elle peut ensuite reprendre une activité strictement normale.

Des techniques de perfusion du sperme in utero ont été proposées. Elles consistent en une perfusion utérine du sperme grâce à l'occlusion du col pour éviter le reflux. Les taux de grossesse rapportés par l'équipe de Trout (9) sont significativement plus élevés dans les infertilités inexplicables après perfusion de sperme (22%) qu'après IU (13%). Ceci s'expliquerait par un effet de désobstruction tubaire provoqué par la pression de l'insémination.

3. PREPARATION DU SPERME

Dans l'insémination intra conjugale le sperme est recueilli par masturbation après 2 à 6 jours d'abstinence. Il est préparé suivant les mêmes techniques que celles utilisées en Fécondation in vitro (FIV) : migration ascendante ou gradient de densité.

Le but de cette préparation est de séparer les spermatozoïdes du liquide séminal et de sélectionner les spermatozoïdes mobiles de l'éjaculat.

L'insémination peut être réalisée avec un sperme de donneur (IAD).

4. CYCLE SPONTANE OU CYCLE STIMULE ?

L'IU peut théoriquement être réalisée soit sur un cycle spontané soit sur un cycle stimulé.

Elle doit être pratiquée le plus près possible de la rupture folliculaire (durée de fécondabilité très courte de l'ovocyte après l'ovulation) soit environ 37 à 40 heures après le stimulus ovulatoire (pic de LH ou injection d'hCG).

La détermination exacte de l'ovulation en cycle spontané est difficile. Elle nécessite une surveillance contraignante avec des échographies et des dosages d'estradiol et de LH plusieurs fois par jour en phase pré-ovulatoire. Même chez les patientes normo-ovulantes, les taux de succès des IU en cycles spontanés sont reconnus comme très faibles (3,4,7). Le rapport coût/résultat est très en faveur de l'association systématique d'une stimulation de l'ovulation à toute insémination.

En cycle stimulé l'objectif est une réponse pauci-folliculaire (2 ou 3 follicules maximum de diamètre supérieur ou égal à 15mm). Plosker rapporte que le recrutement de 2 follicules au moins est le seuil à atteindre pour augmenter le taux de succès en IU. Dans son étude le déclenchement sur 1 follicule donne un taux de grossesse de 2%, le déclenchement sur 2 follicules ou plus donne 15% de grossesse (7).

5. QUEL INDUCTEUR UTILISER ?

La croissance folliculaire est essentiellement sous la dépendance des gonadotrophines hypophysaires. La sélection folliculaire fait appel à la notion de seuil de FSH : les taux plasmatiques de FSH commencent à s'élever en phase lutéale d'un cycle et continuent à monter en début de phase folliculaire du cycle suivant avant de re-diminuer. Quand il atteint un certain seuil le follicule le plus sensible à la FSH continue sa croissance alors que les autres partent en atresie. La LH finalise la maturation ovocytaire et provoque la synthèse de facteurs protéolytiques qui assureront la rupture folliculaire.

Les gonadotrophines peuvent être apportées directement sous forme de FSH ou d'hMG injectables ou être sécrétées sous l'effet anti-estrogène du Citrate de Clomifène. La méta analyse de Huges (4) portant sur 5214 cycles démontre la supériorité de la FSH sur le Citrate de Clomifène (CC).

Le déclenchement de l'ovulation permet de réaliser l'IU au moment le plus opportun par rapport à la rupture folliculaire (36 à 40 heures après l'injection d'hCG).

6. NOMBRE D'IU PAR CYCLE ET NOMBRE DE CYCLES D'IU.

L'arrêté du 25 janvier 2000 modifiant la nomenclature des actes professionnels des médecins précise qu'il ne peut être coté qu'une insémination par cycle pendant 6 cycles pour l'obtention d'une grossesse. Dans la littérature, il n'existe pas de consensus sur l'intérêt de la double insémination. Néanmoins une étude récente de Ragni rapporte l'intérêt de pratiquer 2 IU par cycle respectivement à 12 et 34 heures après l'administration d'hCG (8). Le groupe ne recevant qu'une IU à 34 heures a un taux de grossesse de 14,4% par patient et de 8,3% par cycle, le groupe recevant 2 IU à 12 et 34 heures a un taux de grossesse de 30,4% par patient et 19,4% par cycle ($p < 0,005$). La double IU couvre une fenêtre d'ovulation plus large, augmente le nombre de spermatozoïdes arrivant sur le site de fécondation et la colonisation rétrograde du mucus cervical ce qui permet une libération prolongée de sperme.

Le choix du nombre de cycles d'IU pour l'obtention d'une grossesse dépend avant tout des facteurs pronostiques.

7. INDICATIONS DE L'IIU

Les premières indications d'IIU ont été les anomalies de la glaire : absence de glaire par exemple après conisation large ou glaire acide après vérification de l'absence d'infection et tentative d'alcalinisation par de l'eau de Vichy Célestin. Les troubles de l'éjaculation liés à une malformation comme un hypospadias ou liés à une éjaculation rétrograde (diabète) sont également des indications classiques.

Actuellement les indications sont élargies à toutes les infertilités non tubaires avec sperme compatible (récupération d'au moins 1 Million de spermatozoïdes mobiles après préparation) par exemple les insuffisances spermatiques modérées et les infertilités inexplicables.

Les troubles sexuels d'origine psychologique comme l'impuissance ou le vaginisme ne sont par contre pas des indications d'IIU. Ils nécessitent une prise en charge psychologique.

Les IIU avec sperme autoconservé (avant traitement par radio ou chimiothérapie voire vasectomie) ne doivent être pratiquées que si la qualité du sperme décongelé est strictement normale et le nombre de paillettes de spermatozoïdes suffisant. Dans le cas contraire ou si le pronostic féminin n'est pas optimal, il est préférable d'utiliser directement les paillettes pour une FIV voire une ICSI afin d'optimiser les chances de grossesse.

8. FACTEURS PRONOSTIQUES.

8.1. Facteurs féminins

8.1.1 L'âge

C'est le principal facteur pronostique. Le taux de grossesse passe de 13,7% par cycle chez la femme de moins de 40 ans à 4,1% chez la femme de plus de 40 ans. Aucune grossesse n'est obtenue chez la femme de plus de 42 ans (6,7). Le déclin des résultats avec l'âge s'explique par une altération de la réceptivité utérine et de la qualité ovocytaire.

8.1.2 Le délai d'infertilité

Un délai prolongé est également de plus mauvais pronostique (6): le taux de grossesse passe de 14,2% pour un délai inférieur ou égal à 6 ans à 6,1% pour un délai supérieur à 6ans. Une des explications est la sélection des couples les plus infertiles avec le temps.

8.1.3 L'indication

Le meilleur taux de grossesse est obtenu dans les infertilités inexplicées (15,3%), le plus faible dans l'endométriose (6,5%). L'impact négatif de l'endométriose quelle que soit l'indication de l'IU est retrouvé par Hughes dont la méta analyse conclue à une réduction d'environ 50% des taux de grossesse chez les femmes porteuses d'endométriose (4). L'effet péjoratif de l'endométriose pourrait s'expliquer par une altération de la qualité folliculaire, une diminution des taux d'implantation, et peut être un effet immunologique, gamétotoxique de la maladie (5).

8.1.4 Le rang de la tentative

La majorité des grossesses surviennent dans les 3 premiers cycles d'IU (7).

8.1.5 Le nombre de follicules visibles à l'échographie dont le diamètre est supérieur à 18mm le jour du déclenchement

Les meilleurs taux de grossesse sont obtenus quand 3 follicules pré-ovulatoires sont visualisés sans qu'il n'y ait de corrélation entre le nombre de follicules et le taux de grossesse multiple (6,7).

8.1.6 L'épaisseur de l'endomètre et son aspect en échographie endovaginale

L'endomètre mature est hypo-échogène et mesure au moins 9,5 mm d'épaisseur. L'hyper-échogénicité traduit la transformation sécrétoire de l'endomètre sous l'effet de la progestérone et s'accompagne d'une diminution de la réceptivité utérine (1).

8.2. Facteurs masculins

Aucune caractéristique du sperme initial de bilan ne semble influencer de façon significative les résultats de l'IU (6,10). Par contre le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés conditionne le taux de grossesse par cycle. Il passe pour Wainer de 2% quand moins de 1 Million de spermatozoïdes mobiles sont inséminés à 19% quand on insémine entre 5 et 8 Millions de spermatozoïdes. Pour ce même auteur le taux de grossesses non évolutives s'élève significativement (40%) lorsqu'un nombre élevé de spermatozoïdes mobiles (supérieur à 8 Millions) est inséminé (10).

9. CONCLUSION

L'insémination intra utérine est la technique d'AMP à proposer en première intention aux couples ayant une infertilité à trompes saines. Elle optimise les chances de grossesse dans des indications bien définies. Sa prescription doit tenir compte des facteurs pronostiques du couple. Chez des patientes de plus de 40 ans, ayant un délai d'infertilité prolongé ou un facteur masculin associé un passage direct en Fécondation in vitro doit être envisagé.

Toute insémination intra-utérine doit être couplée à une stimulation de l'ovulation soigneusement monitorée. Le déclenchement de l'ovulation doit être annulé en cas de risque important de grossesse multiple. L'insémination intra-utérine est réalisée avec du sperme préparé in vitro dans un laboratoire autorisé. Le nombre d'inséminations par cycle et de cycles pour l'obtention d'une grossesse dépendent, outre l'arrêté du 25 Janvier 2000, du choix de chaque centre, du dossier clinico-biologique du couple, et de la réponse à une précédente stimulation.

10. BIBLIOGRAPHIE

- 1- Bronte A., Vargyas J., Ringler G., Stein A., Marss R., Determinant of the outcome of intra uterine insemination : analysis of outcome of 9 963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180: 1522-34.
- 2- Fanchin R., Righini C., Ayoubi J.M., Olivennes F., de Ziegler D., Frydman R. New look at endometrial echogenicity : objective computer- assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2000 ; 74 : 274-81.
- 3- Guzick D., Sullivan M., Adamson G., Cedars M., Falk R., Peterson E., Stein Kampf M. Efficacy of treatment for unexplained infertility . *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 207-13.
- 4- Hughes E.G. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility : a meta-analysis. *Hum Reprod* 1997 ; 12 ;1865-72.
- 5- Martinez-Roman S., Balasch J., Montserrat C., Fabregues F., Carmona F., Vilella R., Vanrell J.A. Immunological factors in endometriosis-associated reproductive failure : studies in fertile and infertile women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 1997 ; 12 ;1794-99.
- 6- Nuojuua Huttunen S., Tomas C., Bloigu R., Tuomivaara L., Martikainen H. Intrauterine insemination treatment in subfertility : an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod* 1999 ; 14 ; 698-703.
- 7- Plosker S.M., Jacobson W., Amato P. Predicting and optimizing success in an intra-uterine insemination programme. *Hum Reprod* 1994 ; 9 ; 2014-21.
- 8- Ragni G., Maggioni P., Guermandi E., Testa A., Baroni E., Colombo M., Crosignani P. Efficacy of double intrauterine insemination in controlled ovarian hyperstimulation cycles. *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 207-13.
- 9- Trout S., Kemmann E. Fallopian sperm perfusion versus intra uterine insemination : a randomized controlled trial and meta analysis of the literature. *Fertil Steril* 1999, 71 :881-5.
- 10- Wainer R., Merlet F., Bailly M., Lombroso R., Camus E., Bisson J.P. Facteurs pronostiques spermatiques des inséminations intra-utérines avec sperme du conjoint. *Contracept. Fertil. Sex.* 1996 ; 24 ;12 ;897-903.

PREPARATION DU SPERME IN VITRO

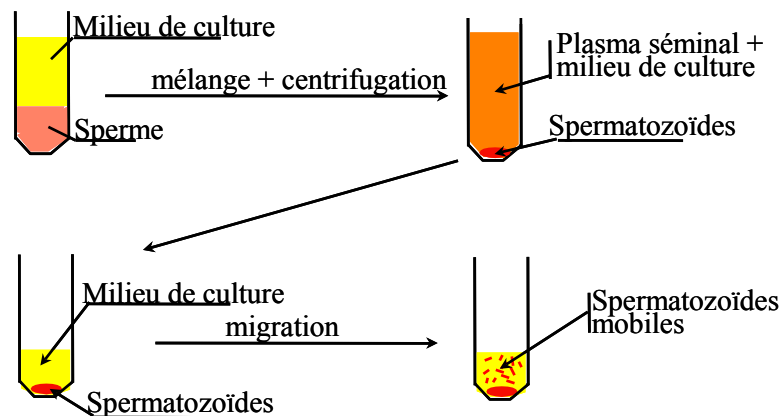
*Professeur Jean PARINAUD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguier, Toulouse*

1. PRINCIPES

La préparation in vitro du sperme consiste à reproduire in vitro ce qui se produit in vivo dans la glaire cervicale, c'est-à-dire la sélection des spermatozoïdes mobiles et normaux et leur capacitation. C'est la base de toutes les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Ce sont des techniques de sélection et de capacitation mais non d'amélioration du sperme. En effet, même si les caractéristiques du sperme après préparation sont meilleures que celles de départ, il n'y a pas eu amélioration du sperme mais uniquement sélection d'une sous-population pré-existante dans celui-ci.

2. TECHNIQUES

2.1. Migration ascendante (swim-up)



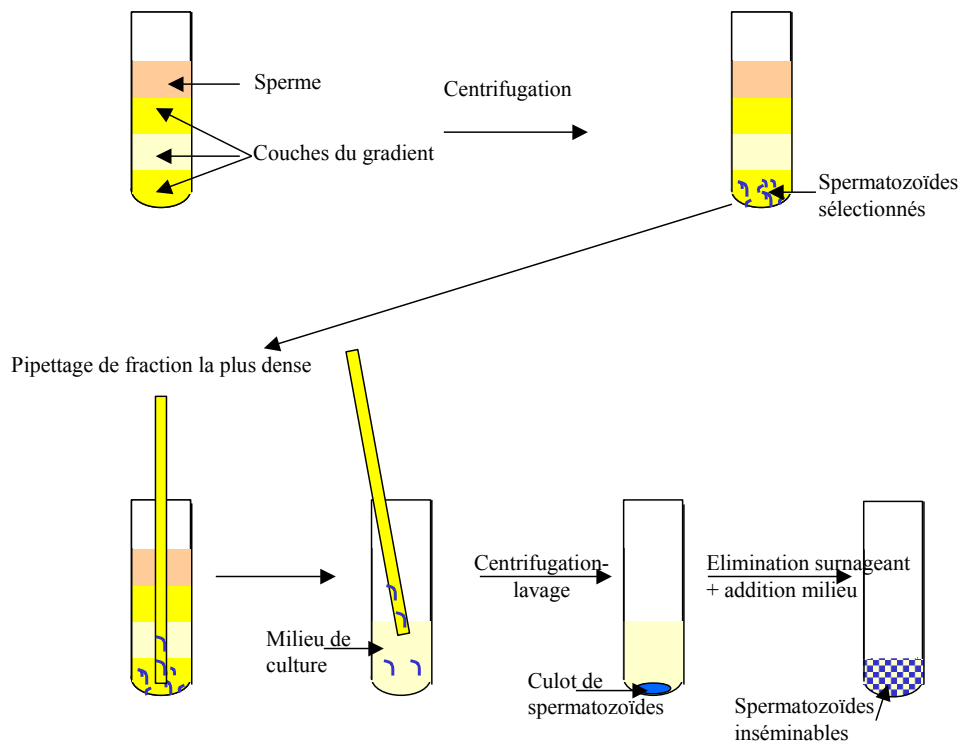
C'est la technique la plus anciennement décrite et utilisée. Elle consiste à débarrasser les spermatozoïdes du plasma séminal par 2 lavages successifs (centrifugation du sperme mélangé avec un milieu de culture). Après centrifugation, les spermatozoïdes se retrouvent au fond du tube avec par dessus un mélange de plasma séminal et de milieu de culture qui est alors éliminé. Du milieu de culture est alors rajouté par dessus les spermatozoïdes, sans mélanger. L'ensemble est alors mis à incuber à 37°C pendant environ 15mn. Les spermatozoïdes les plus mobiles vont alors « nager » du culot de centrifugation vers le milieu de culture. Le milieu de culture contiendra alors uniquement des spermatozoïdes mobiles et c'est cette préparation qui sera utilisée pour l'AMP. Outre la sélection des spermatozoïdes mobiles, cette technique permet également d'éliminer une grande partie des

spermatozoïdes anormaux. Elle a l'avantage d'être simple et peu coûteuse mais son rendement est relativement faible et elle n'est utilisée que pour des spermés normaux en vue d'IAC ou de FIV.

2.2. Techniques de filtration

Il s'agit ici de sélectionner les spermatozoïdes en les faisant passer à travers une colonne de billes de polysaccharides (Sperm Prep®). Le Sperm Prep® est peu utilisé en raison de son coût et de son efficacité moindre que le PureSperm® (cf. ci-dessous).

2.3. Gradients de centrifugation



C'est la technique la plus utilisée actuellement. Les gradients de densité (discontinus) sont réalisés à partir de solutions de grains de silice recouverts de polyvinyl pyrrolidone. Ils peuvent être simples ne comprenant que 2 couches (mini-gradient) ou plus élaborés jusqu'à 6 couches. Le plus utilisé est un gradient de 3 couches (60, 80 et 90%). Initialement c'est le Percoll® qui a été employé mais il a été retiré du marché pour des raisons de risques de lésions spermatiques (non démontrés) et a été remplacé par le PureSperm®. Il s'agit de la technique donnant le meilleur rendement en particulier dans les cas de déficience spermatique. Son inconvénient réside dans son coût élevé, surtout depuis l'abandon du Percoll®.

3. RESULTATS

Les gradients de Percoll[®] ou de PureSperm[®] permettent une bonne sélection des spermatozoïdes mobiles et normaux, même si celle-ci n'est pas parfaite.

	Sperme de départ	Après gradient
Numération (10 ⁶ /ml)	126 ± 172	41 ± 76
Mobilité (%)	43 ± 24	66 ± 25
Mobilité progressive (%)	19 ± 12	45 ± 21
Formes normales (%)	48 ± 18	58 ± 20

D'après Parinaud, J., Richoille, G., Moutaffian, H. et al. (1996) Are the characteristics of spermatozoa in the insemination medium useful for predicting in-vitro fertilization results? Int. J. Androl., 19, 103-108.

FECONDATION IN VITRO-FECONDATION ASSISTEE

*Professeur Jean PARINAUD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguier, Toulouse*

Le principe général de ces techniques est de reproduire en laboratoire ce qui se passe normalement dans les trompes, c'est-à-dire la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire. Ces techniques dont l'application en clinique humaine date du début des années 80 pour la FIV (1^{er} enfant né en 1979 à Cambridge) et du milieu des années 90 pour l'ICSI (1^{er} enfant né en 93 à Bruxelles) ont non seulement permis d'apporter une solution thérapeutique à des infertilités jusque là insolubles mais sont également à la base des connaissances physiologiques modernes de la reproduction.

Toutes ces techniques ont en commun certaines étapes : stimulation ovarienne, ponction ovocytaire, culture embryonnaire, transfert d'embryons.

1. STIMULATION OVARIENNE

1.1. Principes

Le but ici est non pas de corriger un trouble de la folliculogénèse mais d'obtenir la croissance et la maturation simultanées de plusieurs follicules. Elle permet donc de récupérer plusieurs ovocytes II au cours d'un même cycle et donc l'obtention de plusieurs embryons ce qui augmente nettement les chances de succès.

Le principe est de compenser la baisse de FSH de milieu de phase folliculaire qui induit physiologiquement l'atrésie des follicules privilégiés (nécessitant de fortes doses de FSH pour continuer leur croissance) et ne permet que celle du follicule dominant (pouvant continuer sa croissance en présence de faibles quantités de FSH).

1.1.1 Notion de sensibilité individuelle des follicules à la FSH

Dans une même cohorte tous les follicules n'ont pas la même sensibilité à la FSH. Certains, et c'est le cas en particulier du follicule dominant, n'ont besoin que de faibles concentrations de FSH pour terminer leur croissance et la baisse de la FSH, induite par le rétro-contrôle exercé par l'estradiol et l'inhibine secrétés par les follicules en croissance, n'aura pas d'effet sur leur ovulation. Par contre d'autres, moins sensibles, ont besoin de taux supérieurs de FSH pour croître et la baisse de FSH en

milieu de phase folliculaire va entraîner leur atrophie. Ce mécanisme permet une ovulation mono-folliculaire en cycle spontané.

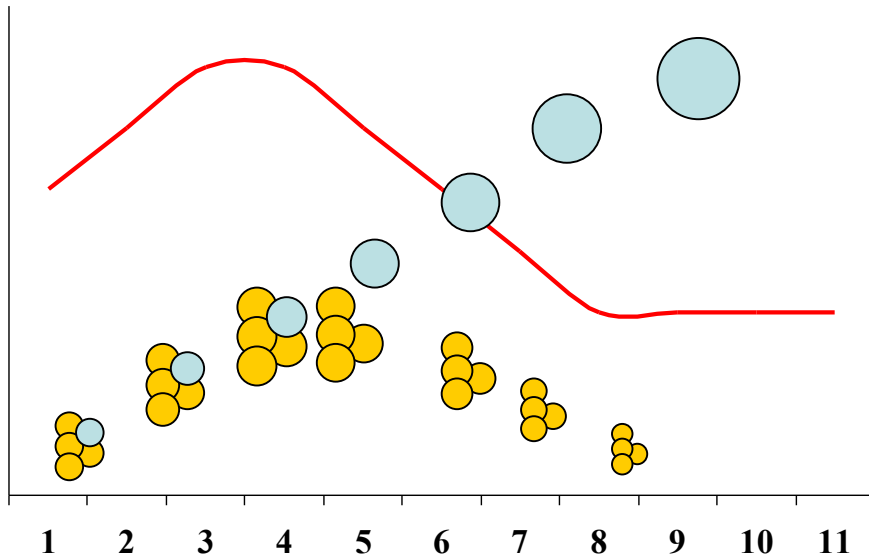


Figure 1 : Evolution d'une cohorte de follicules antraux en phase folliculaire en fonction des taux circulants de FSH en cycle spontané.

Pour obtenir la croissance finale de plusieurs follicules, il convient d'augmenter artificiellement les taux sanguins de FSH. Selon le niveau de FSH maintenu, on pourra obtenir l'ovulation d'un nombre plus ou moins grand de follicules.

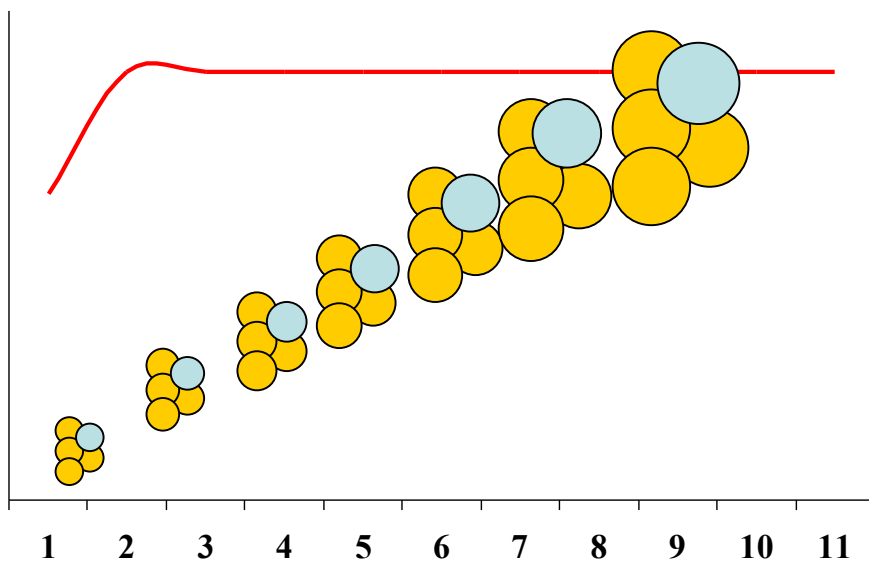


Figure 2 : Evolution d'une cohorte de follicules antraux en phase folliculaire lors du maintien artificiel de taux circulants élevés de FSH

Deux possibilités pharmacologiques sont disponibles :

- Le citrate de clomiphène (Clomid[®], Pergotime[®]), administré par voie orale, son mécanisme d'action consiste à inhiber le rétro-contrôle négatif de l'estradiol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et donc d'augmenter la sécrétion endogène de FSH.
- Les gonadotrophines exogènes : soit extraites d'urines de femmes ménopausées (hMG, mélange de FSH et LH, Menopur[®]) et injectables par voie intra-musculaire, soit synthétisées par génie génétique (FSH recombinante : Gonal F[®], Puregon[®] ; LH recombinante : Luveris[®]) et injectables par voie sous-cutanée.

Ces deux classes thérapeutiques peuvent être utilisées seules ou en association.

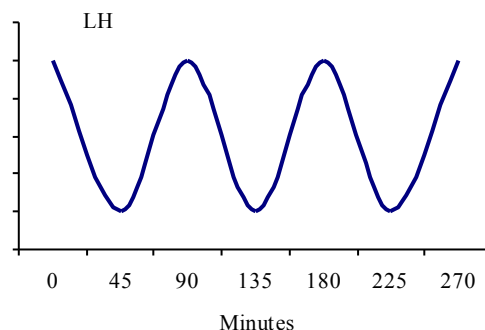
1.1.2 Problèmes posés par la croissance multifolliculaire

Un des problèmes majeurs de ces stimulations est l'hyper-estrogénie induite. En effet, chaque follicule en croissance va sécréter de l'estradiol dont les valeurs plasmatiques vont être très supérieures aux valeurs physiologiques (en moyenne 2000pg/ml versus 300pg/ml en fin de croissance folliculaire). Les inconvénients de cette hyper-estrogénie sur la croissance folliculaire sont liés au rétro-contrôle positif de l'estradiol sur la sécrétion de LH. Deux écueils peuvent apparaître :

- Montée prématurée de LH sur des follicules n'ayant pas fini leur croissance, entraînant une lutéinisation prématurée et l'atrésie.
- Pic spontané de LH, induisant l'ovulation avant la ponction folliculaire.

Pour éviter ces problèmes, il convient de bloquer l'axe hypothalamo-hypophysaire. Pour cela, on utilise des analogues du Gn-RH soit agonistes à demie-vie longue soit antagonistes.

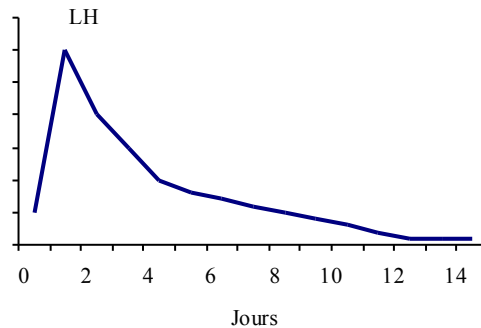
- La Gn-RH est sécrété de façon pulsatile et a une demie-vie très courte. Ces deux propriétés sont indispensables pour assurer la stimulation de l'hypophyse. En effet, l'administration continue de Gn-RH entraîne dans un premier temps une stimulation de l'hypophyse, suivie dans un second temps d'un blocage des sécrétions de LH et FSH.



Effet du Gn-RH sur la sécrétion de LH

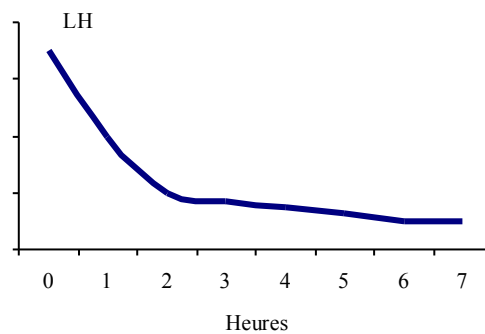
- Les agonistes ont le même effet que la Gn-RH, mais leur longue demie-vie équivaut à une perfusion continue de Gn-RH. Leur administration induit donc une stimulation de l'hypophyse avec une décharge de FSH et LH (effet flare-up) puis un blocage de la sécrétion des

gonadotrophines. Ce blocage n'est efficace qu'au bout d'environ 14 jours d'administration. Ces molécules sont commercialisées soit sous forme à libération immédiate nécessitant une injection sous-cutanée quotidienne (Décapeptyl® 0,1mg, Lucrin®, Suprefact®) soit sous forme à libération prolongée nécessitant une injection mensuelle voire trimestrielle (Décapeptyl® LP, Enantone®).



Effet des agonistes du Gn-RH sur la sécrétion de LH

- Les antagonistes sont des inhibiteurs compétitifs de la Gn-RH. Ils s'opposent à son effet et n'ont pas d'action de stimulation hypophysaire. Ils entraînent donc un blocage immédiat (quelques heures) de l'hypophyse. Deux antagonistes sont actuellement commercialisés en France (Cétrotide® sous deux formes injectables par voie sous-cutanée : 0,25mg pour une durée d'action de 24 heures, 3mg pour une durée d'action de 4 jours et Orgalutran®).



Effet des antagonistes du Gn-RH sur la sécrétion de LH

1.2. Protocoles

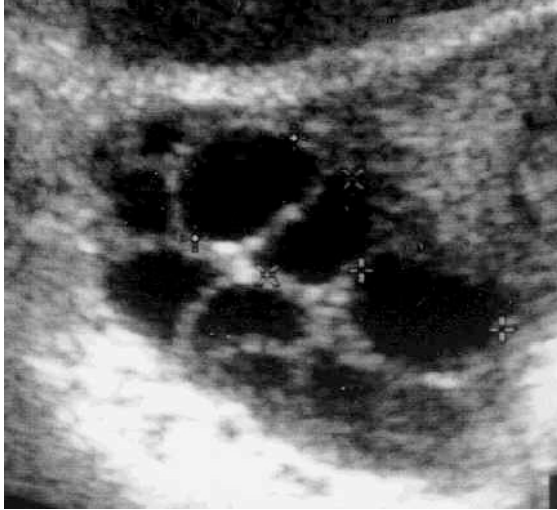
- Sans analogues de la Gn-RH. Ces protocoles sont actuellement peu utilisés en raison des risques de montée de LH et sont réservés à des cas bien précis (mauvaises répondeuses).
- avec agonistes de la Gn-RH. Leur emploi nécessite l'utilisation des gonadotrophines, le citrate de clomiphène étant inutilisable en raison du blocage hypophysaire.

- Protocole court : l'idée est d'utiliser la montée de FSH lors du flare-up pour initier la stimulation ovarienne. Ce protocole est très peu utilisé car il ne donne des résultats que dans un nombre restreint de centres.
- Protocole long : le principe est d'attendre l'obtention du blocage hypophysaire pour démarrer la stimulation par les gonadotrophines. Les agonistes (forme à libération immédiate ou prolongée) sont administrés soit à partir du milieu de la phase lutéale du cycle précédent soit à partir du 1^{er} jour du cycle de la tentative. Au bout de 14 jours de traitement, un contrôle de blocage (échographie ovarienne et dosage d'E2) est réalisé. Ce n'est que secondairement que l'on stimule par les gonadotrophines (100 à 300UI/j). C'est le protocole le plus utilisé actuellement (environ 90% des tentatives). Un de ses inconvénients réside dans la création d'une phase de privation estrogénique (blocage avant stimulation) avec tous les effets secondaires de la ménopause (bouffées de chaleur, spottings, troubles de l'humeur).
- Antagonistes du Gn-RH : le blocage hypophysaire étant immédiat, les antagonistes ne sont administrés que lorsqu'il y a un risque de montée de LH, c'est-à-dire lorsque les taux d'estradiol atteignent 400 pg/ml soit environ au 8^{ème} jour du cycle. Le 1^{er} antagoniste n'étant commercialisé en France que depuis fin 2000, l'expérience de ce type de protocole est relativement limitée.

Outre le choix de type de protocole, se pose celui de la quantité de FSH à administrer. Pour cela, il convient d'évaluer la réponse ovarienne potentielle. Cette évaluation, pour la première stimulation, se base sur l'âge des patientes (inversement proportionnel à la réponse), l'index de masse corporelle (inversement proportionnel à la réponse), le taux de FSH (inversement proportionnel à la réponse) et le rapport LH/FSH (proportionnel à la réponse). Ainsi les doses de FSH administrées lors d'un protocole agoniste long peuvent varier de 100 à 300UI/j. Il est évident que pour les stimulations suivantes, il est essentiellement tenu compte de la réponse obtenue lors de la stimulation précédente.

1.3. Surveillance de la stimulation

La surveillance est un point clé car elle va permettre d'adapter les doses de FSH, de faire le prélèvement ovocytaire au bon moment (fin de croissance et de maturation) et d'éviter les complications éventuelles (hyperstimulation). Elle consiste à effectuer une échographie pelvienne qui permet de mesurer la taille et le nombre de follicules ainsi que l'épaisseur de l'endomètre et un dosage d'estradiol (et de LH si l'on utilise pas les analogues du Gn-RH). Cette surveillance débute généralement au 7^{ème} ou 8^{ème} jour de stimulation et le rythme et la durée dépendent des résultats et de l'évolution de la croissance folliculaire. En moyenne, 3 à 4 échographies et dosages d'estradiol sont effectués.



Vue échographique d'un ovaire stimulé



Vue échographique d'un endomètre en cours de stimulation

1.4. Déclenchement de l'ovulation

Le déclenchement de l'ovulation se fait par injection intra-musculaire de 10.000 unités d'hCG. L'hCG est administrée lorsque les critères suivant sont obtenus :

- Au moins 3 follicules \geq 16mm (taille variable selon les protocoles, 18mm pour certains)
- Endomètre \geq 10mm
- E2 < 3000pg/ml

Il est indispensable de respecter ces critères. Il peuvent ne pas être atteints dans deux circonstances opposées :

- Hypostimulation : insuffisance de recrutement folliculaire. Dans ce cas, les chances de succès sont très faibles et il est préférable d'arrêter la tentative plutôt que la faire dans de mauvaises conditions.
- Hyperstimulation : recrutement trop important avec des taux d'E2 trop élevés. Dans ces cas, l'administration d'hCG peut être suivie de complications graves (ascite, thromboses). La non administration d'hCG et l'injection d'agonistes du Gn-RH à libération prolongée permettent de mettre les ovaires au repos et d'éviter ces complications.

2. PONCTION FOLLICULAIRE

Le prélèvement ovocytaire se fait en fin de maturation ovocytaire c'est-à-dire 36 heures après l'injection d'hCG (soit 1 à 3 heures avant l'heure théorique de l'ovulation).

Il se fait sous contrôle échographique. Pour cela, une sonde d'échographie est introduite dans le vagin et une aiguille est guidée à travers la paroi vaginale jusque dans les follicules. Le contenu ovocytaire (liquide folliculaire + complexe cumulo-ovocytaire) est alors aspiré dans un tube et transmis au laboratoire.

La ponction se fait en hospitalisation de jour, le plus souvent après une anesthésie locale de la paroi vaginale après prémédication. Toutefois, certains réalisent des anesthésies générales.

Une ponction folliculaire permet de récupérer en moyenne 9 ovocytes. Toutefois, le rendement n'est pas de 100%, certains follicules pouvant être difficile à ponctionner en fonction de leur position.

Ces ponctions ne sont pas complètement dénuées de risque. En effet, il existe un risque infectieux (abcès de l'ovaire, pelvi-péritonite) dû au passage de l'aiguille à travers un milieu septique (vagin) et à la possibilité d'effraction d'une anse intestinale. Ce risque est faible : 1 cas pour environ 1000 ponctions. Le risque hémorragique, dû à la piqûre d'un gros vaisseau, est lui exceptionnel (aucun cas au CHU de Toulouse sur environ 10.000 ponctions).

3. FECONDATION IN VITRO

Les ovocytes recueillis sont placés dans un milieu de culture spécialement conçu pour la fécondation, c'est-à-dire riche en glucose (nécessaire au métabolisme énergétique du spermatozoïde) et en calcium (nécessaire à la capacitation et à la réaction acrosomique) et pauvre en acides aminés (les synthèses protéiques étant quasi-inexistantes pendant la fécondation). Ces milieux sont incubés à 37°C en présence de 5% de CO₂ pour permettre la conservation d'un pH à 7,4, le système tampon du milieu étant à base de bicarbonate de sodium.



Boîte de culture de FIV

Les ovocytes sont inséminés avec 50.000 spermatozoïdes mobiles obtenus après capacitation et sélection in vitro.

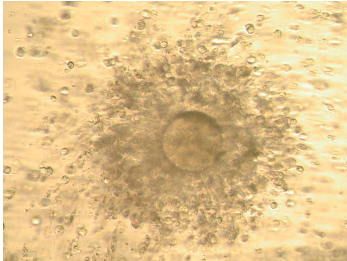
Au bout soit de 5 heures soit de 18 heures d'incubation avec les spermatozoïdes, les ovocytes sont dénudés (enlèvement du cumulus et de la corona radiata) par pipetages successifs puis mis dans un milieu de culture approprié au développement embryonnaire précoce (pauvre en glucose, riche en pyruvate et contenant des acides aminés non essentiels et de l'EDTA).

4. FECONDATIONS ASSISTEES

Ces techniques, dérivées de la FIV, consistent à court-circuiter toutes ou parties des fonctions du spermatozoïde (mobilité, réaction acrosomique...).

4.1. Traitement préalable des ovocytes

Au moment de leur recueil les ovocytes sont entourés du cumulus oophorus, ce qui empêche la visualisation précise de la zone pellucide, de la membrane plasmique et du 1^{er} globule polaire.



Ovocyte au moment du recueil

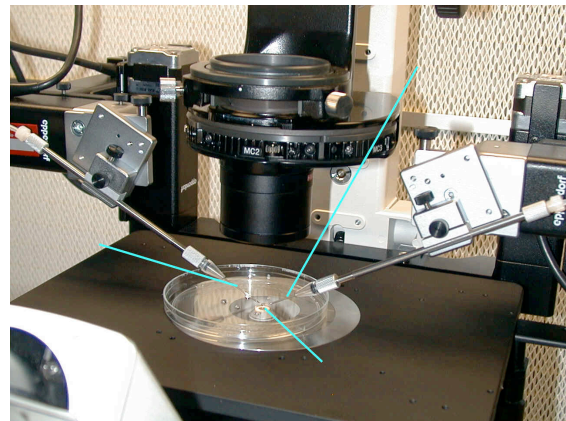
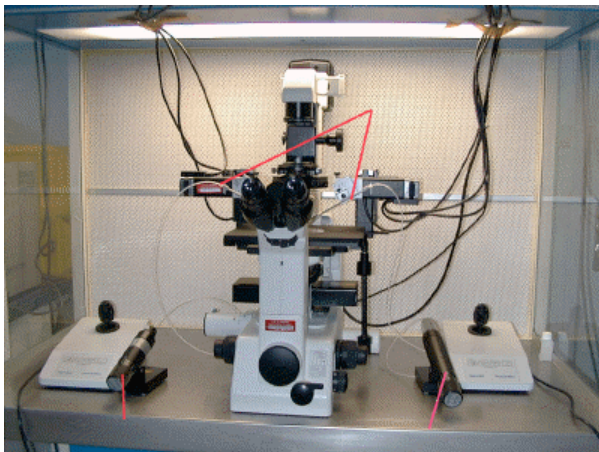


Ovocyte après décoronisation

Pour pouvoir manipuler ces ovocytes il est nécessaire d'enlever les cellules qui les entourent (décoronisation). Le cumulus oophorus est enlevé par incubation dans une solution de hyaluronidase (enzyme normalement présente dans l'acrosome). Les cellules de la corona radiata sont ensuite enlevées mécaniquement par pipetages successifs. Ils sont ensuite mis soit dans un milieu de fécondation (PZD, SUZI) ou de croissance embryonnaire (ICSI).

4.2. Appareillage nécessaire

La manipulation des ovocytes et des spermatozoïdes nécessite un appareillage spécifique. En effet, les micropipettes utilisées pour l'injection de spermatozoïdes mesure environ 6 μ de diamètre et l'injection nécessite une précision de mouvement de l'ordre du micron. Pour pouvoir réaliser cela, les pipettes sont montées sur des porte-pipettes manipulés par l'intermédiaire de joysticks. Les manipulations se font au microscope au grossissement 200 ou 400X.

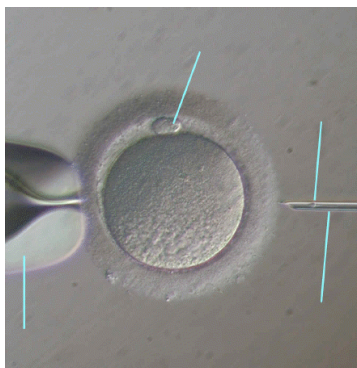
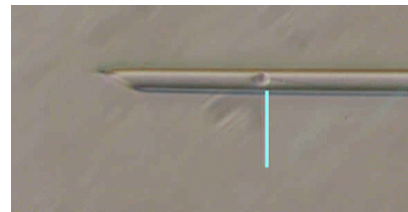
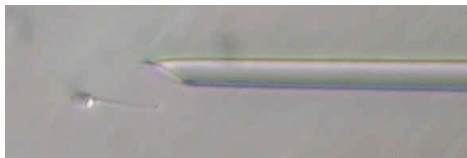


4.3. IntraCyttoplasmic Sperm Injection (ICSI)

Issue d'une erreur lors d'une SUZI, (injection de spermatozoïdes dans le cytoplasme et non dans l'espace péri-vitellin), l'ICSI est devenue une technique essentielle dans la prise en charge des infertilités d'origine masculine. Elle consiste à injecter directement un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire. Ceci permet de court-circuiter la mobilité et la réaction acrosomique. La seule limitation ici est la vitalité des spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes, après capacitation et sélection, sont mis dans une solution de polyvinyl pyrrolidone (PVP), permettant d'augmenter la viscosité du milieu ce qui facilite l'injection. Le flagelle est ensuite sectionné avec la pipette d'injection. Cette action permet de faire rentrer du calcium dans le spermatozoïde et est indispensable à l'activation de l'ovocyte. Le spermatozoïde est ensuite aspiré dans la pipette d'injection.

L'ovocyte est maintenu par aspiration grâce à la pipette de contention. Il est positionné avec le 1^{er} globule polaire à midi ou 6 heures. Ceci va permettre l'injection à distance du fuseau de métaphase II, celui se trouvant, le plus souvent, près du 1^{er} globule polaire. La pipette d'injection est alors introduite à 3h, perforant ainsi la zone pellucide. La membrane plasmique est plus difficile à franchir. Pour cela, on aspire un peu de cytoplasme ce qui va entraîner la rupture de la membrane. Le cytoplasme aspiré ainsi que le spermatozoïde et son milieu de culture (PVP) sont alors injectés dans le cytoplasme.



En moyenne, 95% des ovocytes sont intacts après injection et 60% donnent des zygotes diploïdes.

5. EVALUATION DE LA FECONDATION ET SURVEILLANCE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Environ 16 heures après la mise en fécondation en FIV ou l'injection en ICSI, les ovocytes sont observés pour évaluer la fécondation. Le nombre, la taille et la morphologie (position et nombre de nucléoles) sont notés. Les zygotes sont alors remis à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Le lendemain les embryons sont observés et leur qualité évaluée. Cette évaluation est basée sur 3 critères :

- Nombre de cellules (à ce stade les embryons ont normalement 4 cellules).
- Taille des cellules qui doivent être identiques
- Présence ou non de fragments cytoplasmiques. Ces fragments, s'ils excèdent 30% du volume de l'embryon, sont de mauvais pronostic.

A partir de ces éléments les embryons sont classés selon un score qui permet de déterminer leur capacités développementales. Si l'on utilise la classification de Giorgetti (Giorgetti, C., Terriou, P., Auquier, P. *et al.* (1995) Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum. Reprod.*, **10**, 2427-2431.), les chances de grossesses sont de 11% pour un embryon de score 4, 8% pour un embryon de score 3, 5% pour un embryon de score 2 et 4% pour un embryon de score 1.



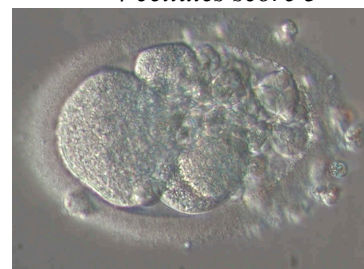
4 cellules score 4



4 cellules score 3



4 cellules score 2



3 cellules score 1

L'établissement de ce score est absolument indispensable pour le choix du nombre d'embryons à transférer.

Généralement le transfert se fait à ce stade. Toutefois, la culture des embryons peut, dans le même milieu de culture, se prolonger de 24 heures, le transfert se faisant alors au stade 8 cellules.

6. TRANSFERT D'EMBRYONS

Le transfert d'embryons s'effectue le plus souvent à J2 (48 heures après la ponction) ou éventuellement à J3. Un myorelaxant de type Valium® est habituellement administré 1 heure avant le transfert. Le transfert est généralement réalisé sous contrôle échographique à l'aide d'une sonde abdominale. Un cathéter contenant les embryons est alors introduit à travers le col de l'utérus et les embryons sont déposés à environ 1 cm du fond utérin.

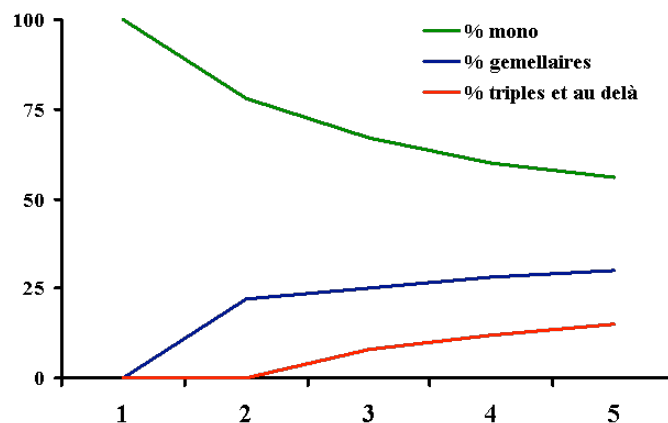


Cathéter de transfert d'embryons

Après un repos allongé d'environ 30 minutes, les patientes reprennent une vie normale, sans précaution particulière. Un traitement par progestérone (Utrogestan®) est administré par voie vaginale pendant environ 12 jours. Si les règles n'apparaissent pas au bout de 15 jours après le transfert, un dosage de β hCG est réalisé pour confirmer la grossesse.

Un des points les plus difficiles dans le transfert est le nombre d'embryons à transférer. En effet, le taux de grossesse est proportionnel au nombre d'embryons transférés.

Mais le taux de grossesses multiples, qui posent de gros problèmes obstétricaux et néo-natals (grossesses triples), est également proportionnel au nombre d'embryons transférés.



Taux de grossesses multiples en fonction du nombre d'embryons transférés (FIVNAT 1994)

La problématique est donc de donner un maximum de chances de grossesse tout en limitant les risques de grossesse multiple. Pour cela, il faut prendre en compte les facteurs influant sur les taux de grossesse. Trois facteurs influent de façon très importante : l'âge de la patiente, la réponse à la stimulation et la qualité des embryons.

7. RESULTATS

7.1. Stimulation

Le taux d'annulation de cycle pour réponse inadéquate est en moyenne de 13%, avec dans 1/3 des cas une hyperstimulation et dans 2/3 des cas une hypostimulation. En réalité, ces taux sont variables selon le rang de la tentative (19% pour la première, 10% pour les suivantes). Ceci est dû au fait que les critères utilisés pour le choix du 1^{er} protocole de stimulation (cf. 1.2.) sont relativement peu fiables et que le meilleur moyen d'évaluer la réponse des ovaires d'une patiente est de l'avoir déjà stimulée.

7.2. Ponction

Les ponctions blanches (ne rapportant aucun ovocyte) sont exceptionnelles (<1%) et sont liées à des défauts de stimulation. En moyenne 8,8 ovocytes sont obtenus mais avec de grandes variations individuelles (0 à 32). Ces variations sont essentiellement dues aux différences de réponse ovarienne à la stimulation. Toutefois, la ponction peut ne pas ramener tous les ovocytes en raison de difficultés techniques (ovaires difficilement accessibles).

7.3. Fécondation

Les taux de fécondation sont identiques en FIV et en ICSI (60%). Dans environ 5% des cas, aucun embryon n'est obtenu. Ceci est dû soit à une mauvaise qualité du sperme, soit à une mauvaise qualité des ovocytes. Toutefois, dans environ 20% des cas aucune cause n'est trouvée. Le fait que seulement 60% des ovocytes donnent des embryons est en grande partie dû à l'hétérogénéité des ovocytes puisque seulement 80% d'entre eux sont au stade ovocyte II. Enfin, en ICSI, environ 5% des ovocytes sont lysés lors de l'injection.

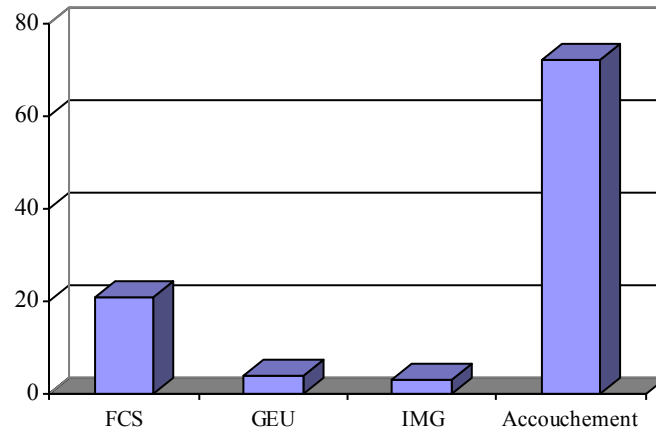
Le taux d'ovocytes activés (1PN) est de 3% et celui d'embryons triploïdes (3 PN) de 3%.

Parmi les zygotes diploïdes, 3% restent bloqués au stade zygote et ne subissent pas la 1^{ère} mitose.

7.4. Transfert

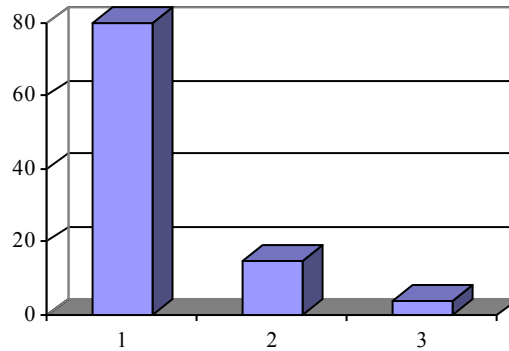
Le taux de grossesse par transfert est d'environ de 30% et le taux d'implantation (nombre de sacs gestationnels/ nombre d'embryons transférés) de 15%. Le nombre moyen d'embryons transférés est en moyenne de 2,3.

Le devenir de ces grossesses n'est pas différent de celui des grossesses spontanées.



Devenir des grossesses (FCS = fausse-couche ; GEU = grossesse extra-utérine ; IMG = interruption médicale de grossesse) (CHU Paule de Viguier)

Toutefois, les grossesses obtenues par FIV ou ICSI sont caractérisées par le pourcentage très élevé de grossesse multiple (21% pour les gémellaires, 4% pour les triples).



Répartition du nombre de sacs gestationnels (CHU Paule de Viguier)

8. INDICATIONS

8.1. Infertilités tubaires

La Fécondation In Vitro a été mise au point à l'origine pour résoudre les problèmes tubaires non accessibles à la chirurgie. Si la salpingectomie bilatérale ne pose bien évidemment pas problème d'indication, les autres pathologies tubaires nécessitent un choix entre la chirurgie et la FIV. Ce choix dépend du type des lésions tubaires, de l'âge de la patiente et de l'existence ou non d'autres facteurs d'infertilité (anomalie de l'ovulation, oligo-asthéo-tératospermie ...).

8.2. Endométriose

Outre les pathologies tubaires qu'elle induit, l'endométriose entraîne des modifications du milieu péritonéal qui sont délétères pour la fécondation et le développement embryonnaire. La FIV permet donc de court-circuiter ce problème.

8.3. Oligo-asthéo-tératospermies (OAT)

Dans ces indications, la FIV permet de rapprocher les gamètes alors que l'ICSI permet de court-circuiter la plupart des fonctions du spermatozoïde. Le choix entre les 2 techniques va dépendre de la qualité du sperme. Trois facteurs interviennent : le nombre de spermatozoïdes mobiles obtenus après préparation, le pourcentage de formes normales et celui d'acrosomes malformés.

8.4. Azoospermies excrétoires

Dans ces cas, les spermatozoïdes sont prélevés le plus souvent dans l'épididyme, éventuellement dans les testicules. Ces spermatozoïdes sont très peu mobiles et ont souvent fait la réaction acrosomique. Dans ces conditions, seule l'ICSI peut permettre d'obtenir des taux de fécondation corrects.

8.5. Azoospermies sécrétoires

Dans beaucoup d'azoospermies sécrétoires des spermatozoïdes peuvent être récupérés par biopsie testiculaire et utilisés en ICSI.

8.6. Echecs d'IAC

Qu'elle que soit l'indication, 6 cycles maximum sont réalisés. Au delà, des FIV sont effectuées.

8.7. Echecs d'IAD

Là aussi, le nombre d'IAD est limité (6 à 12) et au delà, des FIV avec donneur sont proposées. Le plus souvent une ICSI est réalisée, les taux d'échecs en FIV conventionnelle étant de 30% avec du sperme congelé (versus 5% en ICSI).

9. CULTURE JUSQU'AU STADE BLASTOCYSTE

Comme décrit dans le chapitre « 1^{ère} semaine du développement embryonnaire », le passage de 8 à 16 cellules est un étape clé car il correspond au moment où les transcrits embryonnaires prennent le pas sur les transcrits maternels pour assurer le métabolisme de l'embryon. Ainsi, beaucoup d'embryons arrêtent leur développement à ce stade, la qualité de leur noyau ne leur permettant pas d'assurer une transcription quantitativement et qualitativement suffisante. L'idée ici est donc de prolonger la culture des embryons jusqu'au stade blastocyste afin de sélectionner les seuls embryons capables de dépasser le stade 8 cellules et donc ayant le meilleur potentiel de développement. Ceci permet de transférer moins d'embryons (diminution des risques de grossesses multiples) tout en conservant un bon taux de grossesse.

9.1. Techniques

Les milieux conventionnels ne permettent pas la culture jusqu'au stade blastocyste. Des alternatives ont donc été mises au point.

9.1.1 Co-cultures

Il s'agit ici de cultiver les embryons sur un tapis cellulaire tout en utilisant les milieux conventionnels. Les cellules épithéliales utilisées sont soit autologues, c'est-à-dire provenant de la patiente elle-même (cellules de la granulosa, cellules endométriales) ou hétérologues comme des lignées de cellules de rein de singe (cellules VERO). Actuellement seules les cellules autologues sont autorisées en France. Le mécanisme d'action des co-cultures est encore inconnu (détoxification, apport de facteurs de croissance...).

9.1.2 Milieux séquentiels

Les embryons sont transférés à J3 dans un milieu synthétique spécialement adapté aux changements de métabolisme de l'embryon à 8 cellules. C'est la technique la plus employée aujourd'hui.

9.2. Indications

Longtemps réservée aux échecs d'implantation (plusieurs transferts sans grossesse) la culture prolongée est, dans certains laboratoires, utilisée de manière systématique.

9.3. Résultats

Les taux d'implantation sont effectivement augmentés après transfert de blastocystes (30% vs 15%) mais le taux de grossesse reste identique, le nombre d'embryons transférés étant plus faible (1 à 2 seulement). Toutefois, il faut souligner que des blastocystes ne sont pas obtenus chaque fois et que dans environ 15% des cas il n'y a pas de transfert embryonnaire. Enfin, il semble que la congélation de blastocystes soit moins efficace que celle d'embryons plus précoces diminuant légèrement l'efficacité globale de la culture prolongée.

10. ECLOSION ASSISTÉE (ASSISTED HATCHING)

Vers le 6^{ème} jour du développement embryonnaire, le blastocyste va sortir de la zone pellucide pour pouvoir s'implanter dans l'endomètre. Or il a été rapporté des anomalies de la zone pellucide à type d'épaississement ou de durcissement (zona hardening) se produisant lors du vieillissement des ovocytes ou lors de mauvaises conditions de culture in vitro. Ces anomalies empêcheraient l'éclosion du blastocyste et donc la nidation. Il a donc été proposé de créer des brèches dans la zone pellucide pour compenser ces anomalies et ainsi faciliter l'éclosion du blastocyste. Ces brèches sont faites soit mécaniquement, soit chimiquement soit plus récemment avec un laser. Cette technique a été proposée chez les patientes âgées, en cas de défaut d'implantation (antécédents de transferts embryonnaires sans grossesse) ou de zone pellucide épaissie. Si les premiers résultats apparaissaient encourageants, il faut constater que cette méthode a fait la preuve de son.....inefficacité.

11. RETRAIT DES FRAGMENTS CYTOPLASMIQUES

L'évaluation de la qualité embryonnaire a très largement montré l'impact négatif de la présence de fragments cytoplasmiques dans l'embryon. Une équipe a postulé que ces fragments pouvaient induire des modifications physico-chimiques de l'environnement de l'embryon qui seraient délétères pour son développement. Ils ont donc proposé de les enlever avant d'effectuer le transfert embryonnaire espérant ainsi restaurer la compétence développementale des embryons. Pour cela, on crée une brèche dans la zone pellucide par laquelle on introduit une pipette qui va servir à aspirer les fragments. Les résultats publiés montrent que cette technique permet d'augmenter le pourcentage d'embryons atteignant le stade blastocyste ainsi que le taux de grossesse. Toutefois les résultats ne sont rapportés que par une seule équipe et n'évoluent pas dans le temps (toujours le même nombre de cas). De plus il convient de noter qu'il a été montré que ces fragments cytoplasmiques sont dus à des phénomènes d'apoptose et seraient donc non pas la cause mais la conséquence de la mauvaise qualité embryonnaire. Par contre, cette technique pourrait avoir un intérêt dans la lyse de blastomères après congélation-décongélation. En effet il s'agit ici d'un processus mécanique qui lèse une cellule et l'extrusion du cytoplasme pourrait entraîner des lésions des cellules environnantes (peroxydation des lipides membranaires). Le retrait de l'exsudat pourrait éviter ce problème.

12. TRANSFERT DE CYTOPLASME

Le vieillissement s'accompagne d'une diminution de la capacité des ovocytes à produire des embryons aptes à se développer. Ceci est dû à une diminution de la qualité du cytoplasme (ARNm, organites cellulaires). L'idée ici est de compenser ce défaut cytoplasmique en remplaçant une partie du cytoplasme d'un ovocyte âgé (receveur) par du cytoplasme d'un ovocyte de femme jeune (donneur).

Pour ce faire, on prélève à l'aide d'une micro-pipette du cytoplasme de l'ovocyte donneur que l'on injecte ainsi dans l'ovocyte receveur avant mise en fécondation. Il s'agit donc d'une alternative à certains dons d'ovocytes, le capital génétique nucléaire de l'enfant étant celui de la receveuse. 56 tentatives ont été rapportées ayant permis l'obtention de 22 grossesses (39%) et la naissance de 28 enfants. L'hétéroplasmie (co-existence d'organites cytoplasmiques de 2 origines différentes) a pu être montrée dans de nombreux tissus (trophoblaste, sang de cordon fœtal, lymphocytes circulants) par le typage de l'ADN mitochondrial. Toutefois, l'American Association for the Advancement of Science a préconisé l'interdiction de cette technique car il s'agit, selon elle, d'une modification du génome.

13. ASPECTS LEGAUX

Comme toute AMP, la FIV et l'ICSI sont soumis à la loi de juillet 94 et au décret de février 2000. Elles nécessitent un agrément pour les cliniciens (prélèvement d'ovocytes et ponction d'épididyme et biopsie testiculaire) et pour les biologistes (FIV et ICSI).

Au même titre que les autres traitements de l'infertilité, la FIV et l'ICSI sont pris en charge à 100% par la sécurité sociale. Toutefois, le nombre de tentatives remboursées est limité à 4. Seules comptent les tentatives ayant donné lieu à une ponction, les transferts d'embryons congelés n'étant pas comptabilisés. De plus, les « compteurs » sont remis à zéro en cas de naissance d'un enfant vivant.

CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS

*Professeur Jean PARINAUD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguié, Toulouse*

1. PRINCIPE

La Fécondation In Vitro étant génératrice de nombreux embryons et le nombre d'embryons transférés étant volontairement limité, se pose la question du devenir des embryons surnuméraires. La cryoconservation va permettre de les garder pour une utilisation ultérieure.

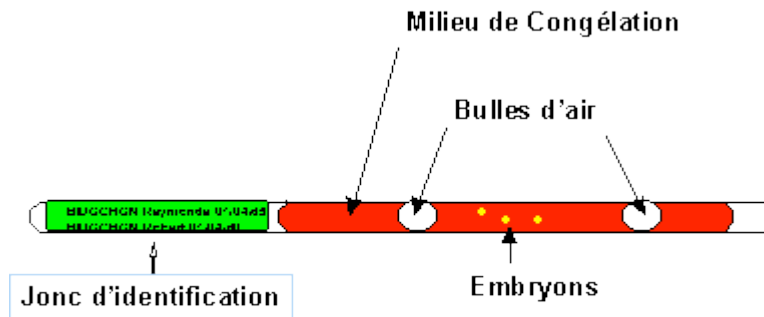
2. LES TECHNIQUES

La conservation de cellules dans l'azote liquide (-196°C) permet l'inhibition de toute activité métabolique et enzymatique et donc de figer la cellule en l'état. Le problème qui se pose est la formation de glace. En effet, les cellules, à l'exception des spermatozoïdes, sont formées essentiellement d'eau. Or l'eau cristallise à faible température en formant de la glace, qui occupe un volume supérieur à celui de l'eau liquide. Il s'en suit une augmentation du volume cellulaire qui va entraîner la rupture de la membrane plasmique et l'éclatement de la cellule. Pour éviter cela, deux techniques sont possibles : la congélation et la vitrification.

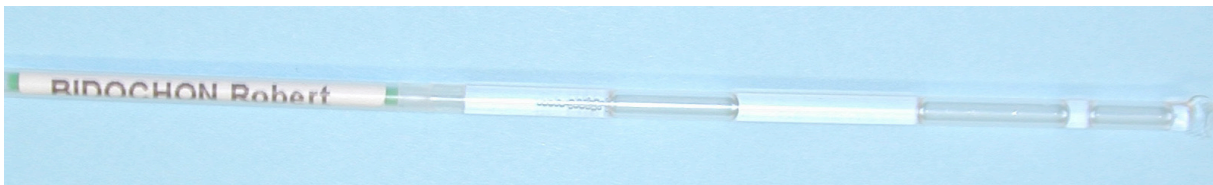
2.1. La congélation

Ici il s'agit de limiter la cristallisation. Pour ce faire on combine deux méthodes : déshydratation et remplacement de l'eau intracellulaire par un cryoprotecteur. La déshydratation s'obtient en mettant les embryons dans des solutions hyper-osmolaires (sucrose) ce qui va entraîner un flux d'eau du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur. Les cryoprotecteurs sont des substances qui ont la propriété de ne pas cristalliser à basse température (antigel). Les plus utilisés sont le propanediol et le glycérol. Le choix du cryoprotecteur est différent selon le stade de développement des embryons, les membranes plasmiques ayant des perméabilités différentes aux cryoprotecteurs. Ainsi, le propanediol est le cryoprotecteur le plus utilisé pour les stades 4 et 8 cellules, alors que le glycérol est préféré pour les blastocystes. Le remplacement de l'eau intracellulaire par le cryoprotecteur se fait en plongeant les embryons dans des milieux de concentrations croissantes en cryoprotecteur. Les embryons sont ensuite placés dans une paillette scellée. Les paillettes sont ensuite placées dans un appareil à congélation qui va permettre une descente contrôlée en température. Une première descente de $-2^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ est réalisée de la température ambiante jusqu'à -7°C . Lorsque cette température est atteinte, on réalise le seeding. Ceci consiste à toucher la paillette avec une barre métallique préalablement plongée dans l'azote

liquide. Le seeding va entraîner une cristallisation du milieu environnant l'embryon et des modifications de ses propriétés physico-chimiques qui vont modifier les échanges avec l'embryon. Le seeding est absolument indispensable à la bonne réalisation de la congélation. La température est ensuite abaissée à -30°C avec une pente de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ puis très rapidement ($-25^{\circ}\text{C}/\text{mn}$) jusqu'à -140°C . Les paillettes sont ensuite stockées dans l'azote liquide.



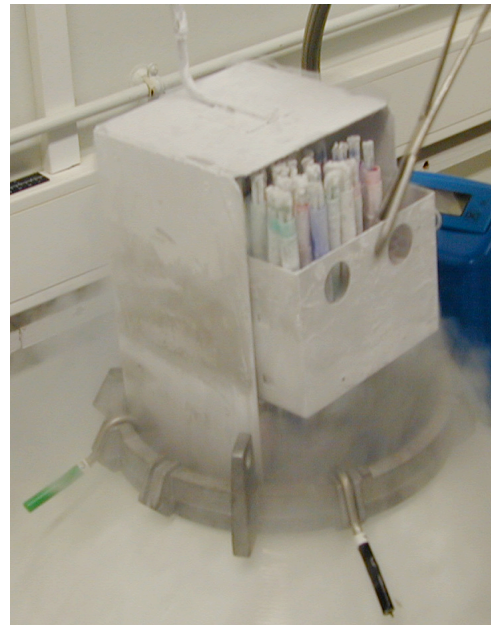
Paillette pour congélation d'embryons



Appareil de congélation



Cuve de stockage



Paillettes dans la cuve de stockage

La décongélation s'effectue brutalement en plongeant les paillettes dans un bain-marie à 37°C . Le cryoprotecteur est ensuite enlevé en incubant les embryons dans des solutions de concentrations décroissantes en cryoprotecteur puis les embryons sont mis en culture dans un milieu conventionnel jusqu'au transfert.

2.2. La vitrification

Il s'agit d'une technique prometteuse, ayant donné d'excellents résultats chez la souris, qui devrait voir ses applications humaines dans les prochaines années. L'état vitreux est un état solide différent de l'état cristallin. En effet, lors de la cristallisation il y a un changement de conformation des molécules. Lors de la vitrification ces changements ne se produisent pas et la conformation moléculaire est la même que lors de l'état liquide. Les risques de lésion cellulaire sont donc bien moindres lors de la vitrification. La vitrification est obtenue par une descente extrêmement rapide en température. Ceci est possible pour des petites particules en les plongeant à grande vitesse dans l'azote liquide. La situation est plus compliquée pour des embryons en raison de leur volume et donc de leur inertie thermique et de leur contenant (paillettes) qui va également ralentir la descente en température. Pour pallier ces problèmes on peut utiliser de très grandes concentrations de cryoprotecteur (40%) et mettre les embryons dans une bulle de milieu de culture au sein d'une boucle de nylon (cryo-loop). La bulle tient dans la boucle par tensio-action. La boucle attachée à un couvercle de tube peut être plongée directement dans l'azote liquide.

3. CHOIX DES EMBRYONS A CONSERVER

Tous les embryons ne sont pas aptes à la cryoconservation. En effet, au stade 4 cellules, seuls les embryons de score 3 ou 4 (selon la classification de Giorgetti) sont aptes à supporter les phases de congélation-décongélation. Il est donc inutile de congeler les autres. Ce choix des embryons à congeler est absolument crucial pour l'efficacité de la congélation.

4. TRANSFERT DES EMBRYONS

Le but n'est pas ici d'obtenir une ovulation de bonne qualité, les embryons existant déjà, mais un endomètre apte à la nidation. Pour cela, plusieurs méthodes sont utilisables.

4.1. Cycle spontané

Cette possibilité est utilisée lorsque les patientes ont spontanément une ovulation de bonne qualité. Dans ces cas, aucun traitement n'est donné et l'on se contente de faire une surveillance échographique et hormonale (E_2) pour dépister le jour de l'ovulation. (ici, date d'ovulation = date de ponction).

4.2. Cycle faiblement stimulé

Lorsque les patientes présentent un trouble de l'ovulation, on peut stimuler les ovaires par de faibles doses de FSH. Cela nécessite, comme toute stimulation ovarienne une surveillance stricte. Le transfert se fait en fonction de la date de congélation après la ponction (ici, date de déclenchement par hCG = date de ponction - 2). La difficulté dans ce protocole est d'éviter les risques d'hyperstimulation.

4.3. Cycle artificiel ou substitué

Dans ce cas l'ovulation est complètement court-circuitée. On administre des œstrogènes, par voie orale ou trans-cutanée, de façon progressive pour mimer un cycle naturel et faire proliférer l'endomètre. Une ou deux échographies sont réalisées pour évaluer la qualité de l'endomètre. Lorsque celle-ci est satisfaisante, on administre de la progestérone pour amener l'endomètre en phase sécrétoire. Le transfert se fait en fonction de la date de congélation après la ponction (ici, date de début de la progestérone = date de ponction - 1). L'inconvénient de ce protocole réside dans le fait que les doses d'œstrogènes administrées sont contraceptives et qu'il n'y a donc pas de formation de corps jaune. Il est donc indispensable de supplémenter les patientes en progestérone jusqu'à ce que le placenta prenne le relais, c'est-à-dire aux environs de la 9^{ème} semaine de grossesse.

5. RESULTATS

La congélation se fait dans environ 25% des tentatives de FIV ou ICSI avec en moyenne 3 embryons congelés.

Environ 80% des embryons sont intacts après décongélation, permettant un transfert dans 95% des cycles où une décongélation a été faite.

Le taux de grossesse est de 20% par transfert mais extrêmement variable d'un centre à l'autre, la congélation étant certainement la technique de laboratoire la moins reproductible.

6. DEVENIR DES EMBRYONS CONGELES

Si d'un point de vue biologique la durée de conservation des embryons dans l'azote liquide est illimitée, il n'en est pas de même d'un point de vue éthique et juridique.

La loi de juillet 1994 autorise la conservation des embryons pour un délai maximal de 5 ans. Toutefois, la même loi, qui aurait dû être révisée en 1999 interdit la destruction de ces embryons.

D'un point de vue légal le transfert de ces embryons ne peut s'effectuer qu'en présence des deux conjoints vivants et consentants, ce qui interdit tout transfert post-mortem.

Si la loi interdit leur destruction, elle autorise leur don à d'autres couples ou pour la recherche (après agrément du protocole de recherche par le comité d'éthique). Ceci ne peut se faire qu'avec accord du couple.

DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE (DPI)

*Professeur Jean PARINAUD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguier, Toulouse*

1. PRINCIPE

Le DPI consiste à faire un « tri génétique » des embryons. Il est réservé aux maladies génétiques graves pour lesquelles un diagnostic génétique est possible. Dans ces cas, une FIV est réalisée et la recherche de l'anomalie génétique est effectuée sur chacun des embryons obtenus. Les embryons atteints seront détruits alors que les embryons sains seront transférés en vue d'une grossesse. Il s'agit donc d'un substitut de diagnostic anténatal.

2. REALISATION

2.1. Fécondation In Vitro

Une FIV est réalisée selon les techniques habituelles. Il faut toutefois noter qu'ici les couples ne sont pas infertiles mais que la FIV est réalisée uniquement dans le but du diagnostic génétique sur les embryons.

2.2. Biopsie

Pour effectuer le prélèvement cellulaire, on réalise une brèche dans la zone pellucide à l'aide soit d'une solution acide (tyrode acide) soit d'un laser. Par cette ouverture, on peut introduire une pipette qui servira à aspirer la cellule. La biopsie peut se faire à 2 stades :

2.2.1 Biopsie de blastomère

Elle se fait au stade 4 ou 8 cellules, c'est-à-dire avant la différenciation cellulaire, à un moment où d'une part il n'y a pas de jonction intercellulaire ce qui facilite le prélèvement et d'autre part les cellules sont totipotentes et donc le prélèvement de l'une d'elles ne compromet pas le développement embryonnaire.

2.2.2 Biopsie de trophoblaste

Cela nécessite une culture jusqu'au stade blastocyste. Une brèche est faite dans la zone pellucide par laquelle le trophoblaste va faire hernie. La portion qui saille en dehors de la zone pellucide va ensuite être sectionnée et les cellules utilisées pour le DPI. Cette solution présente l'avantage de permettre de disposer d'un nombre conséquent de cellules pour le diagnostic génétique mais nécessite d'obtenir des blastocystes in vitro.

2.3. Diagnostic génétique

Il présente 2 particularités :

- Il doit être rapide (en temps réel), de façon à effectuer le transfert d'embryons le jour même de la biopsie.
- Il se fait sur un nombre très restreint de cellules voire sur une seule, ce qui oblige à des précautions très grandes pour éviter tout risque d'erreur.

Dans ces conditions, la réalisation d'un caryotype est impossible. Le diagnostic se fait soit par PCR soit par FISH.

La fiabilité du DPI reste encore imparfaite et généralement un diagnostic génétique anténatal est réalisé pour confirmer l'absence de l'anomalie chez le fœtus.

3. INDICATIONS

Les indications du DPI sont les maladies génétiques de particulière gravité comme la myopathie de Duchenne, la mucoviscidose ou certaines maladies liées à l'X. Il est souvent réalisé après naissance d'un enfant atteint ou après une ou plusieurs interruptions médicales de grossesse.

4. REGLEMENTATION

En France, le DPI, comme toutes les activités d'AMP, est strictement réglementé et soumis à agrément ministériel. En 2002 seuls 3 centres étaient agréés : CHU de Clamart, Strasbourg et Montpellier.

5. ASPECTS ETHIQUES

Le DPI a soulevé de grandes polémiques. Bien que prévu par la loi de juillet 1994, les premiers agréments n'ont été donnés qu'en 1999. C'est la notion de tri génétique des embryons qui a suscité une grande réticence, alors que le diagnostic génétique anténatal (DPN), pratiqué aux alentours de la 16^{ème} semaine de grossesse, qui débouche sur une interruption médicale de grossesse (IMG) si le fœtus est porteur de l'anomalie recherchée était déjà pratiqué. Certains opposants au DPI prennent comme argument que la conscience de l'acte d'interruption médicale de grossesse est plus forte que celle du DPI et donc limite les risques de dérive. Ces arguments oublient que d'une part les couples concernés par le DPI ont souvent subi une ou plusieurs IMG, avec l'impact psychologique que cela représente, et d'autre part la pénibilité de la FIV dont on ne peut pas dire que ce soit « une partie de plaisir ». Enfin il convient de souligner que le DPI contrairement au DPN n'est pas uniquement négatif. En effet, dans le DPI on ne se contente pas d'éliminer les embryons atteints mais on transfère des embryons sains, augmentant ainsi les chances pour le couple d'avoir un enfant en bonne santé.

DEVENIR DES GROSSESSES APRES AMP

*Docteur Florence LESOURD
Pôle d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction
Hôpital Paule de Viguier, Toulouse*

Des dizaines de milliers d'enfants sont nés grâce aux traitements inducteurs de l'ovulation et aux techniques d'assistance médicale à la procréation. Les caractéristiques de ces grossesses sont bien connues et leurs risques principaux sont liés à la survenue de grossesses multiples, source de prématurité, de retard de croissance intra utérin (RCIU), d'un taux élevé de mortalité périnatale (double de celui des grossesses spontanées).

Le devenir de la grossesse dépend du type d'inducteur et de la technique d'AMP utilisée.

1. DEVENIR DES GROSSESSES EN FONCTION DU TYPE D'INDUCTEUR

1.1. Citrate de clomiphène (CC)

Il n'est pas tératogène. Plusieurs études multicentriques, ayant comparé des enfants nés après induction de l'ovulation par du citrate de clomiphène à des enfants conçus spontanément, confirment que les enfants " citrate de clomiphène " ne sont pas plus exposés aux risques de malformation que la population témoin. D'ailleurs l' utilisation accidentelle de CC en début de grossesse n'est pas une indication d'interruption médicale de grossesse.

Le risque de grossesse multiple est multiplié par 10 : 8 à 12 %. Ce sont surtout des grossesses gémellaires, le plus souvent bichoriales biamniotiques.

Le risque de fausse-couche apparaît légèrement augmenté par rapport à la population témoin. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet anti estrogénique délétère qu'exerce le citrate de clomiphène sur l'endomètre et peut être sur les corps jaunes (raccourcissement de leur durée de vie ?). Le taux de grossesse extra utérine n'est pas augmenté.

1.2. Les gonadotrophines.

Leur utilisation s'accompagne d'une augmentation des complications obstétricales sans qu'il n'y ait d'effet indésirable direct du produit sur la grossesse. Les gonadotrophines ne sont pas tératogènes. Le taux de grossesses multiples est très augmenté, il est de l'ordre de 25 % (2 % dans la population générale). Ce sont le plus souvent des grossesses gémellaires (25 %). Les grossesses triples (3 %) et quadruples (2 %) sont nettement moins fréquentes.

Cette augmentation du taux de grossesse multiple s'accompagne d'une augmentation du taux de prématurité, de retard de croissance intra-utérin (RCIU) et de mortalité foetale in utero (MFIU). En effet, 5 à 8 % des grossesses gémellaires se termineront avant 32 semaines, taux qui atteint 20 % pour

les grossesses triples. Cette prématurité, liée à une hypotrophie extrêmement fréquente des enfants, se complique d'un taux de mortalité périnatale et de morbidité maternelle élevé (taux de césarienne élevé).

Le taux d'avortement moyen est de 18 %, ce taux élevé s'explique par différents mécanismes en particulier par le caractère multiple des grossesses mais probablement aussi par le rôle de l'hyperstimulation ovarienne clinique sévère. Le taux de grossesse extra utérine n'est pas augmenté.

Le développement post-natal des enfants est identique à celui observé dans la population générale, en particulier les enfants issus de ces grossesses ont une croissance normale, un développement pubertaire normal et un âge de ménarche normal.

2. DEVENIR DES GROSSESSES EN FONCTION DE LA TECHNIQUE D'AMP

Les données sont issues des fichiers FIVNAT (registre national d'analyse rétrospective annuelle) qui existe depuis 1986.

La technique d'AMP intervient sur le devenir de la grossesse d'une part à travers la stimulation d'autre part à travers l'étape de laboratoire (FIV, ICSI, congélation embryonnaire).

En France les trois quarts des accouchements triples proviennent d'un traitement de la stérilité. 40 % d'entre eux font suite à une technique d'AMP (IIU ou FIV), 35 % à un traitement de la stérilité hors AMP (stimulation simple par CC ou gonadotrophines). Les stimulations hors FIV sont les premières pourvoyeuses des grossesses multiples. Ceci s'explique par le fait que le déclenchement de l'ovulation se fait principalement sur des critères échographiques qui sont subjectifs puisqu'ils peuvent varier d'un opérateur à l'autre en particulier pour la mesure et le compte des follicules pré ovulatoires. En stimulation hors FIV, le taux de grossesse multiple est directement lié au nombre de follicules pré ovulatoires le jour du déclenchement. A l'inverse en FIV le contrôle du taux de grossesse multiple passe par un paramètre beaucoup plus objectif qu'est le nombre d'embryons transférés. La réduction indispensable du taux de grossesse multiple hors FIV passe par l'amélioration de la qualité du monitoring des stimulations et par le respect strict des conditions de déclenchement.

Parallèlement l'étape de laboratoire intervient par le type de technique utilisé.

2.1. La FIV conventionnelle :

C'est une fécondation spontanée qui se fait in vitro. Elle n'expose à aucune complication spécifique différente d'une fécondation in vivo.

2.2. L'ICSI

Depuis la naissance en 1992 du premier enfant à Bruxelles (Palermo *et al.*, 1992), l'ICSI a connu un extraordinaire développement, mais a toujours suscité des craintes vis à vis des risques pour l'enfant à venir. Ces craintes étaient basées sur deux problèmes :

- La manipulation des gamètes et l'aspect artificiel de la fécondation. A ce niveau, deux problèmes étaient soulevés :
 - Le choix non naturel du spermatozoïde qui va féconder impliquant le postulat, non illogique mais non réellement argumenté qu'un spermatozoïde non fécondant a une qualité nucléaire inférieure et que la zone pellucide et la membrane cytoplasmique ovocytaire, contrairement au biologiste, sélectionne les spermatozoïdes aptes à un développement normal du conceptus.
 - L'effraction de la membrane et du cytoplasme ovocytaire posant la question des risques de lésions du fuseau chromatinien et de l'introduction d'ADN étranger.
- Le risque de transmettre une infertilité masculine. L'avènement de l'ICSI a coïncidé avec un essor considérable des études concernant la génétique de l'infertilité masculine (Barratt *et al.*, 1997) et en particulier la découverte des micro-délétions de l'Y.

2.2.1 1. Taux de malformations

Taux global

Référence	Nombre d'enfants	Malformations majeures (%)	Malformations mineures (%)	Comparaison		Remarques
				Registre	Taux du registre	
(Bonduelle <i>et al.</i> , 1999)	1966	46 (2,3)		Office of Population Censuses and Surveys	2,5%	Pas d'anomalie spécifique
BLEFCO (Parinaud, 1997)	2799	55 (1,9)		EUROCAT	1,9%	Pas d'anomalie spécifique
(Eshre Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection, 1998)	807	16 (2,0)	?			Pas d'anomalie spécifique
FIVNAT 1998	2332	1,6%	0,7%	Institut Européen de Génomutations	1,5%	Augmentation des anomalies cardio-vasculaires
(Loft <i>et al.</i> , 1999)	730	20 (2,7)	9 (1,2)			Pas d'anomalie spécifique
(Wennerholm <i>et al.</i> , 2000)	1139	37 (3,2)	40 (3,5)	Swedish Medical Birth Registry	OR = 1,75	Augmentation hypospadias (risque relatif = 3)

L'étude suédoise a donc montré des taux bien supérieurs aux autres (7,6 % au total, dont il est vrai, la moitié étaient des malformations mineures. L'OR des enfants nés d'ICSI est de 1,75 après ajustement des calculs en fonction de différents facteurs : naissance en milieu hospitalier, année de naissance et âge de la mère. Le risque de malformation était donc plus élevé que dans la population normale.

Cependant, lorsqu'étaient pris en compte les risques associés aux naissances multiples, l'OR était réduit à 1,19. Il semble donc que l'augmentation du risque de malformation chez les enfants issus d'ICSI soit en partie lié à un niveau élevé de naissances multiples.

Notons l'incidence élevée de l'hypospadias (risque relatif = 3) qui pourrait être lié aux problèmes de fertilité du père.

Cependant, ces résultats sont difficiles à comparer entre eux et avec les différents registres pour plusieurs raisons :

- La définition des malformations mineures et majeures est variable selon la classification utilisée.
- L'exhaustivité du recueil des données des grossesses. C'est évidemment un point essentiel pour valider les études. Elle est difficile à évaluer et le taux de « perdus de vue » est de 6% pour l'enquête danoise, 2% pour l'équipe de Bruxelles et de 4% pour l'enquête BLEFCO mais est inconnue pour la plupart des études. On peut toutefois postuler qu'il en est de même pour les registres de référence.

Pour ce qui concerne les anomalies spécifiques, leur prévalence étant très faible, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur des populations de cette importance. Toutefois, la plupart des études ne rapportent pas d'augmentation d'un type particulier d'anomalie ; de plus les augmentations rapportées par certains, concernent des anomalies différentes.

2.2.2 Taux d'anomalies chromosomiques

Une première publication en 1995 avait alerté sur le risque d'anomalies des gonosomes chez les enfants issus d'ICSI, puisque sur 15 diagnostics prénataux, 5 montraient une anomalie (In't Veld *et al.*, 1995). Depuis, de nombreuses études se sont penchées sur ce problème et les résultats sont rapportés dans le tableau suivant.

Référence	Nombre de diagnostics	Nombre d'anomalies des autosomes (%)	Nombre d'anomalies des gonosomes (%)
(Bonduelle <i>et al.</i> , 1999)	1082	19 (1,8) (9/19 <i>de novo</i>)	9 (0,8) (9/9 <i>de novo</i>)
(Loft <i>et al.</i> , 1999)	209	7 (3,3) (6/7 <i>de novo</i>)	0
(Eshre Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection, 1998)	362	5 (1,3) (1/5 <i>de novo</i>)	3 (0,8)
FIVNAT 1998	?	2,3%	1,8%
BLEFCO (Parinaud, 1997)	875	31 (3,5)	6 (0,6)

Ces résultats sont difficiles à interpréter et à comparer à une population générale dans la mesure où beaucoup d'équipes ont pratiqué des caryotypes systématiques lors des grossesses ICSI. Toutefois, il

apparaît que les taux rapportés sur les anomalies autosomiques sont proches de ceux rapportés dans la population générale.

2.2.3 Evolution des enfants

Le suivi à moyen et long terme des enfants, s'il représente un élément très important dans l'évaluation de l'innocuité de l'ICSI est difficile à mettre en place et représente une somme de travail considérable. Une équipe australienne a effectué une étude prospective sur le développement à 1 an de 89 enfants conçus par ICSI, 84 enfants conçus par FIV et 80 enfants conçus naturellement (Bowen *et al.*, 1998). S'il n'ont pas trouvé de différence dans le développement et la santé physique, par contre un retard modéré dans les tests psychométriques a été noté chez 15 enfants ICSI, versus 2 et 1 respectivement pour la FIV et la conception naturelle. Par contre, l'équipe de Bruxelles n'a trouvé aucune différence sur le suivi de 201 enfants ICSI à deux ans par rapport à la population générale (Bonduelle *et al.*, 1998).

2.2.4 Risques d'infertilité masculine

La mise en évidence de micro-délétions de l'Y dans certaines azoospermies ou oligospermies sévères a soulevé la question de la fertilité des enfants males conçus par ICSI. Ce problème n'est pas directement lié à la technique d'ICSI mais à l'origine de l'infertilité. Depuis la mise en évidence de micro-délétions chez des sujets fertiles, leur rôle exact dans l'infertilité est mal connu. L'origine génétique de certaines infertilités masculines, mais également féminines, reste toutefois une réalité. Les données épidémiologiques semblent montrer qu'elle est relativement faible (Multigner et Spira, 1997).

2.2.5 Conclusion

Treize ans après la naissance du premier enfant conçu par ICSI, les résultats obtenus sont globalement rassurants quant à l'innocuité de l'ICSI, mais la vigilance doit être de mise quant au devenir à long terme et à certaines indications particulières (spermatozoïdes testiculaires, spermatides...).

2.3. La congélation embryonnaire

La première grossesse obtenue à partir d'embryons congelés date de 1983. Depuis de nombreuses grossesses ont été rapportées dans les mêmes conditions. La congélation embryonnaire présente deux grands avantages, d'une part la réduction du nombre d'embryons frais ré-implantés donc la réduction du taux de grossesse multiple avec possibilité d'un transfert secondaire des embryons surnuméraires congelés. D'autre part elle permet de différer un transfert embryonnaire lorsqu'il expose la femme à des complications graves (hyperstimulation sévère) ou lorsque des tests virologiques sont à contrôler comme c'est le cas dans le don d'ovocytes en France. Le processus de congélation-décongélation des embryons peut causer des dégâts cellulaires à l'origine d'une altération voir d'un arrêt de développement embryonnaire. Par contre il n'a jamais été rapporté d'anomalies cliniques sur les enfants issus d'embryons congelés et qui pourraient être rattachées à la congélation. FIVNAT a publié

le devenir de 1200 enfants nés en France après transfert d'embryons congelés entre 1985 et 1993 (102 812 embryons congelés au départ). Cette étude ne retrouve aucune différence significative entre les caractéristiques des grossesses, le taux de malformation, le poids de naissance, la mortalité périnatale, le développement psychomoteur et la croissance entre les enfants issus d'embryons congelés et ceux issus d'embryons frais.

3. EVOLUTION DES GROSSESSES OBTENUES PAR AMP INDEPENDAMMENT DE L'INDUCTEUR ET DE LA TECHNIQUE.

Comme toute autre grossesse, la grossesse issue d'une AMP peut évoluer vers un avortement spontané précoce, une grossesse extra-utérine ou une complication obstétricale.

3.1. Avortements précoces.

C'est la complication la plus fréquente touchant 17 à 20 % des grossesses par AMP, taux qui est légèrement plus élevé que dans la population générale où il atteint 12 à 15. Cela tient en réalité aux caractéristiques de la population traitée : l'âge moyen des grossesses après FIV classique est de 34 ans contre 27 ans dans la population générale, or le taux d'avortements spontanés augmente avec l'âge (il est de 35 % après 40 ans) ; la proportion des femmes atteintes d'endométriose est plus élevée en FIV que dans la population générale, or c'est aussi un facteur d'avortement. Autrement dit, à âge égal et à pathologie identique, le taux d'avortements est le même en FIV/ ICSI et en reproduction spontanée.

Aucun facteur masculin ne semble intervenir.

Les étiologies de ces avortements précoces sont multiples :

- . Qualité des embryons : en fécondité naturelle les études cytogénétiques montrent que la grande majorité des avortements précoces (66 %) est due à des anomalies chromosomiques. Près de 30% des embryons produits par FIV auraient un caryotype anormal. La principale cause de ces anomalies chromosomiques est l'âge maternel (seul facteur clairement établi). Les congélations, décongélations des embryons ne semblent pas intervenir. Le risque d'anomalie chromosomique après congélation n'est pas supérieur à celui rapporté dans les techniques d'AMP sans congélation.

- . Qualité de l'utérus et de l'endomètre : elle dépend de l'âge de la femme. Au-delà de 40 ans on observe une diminution des taux de nidation et d'implantation. Le taux de fausse-couche après 40 ans avoisine les 50 %, il est identique que la grossesse soit spontanée ou induite par une technique d'AMP. L'insuffisance lutéale a été incriminée par certains comme étant à l'origine d'un défaut de maturité endométriale expliquant la mauvaise implantation. L'insuffisance lutéale n'est que le reflet d'un trouble de la folliculogénèse.

3.2. Grossesse extra utérines

La première grossesse obtenue par fécondation in vitro en 1976 était une grossesse extra utérine (GEU). Le taux de GEU est de l'ordre de 4 % en FIV/ICSI contre 1 % dans la population générale. Cela tient en réalité aux caractéristiques de la population traitée. En effet, les GEU (grossesses extra-

utérines) ne surviennent pratiquement que lorsqu'il y a une pathologie tubaire, or 50 % des couples traités en FIV classique et un certain nombre traités en ICSI présentent cette pathologie, contre moins de 5% dans la population générale.

3.3. Complications obstétricales

La plupart des complications obstétricales sont liées au caractère multiple des grossesses issues d'AMP. Ces grossesses multiples sont responsables pour une grande part, et par le biais de la prématurité qu'elles occasionnent, de la mortalité périnatale.

Les grossesses ICSI aboutissent plus souvent à un accouchement que les grossesses FIV d'une part parce que le taux d'avortement spontané est inférieur, reflet de l'âge des mères, d'autre part, le taux de grossesses extra utérines est inférieur, reflet des indications tubaires en FIV. En revanche les taux de grossesses multiples sont très proches en FIV et en ICSI, reflet d'une politique de transfert identique dans les deux techniques.

3.3.1 Prématurité et retard de croissance intra-utérin

Le taux de prématurité apparaît plus important dans les grossesses issues d'AMP que dans les grossesses spontanées, ceci même pour les grossesses mono fœtales (9% en FIV versus 5,4% en spontané). Cette prématurité peut être plus ou moins importante engendrant un risque de mortalité et de morbidité néonatale plus ou moins grand (dans le service, sur une étude publiée en 1997, 15% des triplés présentent des lésions neurologiques graves). Pourtant les grossesses issues d'AMP sont médicalement très suivies. En fait si l'on compare le taux de prématurité par tranches d'âge maternel entre des grossesses AMP et des grossesses spontanées, il n'y a aucune différence significative. Le taux global est élevé car il intègre un nombre important de patientes de plus de 30 ans.

Aucune différence significative n'est observée dans le déroulement des grossesses issues de FIV ou d'ICSI . Par contre il existe un lien très fort entre la prématurité et le nombre d'enfants : une naissance avant 32SA survient chez 5 à 8% des grossesses gémellaires et chez 20% des triples. De la même manière aucune différence de poids de naissance de l'enfant n'est observée entre FIV et ICSI mais, de la même manière, on observe une augmentation des petits poids lorsque le nombre de fœtus augmente : l'hypotrophie définie comme un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile touche 14% des singletons, 45% des jumeaux, 70% des triplés.

Outre les conséquences fœtales les grossesses multiples s'accompagnent d'une morbidité maternelle élevée liée à l'augmentation des syndromes vasculo-rénaux (dysgravidie) et du taux de césarienne (91% de césariennes sur les grossesses triples).

3.3.2 Mortalité périnatale

La mortalité périnatale englobe les morts in utéro (décès du fœtus après le 7ème mois), les décès lors de l'accouchement, et ceux des trois premières semaines après la naissance. Ce taux est de 2,4 % en FIV/ICSI, et il est à peu près le même dans la population générale.

4. CONCLUSION

Le pronostic des grossesses et donc le devenir des enfants issus d'AMP n'est pas très différent de celui des grossesses spontanées. Les complications obstétricales rencontrées dans ces grossesses sont beaucoup plus dues aux caractéristiques des mères et de la grossesse qu'à la technique d'AMP elle-même. Une grossesse AMP relève donc d'une surveillance obstétricale identique à celle d'une grossesse spontanée du même rang chez une femme du même âge.

5. RÉFÉRENCES

- PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P. et VAN STEIRTEGHEM A.C., "Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte". *Lancet*, 1992: 340, 17-18.
- BARRATT C., DE JONGE C., MORTIMER D. et PARINAUD J., *Genetics of human male fertility*. EDK, Sevres (France), 1997.
- BONDUELLE M., CAMUS M., DE VOS A., STAESSEN C., TOURNAYE H., VAN ASSCHE E., VERHEYEN G., DEVROEY P., LIEBAERS I. et VAN STEIRTEGHEM A., "Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children". *Hum. Reprod.*, 1999: 14 Suppl 1, 243-264.
- PARINAUD J., "Pratique de l'ICSI en France: données de l'enquête BLEFCO". *Contracept. Fertil. Sex.*, 1997: 25, 602-606.
- ESHRE TASK FORCE ON INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION, "Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until 31 December 1993". *Hum. Reprod.*, 1998: 13, 1737-1746.
- LOFT A., PETERSEN K., ERB K., MIKKELSEN A.L., GRINSTED J., HALD F., HINDKJAER J., NIELSEN K.M., LUNDSTROM P., GABRIELSEN A., LENZ S., HORNNES P., ZIEBZ S., EJDUP H.B., LINDHARD A., ZHOU Y. et NYBOE ANDERSEN A., "A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997". *Hum. Reprod.*, 1999: 14, 2143-2148.
- WENNERHOLM U.B., BERGH C., HAMBERGER L., LUNDIN K., NILSSON L., WIKLAND M. et KALLEN B., "Incidence of congenital malformations in children born after ICSI". *Hum. Reprod.*, 2000: 15, 944-948.
- INT'VELD P., BRANDEBURG H., VERHOEFF A., DHONT M. et LOS F., "Sex chromosomal abnormalities and intra-cytoplasmic sperm injection". *Lancet*, 1995: 346, 773.
- BOWEN J.R., GIBSON F.L., LESLIE G.I. et SAUNDERS D.M., "Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection". *Lancet*, 1998: 351, 1529-1534.
- BONDUELLE M., JORIS H., HOFMANS K., LIEBAERS I. et VAN STEIRTEGHEM A., "Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age [letter] [see comments]". *Lancet*, 1998: 351, 1553.
- MULTIGNER L. et SPIRA A., "Epidemiology of male reproduction", In *Genetics of human male fertility*, C. Barratt, C. De Jonge, D. Mortimer and J. Parinaud (ed), EDK, Sevres (France), 1997: 43-65.

LEGISLATION DE L'AMP

J.O. Numéro 175 du 30 Juillet 1994 page 11059
LOIS

1. LOI NO 94-654 DU 29 JUILLET 1994 RELATIVE AU DON ET A L'UTILISATION DES ELEMENTS ET PRODUITS DU CORPS HUMAIN, A L'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION ET AU DIAGNOSTIC PRENATAL (1)

NOR : SPSX9400032L

L'Assemblée nationale et le Sénat ont adopté, Vu la décision du Conseil constitutionnel no 94-343/344 DC en date du 27 juillet 1994, Le Président de la République promulgue la loi dont la teneur suit:

Art. 8. - Il est inséré, après le chapitre II du titre Ier du livre II du code de la santé publique, un chapitre II bis ainsi rédigé: << Chapitre II bis << Assistance médicale à la procréation << Art. L. 152-1. - L'assistance médicale à la procréation s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception in vitro, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle, ainsi que de toute technique d'effet équivalent permettant la procréation en dehors du processus naturel. << Art. L. 152-2. - L'assistance médicale à la procréation est destinée à répondre à la demande parentale d'un couple. << Elle a pour objet de remédier à l'infertilité dont le caractère pathologique a été médicalement diagnostiqué. Elle peut aussi avoir pour objet d'éviter la transmission à l'enfant d'une maladie d'une particulière gravité. << L'homme et la femme formant le couple doivent être vivants, en âge de procréer, mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans et consentants préalablement au transfert des embryons ou à l'insémination. << Art. L. 152-3. - Un embryon ne peut être conçu in vitro que dans le cadre et selon les finalités d'une assistance médicale à la procréation telle que définie à l'article L. 152-2. Il ne peut être conçu avec des gamètes ne provenant pas d'un au moins des deux membres du couple. << Compte tenu de l'état des techniques médicales, les deux membres du couple peuvent décider par écrit que sera tentée la fécondation d'un nombre d'ovocytes pouvant rendre nécessaire la conservation d'embryons, dans l'intention de réaliser leur demande parentale dans un délai de cinq ans. << Les deux membres du couple sont consultés chaque année pendant cinq ans sur le point de savoir s'ils maintiennent leur demande parentale. << Un décret en Conseil d'Etat détermine les obligations auxquelles sont tenus les établissements et les laboratoires au regard de leur conservation pendant la durée d'application de la loi no 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal, notamment lorsqu'ils cessent leur activité. << Art. L. 152-4. - A titre exceptionnel, les deux membres du couple peuvent consentir par écrit à ce que les embryons conservés soient accueillis par un autre couple dans les conditions prévues à l'article L. 152-5. << En cas de décès d'un membre du couple, le membre survivant est consulté par écrit sur le point de savoir s'il consent à ce que les embryons conservés soient accueillis par un autre couple dans les conditions prévues à l'article L. 152-5. << Art. L. 152-5. - A titre exceptionnel, un couple répondant aux conditions prévues à l'article L. 152-2 et pour lequel une assistance médicale à la procréation sans recours à un tiers donneur ne peut aboutir peut accueillir un embryon. << L'accueil de l'embryon est subordonné à une décision de l'autorité judiciaire, qui reçoit préalablement le consentement écrit du couple à l'origine de sa conception. Le juge s'assure que le couple demandeur remplit les conditions prévues à l'article L. 152-2 et fait procéder à toutes investigations permettant d'apprécier les conditions d'accueil que ce couple est susceptible d'offrir à l'enfant à naître sur les plans familial, éducatif et psychologique. << Le couple accueillant l'embryon et celui y ayant renoncé ne peuvent connaître leurs identités respectives. << Toutefois, en cas de nécessité thérapeutique, un médecin pourra accéder aux informations médicales non identifiantes concernant le couple ayant renoncé à l'embryon. << Aucun paiement, quelle qu'en soit la forme, ne peut être alloué au couple ayant renoncé à l'embryon. << L'accueil de l'embryon est subordonné à des règles de sécurité sanitaire. Ces règles comprennent notamment des tests de dépistage des maladies infectieuses. << Les modalités d'application du présent article sont déterminées par décret en Conseil d'Etat. << Art. L. 152-6. - L'assistance médicale à la procréation avec tiers donneur ne peut être pratiquée que comme ultime indication lorsque la procréation médicalement assistée à l'intérieur du couple ne peut aboutir. << Art. L. 152-7. - Un embryon humain ne peut être conçu ni utilisé à des fins commerciales ou industrielles. << Art. L. 152-8. - La conception in vitro d'embryons humains à des fins d'étude, de recherche ou d'expérimentation est interdite. << Toute expérimentation sur l'embryon est interdite. << A titre exceptionnel, l'homme et la femme formant le couple peuvent accepter que soient menées des études sur leurs embryons. << Leur décision est exprimée par écrit. << Ces études doivent avoir une finalité médicale et ne peuvent porter atteinte à l'embryon. << Elles ne peuvent être entreprises qu'après avis conforme de la commission mentionnée à l'article L. 184-3 ci-dessous dans des conditions définies par décret en Conseil d'Etat. << La commission rend publique chaque année la liste des établissements où s'effectuent ces études, ainsi que leur objet. << Art. L. 152-9. - Les actes cliniques et biologiques d'assistance médicale à la

procréation, définis par décret en Conseil d'Etat, sont effectués sous la responsabilité d'un praticien nommément agréé à cet effet dans chaque établissement ou laboratoire autorisé à les pratiquer. << Art. L. 152-10. - La mise en oeuvre de l'assistance médicale à la procréation doit être précédée d'entretiens particuliers des demandeurs avec les membres de l'équipe médicale pluridisciplinaire du centre, qui peut faire appel, en tant que de besoin, au service social institué au titre VI du code de la famille et de l'aide sociale. << Ils doivent notamment: << 1o Vérifier la motivation de l'homme et de la femme formant le couple et leur rappeler les possibilités ouvertes par la loi en matière d'adoption;<< 2o Informer ceux-ci des possibilités de réussite et d'échec des techniques d'assistance médicale à la procréation, ainsi que de leur pénibilité;<< 3o Leur remettre un dossier-guide comportant notamment:<< a) Le rappel des dispositions législatives et réglementaires relatives à l'assistance médicale à la procréation;<< b) Un descriptif de ces techniques;<< c) Le rappel des dispositions législatives et réglementaires relatives à l'adoption, ainsi que l'adresse des associations et organismes susceptibles de compléter leur information à ce sujet.<< La demande ne peut être confirmée qu'à l'expiration d'un délai de réflexion d'un mois à l'issue du dernier entretien.<< La confirmation de la demande est faite par écrit.<< La mise en oeuvre de l'assistance médicale à la procréation est subordonnée à des règles de sécurité sanitaire définies par décret en Conseil d'Etat.<< L'assistance médicale à la procréation ne peut être mise en oeuvre par le médecin lorsque les demandeurs ne remplissent pas les conditions prévues par le présent chapitre ou lorsque le médecin, après concertation au sein de l'équipe pluridisciplinaire, estime qu'un délai de réflexion supplémentaire est nécessaire aux demandeurs dans l'intérêt de l'enfant à naître.<< Les époux ou les concubins qui, pour procréer, recourent à une assistance médicale nécessitant l'intervention d'un tiers donneur doivent préalablement donner, dans les conditions prévues par le code civil, leur consentement au juge ou au notaire. >>

Art. 9. - Les embryons existant à la date de promulgation de la présente loi et dont il a été vérifié qu'ils ne font plus l'objet d'une demande parentale, qu'ils ne font pas l'objet d'une opposition à un accueil par un couple tiers et qu'ils satisfont aux règles de sécurité sanitaire en vigueur au jour de leur transfert pourront être confiés à un couple remplissant les conditions prévues à l'article L. 152-5. Si leur accueil est impossible et si la durée de leur conservation est au moins égale à cinq ans, il est mis fin à cette conservation.

Art. 10. - Il est inséré, après la section 4 du chapitre II du titre III du livre VI du code de la santé publique, une section 5 ainsi rédigée:<< Section 5 << Dispositions spécifiques au don et à l'utilisation de gamètes << Art. L. 673-1. - Le don de gamètes consiste en l'apport par un tiers de spermatozoïdes ou d'ovocytes en vue d'une assistance médicale à la procréation.<< Art. L. 673-2. - Le donneur doit faire partie d'un couple ayant procréé. Le consentement du donneur et celui de l'autre membre du couple sont recueillis par écrit. Il en est de même du consentement des deux membres du couple receveur, qui peut être révoqué, avant toute intervention, par l'un ou l'autre des membres du couple.<< Art. L. 673-3. - Toute insémination artificielle par sperme frais provenant d'un don et tout mélange de sperme sont interdits.<< Art. L. 673-4. - Le recours aux gamètes d'un même donneur ne peut délibérément conduire à la naissance de plus de cinq enfants.<< Art. L. 673-5. - Les activités de recueil, traitement, conservation et cession de gamètes ne peuvent être pratiquées que dans les organismes et établissements de santé publics et privés à but non lucratif autorisés à cet effet par l'autorité administrative, suivant les modalités prévues par les dispositions des sections 1 et 2 du chapitre II du titre Ier du livre VII. Aucune rémunération à l'acte ne peut être perçue par les praticiens au titre de ces activités.<< Pour être autorisés à exercer ces activités, les organismes et établissements visés au premier alinéa doivent remplir les conditions déterminées en application des dispositions susmentionnées du livre VII et des conditions définies par décret en Conseil d'Etat propres à garantir un fonctionnement conforme aux principes généraux prévus par le titre Ier du présent livre. Ce décret détermine également les obligations auxquelles sont tenus ces organismes et établissements au regard de la conservation des gamètes, notamment lorsqu'ils cessent leurs activités.<< L'autorisation porte sur une ou plusieurs activités. Elle est délivrée pour une durée de cinq ans. Elle est accordée après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal instituée à l'article L. 184-3 et du Comité national de l'organisation sanitaire et sociale.<< Tout organisme ou établissement autorisé à exercer ces activités est tenu de présenter au ministre chargé de la santé le rapport annuel d'activité prévu à l'article L. 184-2.<< Art. L. 673-6. - Les organismes et établissements autorisés dans les conditions prévues à l'article L. 673-5 fournissent aux autorités sanitaires les informations utiles relatives aux donneurs. Un médecin peut accéder aux informations médicales non identifiantes en cas de nécessité thérapeutique concernant un enfant conçu par une assistance médicale à la procréation avec tiers donneur.<< Art. L. 673-7. - Le bénéfice d'un don de gamètes ne peut en aucune manière être subordonné à la désignation par le couple receveur d'une personne ayant volontairement accepté de procéder à un tel don en faveur d'un couple tiers anonyme. >>

Art. 11. - Il est inséré, après la section 3 du chapitre V du titre Ier du livre II du code de la santé publique, une section 4 ainsi rédigée:<< Section 4 << Activités d'assistance médicale à la procréation << Art. L. 184-1. - Les activités cliniques d'assistance médicale à la procréation, à l'exception de l'insémination artificielle, ne peuvent être pratiquées que dans des établissements de santé.<< Les activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ne peuvent être pratiquées que dans des établissements publics de santé et des laboratoires d'analyses de biologie médicale.<< A l'exception de l'insémination artificielle, les activités, tant cliniques que biologiques, d'assistance médicale à la procréation doivent être autorisées suivant les modalités prévues par les dispositions des sections 1 et 2 du chapitre II du titre Ier du livre VII. Cette autorisation vaut dérogation, au sens des dispositions du sixième alinéa de l'article L. 761, pour les laboratoires d'analyses médicales.<< Pour être autorisés

à exercer ces activités, les établissements et les laboratoires mentionnés aux premier et deuxième alinéas du présent article doivent remplir les conditions déterminées en application des dispositions susmentionnées du livre VII et des conditions de fonctionnement définies par décret en Conseil d'Etat. Ce décret détermine également les obligations auxquelles sont tenus les établissements et les laboratoires au regard de la conservation des gamètes, notamment lorsqu'ils cessent leurs activités.<< L'autorisation porte sur une ou plusieurs des activités d'assistance médicale à la procréation, avec ou sans tiers donneur. Elle est délivrée pour une durée de cinq ans. Elle est accordée après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal instituée par l'article L. 184-3 et du Comité national de l'organisation sanitaire et sociale.<< Art. L. 184-2. - Tout établissement ou laboratoire autorisé à pratiquer des activités d'assistance médicale à la procréation ou de diagnostic prénatal, tout centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal est tenu de présenter au ministre chargé de la santé un rapport annuel d'activité suivant des modalités déterminées par arrêté de ce ministre.<< Il est également tenu d'établir et de conserver dans des conditions fixées par décret en Conseil d'Etat des registres relatifs aux gamètes et aux embryons qu'il conserve.<< Art. L. 184-3. - La Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal est chargée de donner un avis sur les demandes d'autorisation d'exercice des activités d'assistance médicale à la procréation et de diagnostic prénatal, sur les demandes d'agrément des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal ainsi que sur les décisions de retrait d'autorisation. Elle participe au suivi et à l'évaluation du fonctionnement des établissements et laboratoires autorisés.

<< Elle remet chaque année au ministre chargé de la santé un rapport portant sur l'évolution de la médecine et de la biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.<< La Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal comprend des praticiens désignés sur proposition de leurs organisations représentatives, des personnalités choisies en raison de leur compétence dans les domaines de la procréation, de l'obstétrique, du diagnostic prénatal, du conseil génétique et du droit de la filiation et des représentants des administrations intéressées et des ordres professionnels ainsi qu'un représentant des associations familiales.

<< La commission est présidée par un membre de la Cour de cassation, du Conseil d'Etat ou de la Cour des comptes désigné par décret.<< Un décret en Conseil d'Etat fixe la composition de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et détermine les modalités de son organisation et de son fonctionnement.<< Art. L. 184-4. - Le ministre chargé de la santé communique à la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal le rapport mentionné à l'article L. 184-2 et tous documents utiles pour les besoins de sa mission.<< Art. L. 184-5. - Les membres de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et les personnes appelées à collaborer à ses travaux sont tenus, dans les conditions et sous les peines prévues à l'article 226-13 du code pénal, de garder secrètes les informations dont ils peuvent avoir connaissance en raison de leurs fonctions. >>

Art. 12. - Il est inséré, au début du chapitre IV du titre Ier du livre II du code de la santé publique, un article L. 162-16 ainsi rédigé:<< Art. L. 162-16. - Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales ayant pour but de détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité. Il doit être précédé d'une consultation médicale de conseil génétique.<< Les analyses de cytogénétique et de biologie en vue d'établir un diagnostic prénatal ne peuvent être pratiquées, dans des conditions prévues par décret en Conseil d'Etat, que dans des établissements publics de santé et des laboratoires d'analyses de biologie médicale autorisés selon les modalités prévues par les dispositions des sections 1 et 2 du chapitre II du titre Ier du livre VII.<< Les autorisations prévues par le présent article sont délivrées pour une durée de cinq ans et sont accordées après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal instituée par l'article L. 184-3 et du Comité national de l'organisation sanitaire et sociale. Pour les laboratoires d'analyses de biologie médicale, cette autorisation vaut inscription sur la liste prévue à l'article L. 759.<< Des centres de diagnostic prénatal pluridisciplinaires sont créés dans des organismes et établissements de santé publics et privés à but non lucratif. Leurs missions, leur rôle auprès des autres intervenants en matière de diagnostic prénatal et les conditions de leur création et de leur agrément sont définis par décret en Conseil d'Etat. >>

Art. 13. - Le deuxième alinéa de l'article L. 162-12 du code de la santé publique est complété par une phrase ainsi rédigée:

<< En outre, si l'interruption de grossesse est envisagée au motif qu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic, l'un de ces deux médecins doit exercer son activité dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire. >>

Art. 14. - Il est inséré, après l'article L. 162-16 du code de la santé publique, un article L. 162-17 ainsi rédigé:<< Art. L. 162-17. - Le diagnostic biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro n'est autorisé qu'à titre exceptionnel dans les conditions suivantes:<< Un médecin exerçant son activité dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire tel que défini par l'article L. 162-16 doit attester que le couple, du fait de sa situation familiale, a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic.<< Le diagnostic ne peut être effectué que lorsque a été préalablement et précisément identifiée, chez l'un des parents, l'anomalie ou les anomalies responsables d'une telle maladie.<< Les deux membres du couple expriment par écrit leur consentement à la réalisation du diagnostic.<< Le diagnostic ne peut avoir d'autre objet que de rechercher cette

affection ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter.<< Il ne peut être réalisé que dans un établissement spécifiquement autorisé à cet effet après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et dans des conditions définies par décret en Conseil d'Etat. >>

Art. 15. - Il est inséré, après le chapitre II du titre III du livre VI du code de la santé publique, un chapitre III ainsi rédigé:

<< Chapitre III << Sanctions pénales et administratives relatives à l'utilisation des éléments et produits du corps humain << Art. L. 674-1. - Toute violation constatée dans un établissement ou un organisme, et du fait de celui-ci, des prescriptions législatives et réglementaires relatives aux prélèvements et aux transplantations d'organes, aux prélèvements, à la conservation et à l'utilisation de tissus ou aux greffes de tissus ou de cellules du corps humain entraîne le retrait temporaire ou définitif des autorisations prévues aux articles L. 671-12, L. 671-16, L. 672-7, L. 672-10, L. 672-13 et L. 673-5.<< Le retrait de l'autorisation est également encouru en cas de violation des prescriptions fixées par l'autorisation.<< Le retrait ne peut intervenir qu'après un délai d'un mois suivant une mise en demeure adressée par l'autorité administrative à l'établissement ou l'organisme concerné et précisant les griefs. En cas d'urgence tenant à la sécurité des personnes faisant l'objet des activités en cause, une suspension provisoire peut être prononcée à titre conservatoire.<< La décision de retrait est publiée au Journal officiel de la République française.<< En cas de retrait de l'autorisation prévue à l'article L. 673-5, la décision est prise après avis motivé de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.<< Art. L. 674-2. - Comme il est dit à l'article 511-2 du code pénal, le fait d'obtenir d'une personne l'un de ses organes contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait d'apporter son entremise pour favoriser l'obtention d'un organe contre le paiement de celui-ci, ou de céder à titre onéreux un tel organe du corps d'autrui.<< Les mêmes peines sont applicables dans le cas où l'organe obtenu dans les conditions prévues au premier alinéa provient d'un pays étranger.<< Art. L. 674-3. - Comme il est dit à l'article 511-3 du code pénal, le fait de prélever un organe sur une personne vivante majeure sans que le consentement de celle-ci ait été recueilli dans les conditions prévues à l'article L. 671-3 du présent code est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait de prélever un organe sur un donneur vivant mineur ou sur un donneur vivant majeur faisant l'objet d'une mesure de protection légale sans avoir respecté les conditions prévues aux articles L. 671-4 et L. 671-5 du présent code.<< Art. L. 674-4. - Comme il est dit à l'article 511-4 du code pénal, le fait d'obtenir d'une personne le prélèvement de tissus, de cellules ou de produits de son corps contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait d'apporter son entremise pour favoriser l'obtention de tissus, de cellules ou de produits humains contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, ou de céder à titre onéreux des tissus, des cellules ou des produits du corps d'autrui.

<< Art. L. 674-5. - Comme il est dit à l'article 511-5 du code pénal, le fait de prélever un tissu ou des cellules ou de collecter un produit sur une personne vivante majeure sans qu'elle ait exprimé son consentement est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait de prélever un tissu ou des cellules ou de collecter un produit sur une personne vivante mineure ou sur une personne vivante majeure faisant l'objet d'une mesure de protection légale sans avoir respecté les conditions prévues par l'article L. 672-5 du présent code.<< Art. L. 674-6. - Le fait de procéder à des prélèvements d'organes ou des transplantations d'organes, à des prélèvements ou des greffes de tissus, à la conservation ou à la transformation de tissus ou à la greffe de cellules dans un établissement n'ayant pas obtenu l'autorisation prévue par les articles L. 671-12, L. 671-16, L. 672-7, L. 672-10 et L. 672-13 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.< Art. L. 674-7. - Le fait de procéder à la distribution ou à la cession d'organes, de tissus, de cellules et produits humains en vue d'un don sans qu'aient été respectées les règles de sécurité sanitaire exigées en application des dispositions de l'article L. 665-15 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende. >>

Art. 16. - Les nouveaux articles L. 675-1 à L. 675-8 du code de la santé publique sont, dans la numérotation qui résulte de la présente loi, insérés dans le chapitre III du titre III du livre VI dudit code.

Art. 17. - Il est inséré, dans le chapitre III du titre III du livre VI du code de la santé publique, les articles L. 675-9 à L. 675-18 ainsi rédigés:<< Art. L. 675-9. - Comme il est dit à l'article 511-6 du code pénal, le fait de recueillir ou de prélever des gamètes sur une personne vivante sans son consentement écrit est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500 000 F d'amende.<< Art. L. 675-10. - Comme il est dit à l'article 511-9 du code pénal, le fait d'obtenir des gamètes contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, à l'exception du paiement des prestations assurées par les établissements effectuant la préparation et la conservation de ces gamètes, est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait d'apporter son entremise pour favoriser l'obtention de gamètes contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, ou de remettre à des tiers, à titre onéreux, des gamètes provenant de dons.<< Art. L. 675-11. - Le fait de divulguer une information permettant à la fois d'identifier une personne ou un couple qui a fait don de gamètes et le couple qui les a reçus est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 675-12. - Le fait de recueillir ou de prélever des gamètes sur une personne vivante en vue d'une assistance médicale à la procréation sans procéder aux tests de dépistage des maladies transmissibles exigés en application de l'article L. 665-15 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.< Art. L. 675-13. - Le fait de procéder à une insémination artificielle par sperme frais ou mélange de sperme provenant de dons en violation de l'article L. 673-3 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 675-14. - Le fait de subordonner le bénéfice

d'un don de gamètes à la désignation par le couple receveur d'une personne ayant volontairement accepté de procéder à un tel don en faveur d'un couple tiers en violation de l'article L. 673-7 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 675-15. - Les personnes physiques coupables des infractions prévues au présent chapitre encourent également la peine complémentaire d'interdiction, pour une durée de dix ans au plus, d'exercer l'activité professionnelle ou sociale dans l'exercice de laquelle ou à l'occasion de laquelle l'infraction a été commise.<< Art. L. 675-16. - Le fait de procéder à des activités de recueil, de traitement, de conservation et de cession de gamètes provenant de dons sans avoir recueilli l'autorisation prévue à l'article L. 673-5 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 675-17. - Comme il est dit à l'article 511-28 du code pénal, les personnes morales peuvent être déclarées responsables pénalement, dans les conditions prévues par l'article 121-2 dudit code, des infractions définies au présent chapitre. Les peines encourues par les personnes morales sont:<< 1o L'amende, suivant les modalités prévues par l'article 131-38 du code pénal;<< 2o Les peines mentionnées à l'article 131-39 du code pénal.<< L'interdiction mentionnée au 2o de l'article 131-39 du code pénal porte sur l'activité dans l'exercice ou à l'occasion de l'exercice de laquelle l'infraction a été commise.<< Art. L. 675-18. - Comme il est dit à l'article 511-26 du code pénal, la tentative des délits prévus par les articles 511-2, 511-3, 511-4, 511-5, 511-6 et 511-9 dudit code auxquels renvoient les articles L. 674-2 à L. 674-5, L. 675-9 et L. 675-10 du présent code est punie des mêmes peines. >>

Art. 18. - I. - Il est inséré, dans la section 4 du chapitre V du titre Ier du livre II du code de la santé publique, les articles L. 184-6 et L. 184-7 ainsi rédigés:<< Art. L. 184-6. - Toute violation constatée dans un établissement ou un laboratoire, et du fait de celui-ci, des prescriptions législatives et réglementaires applicables à l'assistance médicale à la procréation ou au diagnostic prénatal entraîne le retrait temporaire ou définitif des autorisations prévues aux articles L. 184-1 et L. 162-16.<< Le retrait de l'autorisation est également encouru en cas de violation des prescriptions fixées par l'autorisation.<< Le retrait ne peut intervenir qu'après un délai d'un mois suivant une mise en demeure adressée par l'autorité administrative à l'établissement ou au laboratoire concerné et précisant les griefs. En cas de violation grave des dispositions de la loi no 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal, l'autorisation peut être suspendue sans délai à titre conservatoire.<< La décision de retrait est prise après avis motivé de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal. Elle est publiée au Journal officiel de la République française.<< Art. L. 184-7. - Le fait de procéder à des activités d'assistance médicale à la procréation sans avoir recueilli l'autorisation prévue à l'article L. 184-1 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende. >>II. - Sont insérés, au chapitre II bis du titre Ier du livre II du code de la santé publique, les articles L. 152-11 à L. 152-19 ainsi rédigés:<< Art. L. 152-11. - Le fait d'obtenir des embryons humains sans respecter les conditions prévues aux articles L. 152-4 et L. 152-5 est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Art. L. 152-12. - Comme il est dit à l'article 511-15 du code pénal, le fait d'obtenir des embryons humains contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait d'apporter son entremise pour favoriser l'obtention d'embryons humains contre un paiement, quelle qu'en soit la forme, ou de remettre à des tiers, à titre onéreux, des embryons humains.<< Art. L. 152-13. - Le fait de divulguer une information nominative permettant d'identifier à la fois le couple qui a renoncé à un embryon et le couple qui l'a accueilli est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 152-14. - Le fait de procéder à des activités d'assistance médicale à la procréation à des fins autres que celles définies à l'article L. 152-2 est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500 000 F d'amende.<< Art. L. 152-15. - Comme il est dit à l'article 511-17 du code pénal, le fait de procéder à la conception in vitro d'embryons humains à des fins industrielles ou commerciales est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait d'utiliser des embryons humains à des fins industrielles ou commerciales.<< Art. L. 152-16. - Le fait de procéder au transfert d'un embryon dans les conditions fixées à l'article L. 152-5 sans avoir pris connaissance des résultats des tests de dépistage de maladies infectieuses exigés en application de l'article précité est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 152-17. - Comme il est dit à l'article 511-19 du code pénal, le fait de procéder à une étude ou une expérimentation sur l'embryon en violation des dispositions de l'article L. 152-8 du présent code est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.

<< Art. L. 152-18. - Comme il est dit à l'article 511-18 du code pénal, le fait de procéder à la conception in vitro d'embryons humains à des fins de recherche ou d'expérimentation est puni de sept ans d'emprisonnement et de 700 000 F d'amende.<< Art. L. 152-19. - La tentative des délits prévus par les articles L. 152-11 et L. 152-17 est punie des mêmes peines. Comme il est dit à l'article 511-26 du code pénal, la tentative des délits prévus par l'article 511-15 dudit code auquel renvoie l'article L. 152-12 du présent code est punie des mêmes peines. >>III. - Il est inséré, dans le chapitre IV du titre Ier du livre II du code de la santé publique, les articles L. 162-18 à L. 162-22 ainsi rédigés:<< Art. L. 162-18. - Le fait de procéder au diagnostic prénatal sans avoir reçu l'autorisation mentionnée à l'article L. 162-16 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 162-19. - Le fait de procéder à une interruption de grossesse après diagnostic prénatal sans avoir respecté les modalités prévues par la loi est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 162-20. - Le fait de méconnaître les dispositions de l'article L. 162-17 relatif au diagnostic préimplantatoire est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.<< Art. L. 162-21. - Les personnes physiques coupables des infractions prévues à la section 4 du chapitre V, au chapitre II bis et au présent chapitre IV du présent titre encourent également la peine complémentaire d'interdiction, pour une durée de dix ans au plus, d'exercer l'activité professionnelle ou sociale dans l'exercice de laquelle ou à l'occasion de laquelle l'infraction a été commise.

<< Art. L.162-22. - Comme il est dit à l'article 511-28 du code pénal, les personnes morales peuvent être déclarées responsables pénalement, dans les conditions prévues par l'article 121-2 dudit code, des infractions définies à la section 4 du chapitre V et au chapitre II bis du présent titre. Les peines encourues par les personnes morales sont:<< 1o L'amende, suivant les modalités prévues par l'article 131-38 du code pénal;<< 2o Les peines mentionnées à l'article 131-39 du code pénal.<< L'interdiction mentionnée au 2o de l'article 131-39 du code pénal porte sur l'activité dans l'exercice ou à l'occasion de l'exercice de laquelle l'infraction a été commise. >>

Art. 19. - Les établissements, laboratoires ou organismes qui, en application des dispositions législatives et réglementaires antérieures à l'entrée en vigueur de la présente loi, ont été autorisés à pratiquer les activités de prélèvements d'organes, de transplantations d'organes, d'assistance médicale à la procréation et de diagnostic prénatal visées par les articles L. 671-12, L. 671-16, L. 184-1, L. 673-5 et L. 162-16 du code de la santé publique doivent déposer une demande d'autorisation dans un délai de six mois à compter de la publication du décret pris pour l'application de la présente loi et relatif à l'autorisation dont relèvent leurs activités. Ils peuvent poursuivre leurs activités jusqu'à l'intervention de la décision de l'autorité administrative sur leur demande. Les établissements, laboratoires ou organismes qui pratiquent les activités de prélèvements de tissus, de conservation ou de transformation de tissus en vue de leur cession, de greffes de tissus ou de cellules, que les articles L. 672-7, L. 672-10 et L. 672-13 du code de la santé publique soumettent à autorisation, doivent déposer une demande d'autorisation dans un délai de six mois à compter de la publication du décret pris pour l'application de la présente loi et relatif à l'autorisation dont relèvent leurs activités. Ils peuvent poursuivre ces activités jusqu'à l'intervention de la décision de l'autorité administrative sur leur demande.

Art. 20. - Sont abrogées les dispositions de:1o La loi no 49-890 du 7 juillet 1949 permettant la pratique de la greffe de la cornée grâce à l'aide de donateurs d'yeux volontaires;2o La loi no 76-1181 du 22 décembre 1976 relative aux prélèvements d'organes;3o L'article 13 de la loi no 91-1406 du 31 décembre 1991 portant diverses dispositions d'ordre social.

Art. 21. - La présente loi fera l'objet, après évaluation de son application par l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, d'un nouvel examen par le Parlement dans un délai maximum de cinq ans après son entrée en vigueur.

Art. 22. - Il est inséré, dans le livre Ier du code de la santé publique, un titre VI ainsi rédigé:<< TITRE VI << Médecine prédictive et identification génétique << Art. L.145-15. - L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou son identification par empreintes génétiques, lorsqu'elle n'est pas réalisée dans le cadre d'une procédure judiciaire, ne peut être entrepris qu'à des fins médicales ou de recherche scientifique et qu'après avoir recueilli son consentement.<< Lorsque cet examen ou cette identification est effectué à des fins médicales, le consentement est recueilli par écrit. Les examens ou identifications à des fins de recherche scientifique sont régis par les dispositions du livre II bis du présent code.<< A titre exceptionnel, lorsque cette étude est entreprise à des fins médicales, le consentement de la personne peut ne pas être recueilli, dans son intérêt et dans le respect de sa confiance. Sous les mêmes réserves, le consentement peut également ne pas être recueilli lorsque l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques est recherchée à des fins médicales.<< Art. L.145-16. - Sont seules habilitées à procéder à des identifications par empreintes génétiques à des fins médicales ou de recherche scientifique les personnes ayant fait l'objet d'un agrément dans des conditions fixées par décret en Conseil d'Etat.<< Art. L. 145-17. - Comme il est dit à l'article 226-25 du code pénal, le fait de procéder à l'étude des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales sans avoir préalablement recueilli son consentement dans les conditions prévues par l'article L. 145-15 est puni d'un an d'emprisonnement et de 100 000 F d'amende.<< Art. L. 145-18. - Comme il est dit à l'article 226-26 du code pénal, le fait de détourner de leurs finalités médicales ou de recherche scientifique les informations recueillies sur une personne au moyen de l'étude de ses caractéristiques génétiques est puni d'un an d'emprisonnement et de 100 000 F d'amende.<< Art. L. 145-19. - Comme il est dit à l'article 226-27 du code pénal, le fait de rechercher l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques à des fins médicales sans recueillir préalablement son consentement dans les conditions prévues par l'article L. 145-15 est puni d'un an d'emprisonnement et de 100 000 F d'amende.<< Art. L. 145-20. - Comme il est dit à l'article 226-28 du code pénal, le fait de rechercher l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques à des fins qui ne seraient ni médicales ni scientifiques ou en dehors d'une mesure d'enquête ou d'instruction diligentée lors d'une procédure judiciaire est puni d'un an d'emprisonnement et de 100 000 F d'amende.<< Est puni des mêmes peines le fait de divulguer des informations relatives à l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques ou de procéder à l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques sans être titulaire de l'agrément prévu à l'article L. 145-16 du présent code.<< Art. L. 145-21. - Comme il est dit à l'article 226-29 du code pénal, la tentative des infractions prévues aux articles 226-25, 226-26, 226-27 et 226-28 dudit code auxquels renvoient les articles L. 145-17, L. 145-18, L. 145-19 et L. 145-20 du présent code est punie des mêmes peines. >>

Art. 23. - Le comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé a pour mission de donner des avis sur les problèmes éthiques soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la

biologie, de la médecine et de la santé et de publier des recommandations sur ces sujets. Un décret en Conseil d'Etat précise la composition et les modalités de saisine, d'organisation et de fonctionnement du comité.

Art. 24. - Les dispositions du code de la santé publique qui citent en les reproduisant les articles d'autres codes sont de plein droit modifiées par l'effet des modifications ultérieures de ces articles. La présente loi sera exécutée comme loi de l'Etat.

Fait à Paris, le 29 juillet 1994.

FRANCOIS MITTERRAND Par le Président de la République: Le Premier ministre, EDOUARD BALLADUR
Le ministre d'Etat, ministre des affaires sociales,
de la santé et de la ville,
SIMONE VEIL Le ministre d'Etat, ministre de l'intérieur et de l'aménagement du territoire, CHARLES
PASQUA Le ministre d'Etat, garde des sceaux,
ministre de la justice,
PIERRE MEHAIGNERIE Le ministre d'Etat, ministre de la défense, FRANCOIS LEOTARD Le ministre de
l'économie,
EDMOND ALPHANDERY Le ministre du budget, porte-parole du Gouvernement, NICOLAS SARKOZY Le
ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche,
FRANCOIS FILLON Le ministre délégué à la santé, PHILIPPE DOUSTE-BLAZY

- (1) Loi no 94-654. - Travaux préparatoires: Assemblée nationale: Projet de loi no 2600; Rapport de M. Bioulac, au nom de la commission spéciale, no 2871; Discussion les 19, 20, 24 et 25 novembre 1992 et adoption le 25 novembre 1992. Sénat: Projet de loi, adopté par l'Assemblée nationale en première lecture, no 67 (1992-1993); Rapport de M. Jean Chérioux, au nom de la commission des affaires sociales, no 236 (1993-1994); Avis de la commission des affaires culturelles no 234 (1993-1994); Discussion les 13, 14, 17, 18, 19 janvier 1994 et adoption le 19 janvier 1994. Assemblée nationale: Projet de loi, modifié par le Sénat, no 957; Rapport de M. Jean-François Mattei, au nom de la commission spéciale, no 1057; Discussion les 14 et 15 avril 1994 et adoption le 20 avril 1994. Sénat: Projet de loi, adopté avec modifications par l'Assemblée nationale en deuxième lecture, no 354 (1993-1994); Rapport de M. Jean Chérioux, au nom de la commission des affaires sociales, no 395 (1993-1994); Discussion les 17 et 18 mai 1994 et adoption le 18 mai 1994. Assemblée nationale: Projet de loi, modifié par le Sénat en deuxième lecture, no 1264; Rapport de M. Jean-François Mattei, au nom de la commission mixte paritaire, no 1369; Discussion et adoption le 15 juin 1994. Sénat: Rapport, au nom de la commission mixte paritaire, no 497 (1993-1994); Discussion et adoption le 23 juin 1994. - Conseil constitutionnel: Décision no 94-343/344 DC du 27 juillet 1994 publiée au Journal officiel du 29 juillet 1994.

2. ARRETE DU 12 JANVIER 1999 RELATIF AUX REGLES DE BONNES PRATIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION

NOR : MESP9920284A

Le secrétaire d'Etat à la santé et à l'action sociale,
Vu le code de la santé publique, et notamment les articles L. 184-1, L. 673-5, R. 184-1-11 ;
Vu l'avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal,
Arrête :

Art. 1er. - Les règles de bonnes pratiques que doivent respecter les établissements de santé, les laboratoires d'analyses de biologie médicale et les organismes autorisés à pratiquer une ou plusieurs activités d'assistance médicale à la procréation définies à l'article R. 152-9-1 du code de la santé publique ou les activités de recueil, traitement, conservation et cession de gamètes issus de dons prévues à l'article L. 673-5 du code de la santé publique sont énoncées dans le guide de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation, figurant en annexe du présent arrêté.

Art. 2. - Le directeur général de la santé et le directeur des hôpitaux sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 12 janvier 1999.

Bernard Kouchner

A N N E X E
 GUIDE DE BONNES PRATIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES
 EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION
 Commission nationale de médecine et de biologie
 de la reproduction et du diagnostic prénatal

1. Dispositions communes à l'ensemble des pratiques d'AMP

1.1. Fonctionnement et organisation des centres

1.1.1. Organisation

Les actes cliniques ou biologiques d'AMP sont effectués sous la responsabilité d'un ou plusieurs praticiens nommément agréés pour une ou plusieurs des activités cliniques ou biologiques. Dans le cas où plusieurs praticiens sont agréés pour les activités cliniques, ils désignent parmi eux un coordinateur. Il en est de même pour les activités biologiques. Dans le cas où un seul praticien est agréé, il assure cette tâche. Le coordinateur :- veille au respect des dispositions législatives et réglementaires qui s'attachent à ces activités;

- établit le rapport d'activité prévu à l'article L. 184-2 du CSP ;- veille à l'animation de l'équipe ;- veille également à ce que le personnel qui participe à la mise en oeuvre de l'AMP dispose des compétences spécifiques nécessaires. Ces compétences doivent être régulièrement actualisées par des formations appropriées. L'ensemble des cliniciens et biologistes participant à l'activité d'AMP constituent une équipe pluridisciplinaire, tel qu'il est mentionné à l'article L. 152-10 du CSP, équipe à laquelle doivent s'adjoindre, en tant que de besoin, un psychiatre ou un psychologue, un généticien et un andrologue. Elle a pour rôle, outre les missions mentionnées à l'article L. 152-10 (vérification de la motivation et information des couples), de discuter préalablement à toute AMP, au cours de réunions régulières : son indication, les protocoles de stimulation, le choix de la technique d'AMP. Doivent aussi être discutés, si nécessaire, la poursuite, la modification ou l'arrêt du protocole d'AMP en cours.

De manière plus générale, le rôle de l'équipe pluridisciplinaire comprend également : l'organisation générale des activités, les orientations thérapeutiques et la discussion des problèmes éthiques. Un compte rendu de chaque réunion sera établi et conservé au moins 3 ans. Les décisions individuelles seront consignées dans le dossier médical des patients. Aucun patient ne peut être pris en charge en vue d'AMP dans les établissements autorisés sans cette évaluation préalable par l'équipe pluridisciplinaire. Ces dispositions s'appliquent à l'ensemble des actes d'AMP, y compris l'IAC. Dans le cadre de l'IAC, la concertation implique, au minimum, le biologiste agréé et le correspondant clinique.

1.1.2. Conditions techniques de fonctionnement

Locaux

a) Toute structure clinique autorisée à pratiquer les activités cliniques d'AMP doit comprendre au minimum (R. 184-1-5 du CSP) :- une pièce pour les entretiens avec les couples ;- un bloc opératoire ;- une salle de ponction située à proximité du bloc opératoire et équipée d'un matériel permettant la pratique d'une anesthésie générale et d'une réanimation en cas de besoin ;- une pièce destinée au transfert des embryons ;- une salle de réveil conforme au décret no 94-1050 du 5 décembre 1994 relatif aux conditions techniques de fonctionnement des établissements de santé en ce qui concerne la pratique de l'anesthésie ;- des lits d'hospitalisation. b) Tout laboratoire autorisé à pratiquer les activités biologiques d'AMP doit comprendre au minimum, en fonction des activités pour lesquelles il est autorisé (R. 184-1-9 du CSP) : Pour l'ensemble des activités biologiques d'AMP :- une pièce exclusivement affectée au recueil de sperme. Cette pièce doit être équipée d'un lavabo équipé d'un dispositif automatique permettant l'arrivée d'eau sans intervention manuelle, et de dispositifs permettant d'assurer l'hygiène du recueil, avec affichage des procédures. La pièce doit offrir toutes les garanties de confidentialité ;- une pièce exclusivement affectée au traitement des gamètes en vue d'AMP ; cette pièce ne peut en aucun cas être utilisée pour des analyses de biologie médicale, y compris pour la spermologie. Lorsque sont effectuées des activités de FIV, la pièce doit être équipée d'un sas. Pour les activités de conservation de gamètes et d'embryons : une pièce exclusivement affectée à cette activité ; cette pièce doit être équipée d'un dispositif d'extraction de vapeur d'azote. Elle doit être également équipée d'une protection contre le vol. En outre, il est recommandé de disposer d'une pièce pour les entretiens avec les couples et d'un bureau de secrétariat et d'archives. Les locaux doivent être de taille suffisante au regard de l'activité.

Matériel

a) Toute structure de gynécologie ou gynécologie-obstétrique autorisée à pratiquer le recueil par ponction d'ovocytes doit être équipée dans ses locaux, au minimum, du matériel suivant :- un échographe de haute définition avec sonde vaginale (R. 184-1-5 du CSP) ;- un matériel de ponction et recueil ovocyttaire à usage unique, la sonde étant protégée de manière efficace sur toute sa longueur afin d'assurer la sécurité sanitaire ;- un système permettant le maintien des prélèvements à 37 °C jusqu'à leur arrivée au laboratoire. b) Toute structure autorisée à pratiquer le recueil par ponction de spermatozoïdes doit être équipée, au minimum, du matériel suivant :- un matériel de ponction à usage unique ;- un système permettant le maintien des prélèvements entre 20 °C et 35 °C jusqu'à leur arrivée au laboratoire. c) Tout laboratoire autorisé à pratiquer les activités biologiques d'AMP doit être équipé, au minimum, du matériel suivant : Pour le traitement du sperme en vue d'insémination :- un matériel permettant des conditions d'asepsie rigoureuse (hotte à flux laminaire ou matériel équivalent) ;- une centrifugeuse ;- un microscope ;- une étuve ou un bain-marie à 37 °C. Pour la fécondation in vitro : Outre le matériel nécessaire pour le traitement du sperme en vue d'insémination :- un microscope inversé avec platine

chauffante ou enceinte thermostatée à 37 °C ; - un stéréomicroscope équipé de platine et plateau chauffant, thermostatés à 37 °C ; - une étuve à CO₂ ; - pour la FIV avec micromanipulation, un dispositif de micromanipulation adapté sur le microscope inversé. Pour la congélation et la conservation du sperme : - une cuve de stockage des paillettes de sperme dans l'azote liquide équipée de visotubes et canisters ou équivalent ; une réserve d'azote liquide avec dispositif de remplissage des cuves. En outre, il est souhaitable, en cas d'activité importante, que le laboratoire dispose d'appareils permettant le conditionnement automatique du sperme en paillettes et la congélation programmée du sperme dans les vapeurs d'azote. Pour la congélation et la conservation des embryons : - un appareil permettant la congélation programmée des embryons dans les vapeurs d'azote ; - une cuve de stockage des paillettes contenant les embryons ; cette cuve doit être exclusivement affectée à cet usage ; - une cuve d'azote de dépannage afin d'assurer la sécurité en cas d'incident technique.

Règles d'hygiène et de sécurité au laboratoire

- a) L'ensemble du petit matériel en contact avec les gamètes et les embryons doit être à usage unique. Lorsqu'il est fourni non stérile, il doit être stérilisé. Les modalités de la stérilisation doivent faire l'objet d'une procédure écrite et validée.
- b) Les milieux de culture et réactifs dont l'utilisation est décrite au chapitre 2.2.2, préparés ou reconstitués au laboratoire, doivent porter la date de leur préparation et celle de leur péremption. Les réactifs d'origine industrielle doivent comporter la date de leur réception au laboratoire et, le cas échéant, la date limite d'utilisation. Ils doivent être conservés dans des conditions appropriées, respectant les normes indiquées par les fabricants. La date de péremption des milieux et réactifs doit être vérifiée une fois par mois. La date de la dernière vérification doit être notée dans le cahier de préparation. Les réactifs périmés seront éliminés.
- c) Les appareils utilisés doivent être régulièrement et efficacement nettoyés, décontaminés, entretenus et contrôlés. L'ensemble de ces opérations ainsi que les visites d'entretien réalisées par le constructeur ou par un organisme de maintenance doivent être notés dans un document affecté à chaque appareil. Des procédures de secours doivent être prévues en cas de panne ou de dysfonctionnement, notamment l'accès à la cuve de dépannage, préalablement identifiée, pour la conservation des gamètes et des embryons. Le matériel doit être renouvelé régulièrement en fonction de son obsolescence et de son usure.
- d) Dans le cadre des précautions « universelles » à respecter pour les laboratoires travaillant sur des prélèvements humains, définies par le CDC d'Atlanta (MMWR no 2 spécial, 1987), le personnel du laboratoire doit suivre les règles suivantes : - port de gants pour toutes les manipulations de produits humains, à changer chaque fois que nécessaire et nécessairement entre deux patients ; - port de masque pendant les manipulations ; - lavage des mains et de la peau immédiatement en cas de projection ; - prévention des piqûres et coupures (collecteurs, interdiction de reboucher les aiguilles). Il est rappelé que la vaccination du personnel du laboratoire contre l'hépatite B est obligatoire.
- e) Les locaux doivent faire l'objet d'un nettoyage et d'une désinfection efficaces quotidiens afin d'éviter tout risque de contamination. Les procédures d'entretien doivent être décrites et notées sur un cahier spécifique. Les produits utilisés à cet effet doivent être non toxiques.

1.1.3. Documents. - Dossier médical

L'équipe clinique et l'équipe biologique doivent être chacune en possession des pièces exigées avant le recours à l'AMP. En outre, l'équipe clinique doit disposer d'un résumé du dossier biologique et l'équipe biologique d'un résumé du dossier clinique. Ces dossiers doivent être conservés pendant une durée minimale de trente ans.

Ce dossier comprend :

- les pièces exigées avant le recours à l'AMP ;
- les éléments cliniques et biologiques communs à toute AMP ;
- les éléments cliniques et biologiques spécifiques de chaque AMP ;
- le double d'un compte rendu de la tentative remis aux patients.

Les règles concernant le contenu et la conservation du dossier du donneur ou de la donneuse sont traitées en 3.2.3.

Les pièces exigées avant le recours à l'AMP (L. 152-2 du CSP) sont :

- un justificatif du mariage ou d'une durée de vie commune d'au moins deux ans ;
- le consentement écrit du couple préalable à la mise en oeuvre de l'AMP, et renouvelé avant chaque transfert d'embryons ou chaque insémination.

Les éléments cliniques et biologiques communs à toute AMP sont :

- l'indication de l'AMP, accompagnée des éléments qui ont permis de l'établir ;
- les résultats des tests relatifs à la sécurité sanitaire ;
- le détail de l'ensemble des traitements administrés et la réponse ovarienne à la stimulation ;
- les techniques détaillées d'AMP utilisées à chaque étape ;
- en cas de grossesse, une information sur l'évolution de celle-ci et sur l'état de santé du ou des nouveau-nés.

Les éléments cliniques et biologiques de l'IAC sont :

- la détermination du moment estimé de l'ovulation ;
- les paramètres du sperme utilisé pour l'insémination, et notamment le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés ;
- la date et l'heure du recueil de sperme, de sa préparation et de l'insémination.

Les éléments cliniques et biologiques de la FIV sont :

- la date de la ponction (et son compte rendu) et le nombre d'ovocytes recueillis et inséminés ;

- la qualité ovocytaire (éventuellement atrésie, zone pellucide endommagée) ;
- les techniques spécifiques éventuellement mises en oeuvre (micromanipulation, coculture, éclosion assistée, etc.) ;
- le nombre de spermatozoïdes utilisés pour l'insémination in vitro ;
- le nombre d'ovocytes fécondés le lendemain de l'insémination, incluant les éventuelles fécondations anormales ;
- le nombre et la morphologie des embryons obtenus et leur stade de développement, le surlendemain de l'insémination et au moment du transfert, si celui-ci est différé ;
- la date et le nombre d'embryons transférés ;
- le nombre d'embryons congelés ;
- le compte rendu de la tentative doit comprendre au minimum le nombre d'ovocytes recueillis, inséminés, le nombre d'embryons total obtenus, transférés et congelés.

Registres et relevés chronologiques

Ces documents doivent être conservés dans le respect de la confidentialité. Ils doivent être reliés et numérotés. Ils doivent être gardés à proximité des locaux où sont réalisées les diverses activités qu'ils concernent (laboratoire de FIV, lieu de conservation des gamètes et embryons).

a) Relevé des activités cliniques :

Les établissements de santé doivent noter sur un registre toutes les prises en charge pour FIV, dès le début des cycles de stimulation, les causes d'arrêt éventuelles, la date de la ponction, le résultat de la tentative et l'issue de la grossesse.

b) Relevé chronologique des tentatives d'AMP :

Etabli par les biologistes, il doit comporter au minimum la date de l'AMP (date de l'insémination pour les IAC, date de la ponction d'ovocytes pour les FIV), l'identité du couple, le nom du centre clinique, la qualité des intervenants, la technique d'AMP mise en oeuvre et les milieux produits et matériels utilisés ainsi que le résultat de la tentative, cela afin d'obtenir la traçabilité des procédures mises en oeuvre pour chaque tentative.

c) Registre de conservation des gamètes :

Son contenu est précisé à l'article R. 184-2-1 du CSP. Chaque registre doit mentionner l'identité de la personne à l'origine des gamètes (nom du patient en cas d'autoconservation, code d'identification du donneur en cas de don), les lieux et dates de congélation des gamètes. Il comporte aussi les indications précises du lieu de conservation des gamètes dans la cuve affectée à cet effet. Enfin, il doit préciser les dates et les modes d'utilisation des gamètes, et, le cas échéant, l'identité du couple destinataire du don de gamètes.

d) Registre de conservation des embryons :

Son contenu est fixé par l'article R. 184-2-2 du CSP. Chaque registre doit mentionner l'identité du couple à l'origine de l'embryon (et, le cas échéant, le code d'identification du donneur de gamètes), le lieu et les dates de fécondation et de congélation et, le cas échéant, le lieu de conservation antérieur.

Pour chaque couple, il convient de noter le nombre d'embryons conservés, les indications précises du lieu de conservation des embryons dans la cuve affectée à cet effet et les informations relatives au devenir de tous les embryons (date de décongélation, date de transfert, aspect morphologique à la décongélation, date d'arrêt éventuel de la conservation) ainsi que le résultat de tous les transferts.

Enfin, il est nécessaire d'y faire figurer les dates des relances effectuées auprès des couples sur le point de savoir s'ils maintiennent leur demande parentale, et le résultat de celles-ci.

e) Cahier de procédures :

Un cahier de procédures est mis en place dans chaque unité clinique et laboratoire. Les procédures, tenues à jour, sont dactylographiées, datées et validées par le ou les responsables agréés, et signées par l'ensemble des intervenants.

1.1.4. Confidentialité et sécurité. - Locaux, documents

La pièce affectée à la conservation des gamètes et des embryons, ainsi que celle contenant les registres, doit être équipée d'une protection contre le vol. L'accès à ces locaux est placé sous la responsabilité des praticiens agréés. Les procédures de sécurité concernant la pièce affectée à la conservation des gamètes et des embryons sont écrites.

Les documents réglementaires sont gardés dans des conditions de sécurité garantissant une conservation de longue durée. La communication d'éléments concernant les dossiers est placée sous la responsabilité des cliniciens et biologistes agréés.

Informatique

Les ordinateurs contenant les données nominatives ne doivent pas être reliés à un système extérieur à l'établissement, sauf accord de la Commission nationale Informatique et liberté (CNIL). L'accès aux informations nominatives est placé sous la responsabilité des responsables agréés et réservé aux personnes autorisées par le biais de codes d'accès confidentiels. Des procédures sont écrites pour notifier les modalités d'introduction ou de modification des données nominatives ainsi que leur consultation. Il est indispensable de disposer d'une double conservation des données.

1.2. Etapes préalables à la mise en oeuvre de l'AMP

La décision d'AMP ne devra être prise qu'après avoir effectué un bilan médical complet du couple et après l'avoir informé, le cas échéant, d'autres possibilités thérapeutiques ainsi que de la faculté de recourir à l'adoption.

1.2.1. Cadre légal de l'AMP (art. L. 152-2 CSP)

L'AMP doit toujours répondre à une demande parentale, pour remédier à une infertilité dont le caractère pathologique a été médicalement constaté ou pour éviter la transmission à l'enfant d'une maladie d'une particulière gravité. Cette dernière indication correspond principalement à l'AMP avec don de gamètes, à l'accueil d'embryon ou à la FIV avec diagnostic pré-implantatoire si la maladie est considérée de plus comme incurable. Aucune AMP ne peut être réalisée pour des raisons de convenance personnelle. La prise en charge ne peut concerner qu'un couple formé d'un homme et d'une femme, en âge de procréer. Le couple doit être marié ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune depuis au moins deux ans. Il appartient à l'équipe médicale de demander la production des documents attestant de l'identité des deux membres du couple, de la réalité du mariage (livret de famille, fiche récente d'état civil) ou de la durée de vie commune (par tout moyen). Les deux membres du couple doivent être vivants au moment de la réalisation de l'AMP (insémination ou transfert d'embryon). En pratique, le respect de cette condition est assuré par l'exigence d'un double consentement signé au moment de chacune de ces opérations.

1.2.2. Indications et diagnostic

Lorsqu'elle a pour but de remédier à l'infertilité, l'AMP est réservée à des couples pour lesquels les chances de fécondation naturelle sont nulles ou très faibles. Certaines indications sont absolues, comme l'absence ou l'occlusion bilatérale des trompes (FIV conventionnelle) ou les stérilités masculines par azoospermie (ICSI, IAD). En revanche, certaines indications sont relatives, notamment toutes celles qui correspondent à une simple hypofertilité, et doivent être jugées en fonction du bilan diagnostique, de l'âge des patients et de la durée d'infécondité. Il en est ainsi des altérations tubaires, des anomalies du spermogramme, des anticorps antispermatozoïdes, de l'endométriose, des anomalies de la glaire cervicale et des infécondités sans cause diagnostiquée (idiopathiques).

En cas d'indication relative, il est recommandé d'observer un délai raisonnable avant la mise en oeuvre de l'AMP, délai dont l'importance dépend de l'âge des patients et du temps écoulé depuis qu'ils essaient d'obtenir une grossesse. En effet, dans ce cas, la plus grande partie des couples concevront spontanément. Il n'est de ce fait pas raisonnable de proposer une FIV à un couple dont la femme a moins de trente-cinq ans sans une durée d'infécondité d'au moins deux ans. Ce délai peut être raccourci ensuite. Cependant, compte tenu de la faible efficacité des techniques au-delà de trente-sept ans, il est recommandé de ne prendre en charge des femmes plus âgées que dans les cas où la fonction ovarienne a été jugée satisfaisante. En ce qui concerne l'exploration de l'infécondité, il est inutile d'observer un délai d'attente avant de la mettre en oeuvre si l'anamnèse fait envisager l'existence de troubles de la fertilité.

Explorations préalables :

La réalisation d'une AMP chez un couple infertile ne peut être envisagée sans un bilan comprenant au moins les examens suivants :- examen clinique complet des deux partenaires ;- exploration du cycle comprenant au minimum une courbe de température et un dosage de FSH et oestradiol en début de cycle (J 2 à J 5) ;- hystérosalpingographie ;- spermogramme, spermocytogramme, spermoculture. Ce bilan minimum pourra être complété en fonction du contexte clinique, afin de mieux cerner le diagnostic, le pronostic de fertilité, l'attitude thérapeutique à adopter. La constatation d'une anomalie du spermogramme selon les critères de l'OMS (concentration inférieure à 20 millions/ml, mobilité totale inférieure à 40 % ou mobilité progressive inférieure à 25 %, taux de formes normales inférieure à 30 %) doit orienter vers l'exploration andrologique. En cas d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère faisant envisager une ICSI, il est nécessaire de disposer d'un bilan spermatique approfondi comportant au moins un test de migration - survie indiquant le nombre total de spermatozoïdes mobiles et vivants au recueil et après vingt-quatre heures d'incubation. D'autres explorations sont à prévoir en fonction du contexte clinique. Une enquête génétique est indispensable dans la plupart des cas. A l'issue de ce bilan, une stratégie thérapeutique pourra être proposée : technique retenue, nombre total de tentatives, alternatives en cas d'échec.

1.2.3. Entretiens du couple demandeur avec l'équipe médicale pluridisciplinaire (art. L. 152-10 CSP)

Préalablement à la mise en oeuvre de l'AMP, le couple demandeur doit rencontrer un clinicien et un biologiste de l'équipe pluridisciplinaire. Il doit pouvoir également, sur sa demande ou celle des praticiens, rencontrer tout autre membre de l'équipe, y compris le médecin qualifié en psychiatrie ou le psychologue dont l'établissement s'assure le concours. Il peut être fait appel en cas de besoin à un service social.

a) Information du couple : Une information claire, précise et adaptée doit être donnée au couple au cours de ces entretiens sur la cause de son infécondité ainsi que sur le choix de la ou des techniques envisagées. Chaque technique doit être présentée avec ses chances de succès pour le couple, sa pénibilité ainsi que les contraintes, notamment d'ordre matériel, financier ou psychologique, qu'elle peut entraîner. Doivent être exposés les risques potentiels à court et à long terme, liés notamment à la stimulation ovarienne, au geste chirurgical, aux techniques biologiques utilisées ainsi que le risque de grossesses multiples. Une information sur les éventuelles solutions alternatives devra être délivrée : chances de concevoir spontanément, chirurgie des trompes ou des voies excrétrices masculines. De même, l'éventualité de devoir arrêter la prise en charge devra être envisagée d'emblée. Une information doit aussi être délivrée sur les possibilités ouvertes par l'adoption (conditions légales, modalités pratiques, adresse des organismes). Le couple doit être informé de l'état actuel et encore limité des connaissances concernant l'état de santé des enfants nés après AMP. Le praticien doit encourager le couple à participer aux études épidémiologiques qui pourront lui être proposées. La remise d'un dossier-guide explicatif devra compléter ces informations.

b) Vérification de la motivation du couple : Le praticien s'assure de la réalité du désir d'enfant chez la femme et chez l'homme. Il vérifie l'absence d'obstacle grave à la mise en oeuvre de l'AMP dans l'intérêt de l'enfant à naître. Si nécessaire, après entretien avec le psychiatre ou le psychologue et concertation au sein de l'équipe, la mise en oeuvre de l'AMP pourra être différée.

c) Confirmation de la demande : L'AMP ne peut être mise en oeuvre sans que les deux membres du couple aient confirmé par écrit leur demande. Cette confirmation ne peut intervenir qu'à l'issue d'un délai d'un mois à compter du dernier entretien.

1.2.4. Tests de sécurité sanitaire

a) AMP intraconjugale : Une bonne pratique médicale implique la réalisation de certains tests sanitaires avant la mise en oeuvre d'une AMP intra-conjugale pour éviter le risque de contamination de prélèvements d'autres couples, du personnel et de l'enfant à naître. Il est nécessaire de rechercher des marqueurs biologiques d'infection et, lorsque cela est techniquement possible, d'inféctivité par VIH 1, VIH 2, les virus des hépatites B et C et la syphilis chez les deux membres du couple. Cette recherche doit être réalisée avant la première tentative et, pour les autres tentatives, si le délai depuis la dernière détermination est supérieur à douze mois. En ce qui concerne l'infection par le VIH, la prise en charge des couples ne peut se faire que dans le cadre d'un protocole de recherche clinique pluridisciplinaire relevant des prescriptions de la loi Huriet comprenant l'avis d'un CCPPRB et validé par la CNMBRDP. En ce qui concerne le virus de l'hépatite B, si l'homme est porteur de l'antigène HBS, il conviendra de vacciner la conjointe séronégative préalablement à toute AMP. Si la femme est porteuse de l'antigène HBS, l'AMP est possible, mais le couple doit être averti de la nécessité de réaliser la sérovaccination spécifique de l'enfant à la naissance. En cas de séropositivité avec virémie de l'un ou l'autre ou des deux membres du couple vis-à-vis de l'hépatite C, la prise en charge des couples est uniquement possible dans le cadre d'un protocole de recherche clinique pluridisciplinaire, relevant des prescriptions de la loi Huriet comprenant l'avis d'un CCPPRB et validé par la CNMBRDP. En cas de séropositivité pour la syphilis, l'AMP doit être précédée d'un traitement spécifique.

b) AMP avec don : Des règles de sécurité sanitaire sont obligatoires (art. R. 673-5-10 à R. 673-5-13 du CSP) pour le recueil et l'utilisation de gamètes humains provenant de dons en vue de la mise en oeuvre d'une assistance médicale à la procréation. Un certain nombre d'analyses de biologie médicale doivent être pratiquées chez le donneur de gamètes avant le don, à la recherche des marqueurs biologiques d'infection et, lorsque cela est techniquement possible, d'inféctivité : 1. Pour les virus VIH 1, VIH 2, HTLV 1, HTLV 2, hépatites B et C, et pour la syphilis ; 2. Pour le cytomegalovirus (dosages d'IgM et IgG). Si les résultats sont positifs à l'une des infections citées au 1, les donneurs ou les donneuses de gamètes ne peuvent être retenus. S'ils sont négatifs, un délai de six mois doit être respecté pendant lequel le sperme provenant du don ne peut pas être cédé, et les embryons issus d'ovocytes cédés ne peuvent pas être transférés. A l'issue de ce délai, les textes réglementaires prévoient que le bilan soit renouvelé pour les infections (1), à l'exception de HTLV 1 et HTLV 2. Il est cependant recommandé de les pratiquer. Le praticien est tenu de s'assurer que les résultats des analyses sont demeurés négatifs. Dans le cas où l'un ou plusieurs de ces résultats seraient devenus positifs, les gamètes ne pourraient être cédés ni les embryons transférés. En ce qui concerne le CMV (2), si le premier test est positif, il est préférable, en l'absence d'IgM et après la période réglementaire de six mois, de n'utiliser les gamètes que pour les couples receveurs dont l'un au moins des membres est positif pour le CMV. En présence d'IgM, le don est refusé. Si le premier test est négatif, il doit être répété à l'issue de la période de six mois. Lorsque le deuxième test de CMV se positive, traduisant une infection récente, le don est refusé. Enfin, il est préférable de réserver les gamètes provenant de donneurs négatifs pour le CMV à des couples receveurs dont les deux membres sont eux-mêmes négatifs.

Outre les analyses ci-dessus, il est nécessaire, en cas de don de sperme, de pratiquer une spermoculture à chaque recueil de sperme. Enfin, ne peuvent être retenus les donneurs de gamètes dont l'interrogatoire révèle un risque potentiel de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou d'autres encéphalopathies subaiguës spongiformes (antécédents familiaux de cette maladie, administration de produits extractifs humains provenant du cerveau - notamment hormone de croissance -, explorations neurochirurgicales invasives). L'interrogatoire doit comprendre des questions concernant ces problèmes, et il est conseillé de mentionner les réponses dans le dossier des patients. Un document, nécessaire pour la cession des gamètes et des embryons issus des ovocytes cédés, doit être établi par le biologiste agréé précisant :

- le nom et l'adresse de l'établissement autorisé ayant recueilli ces gamètes et, le cas échéant, le nom et l'adresse de l'établissement autorisé ayant procédé à la fécondation in vitro des ovocytes cédés ;
- les résultats des analyses ci-dessus sans aucune mention permettant d'identifier les donneurs de gamètes ;
- l'identité du couple destinataire des gamètes.

Le praticien mettant en oeuvre l'AMP avec tiers donneur est tenu au préalable de se faire remettre le document cité ci-dessus et de prendre connaissance des résultats des analyses. Il paraît souhaitable qu'il appose sa signature sur ce document.

2. Description des pratiques d'AMP intraconjugale

2.1. Insémination artificielle avec sperme de conjoint

Les IAC constituent une AMP à part entière, dont les indications doivent être soigneusement pesées, et concernent essentiellement les infécondités d'origine cervicale, inexplicée ou masculine. Dans tous les cas, l'indication ne sera posée qu'après réalisation d'un test de séparation des spermatozoïdes. Ce test doit montrer que le nombre total de spermatozoïdes mobiles disponibles est supérieur à 500 000, après préparation de la totalité de l'éjaculat. Il est recommandé que le test de séparation soit pratiqué dans le laboratoire préparant les

spermatozoïdes en vue d'insémination. Dans certains cas particuliers, l'insémination sera réalisée avec des paillettes de sperme autoconservé. La mise en oeuvre de cette technique nécessite, comme pour toute AMP, un entretien préalable du couple demandeur avec le clinicien amené à la réaliser. Au cours de cet entretien, le clinicien s'assure du respect des conditions légales (art. L. 152-2 du CSP), donne l'information légale au couple (art. L. 152-10 du CSP) et recueille le consentement signé. Celui-ci devra être confirmé à chaque insémination. L'insémination est le plus souvent réalisée par voie intra-utérine après préparation du sperme dans un laboratoire autorisé.

2.1.1. Coordination clinicien/biologiste

La coordination entre le clinicien et le biologiste est indispensable. Le biologiste doit donner son accord avant la mise en oeuvre de l'IAC. Il ne peut prendre en charge la préparation du sperme que s'il a une information complète sur :

- l'indication de l'IAC ;
- les données détaillées d'un spermogramme datant de moins de trois mois et d'un test de séparation des spermatozoïdes mobiles (acte réservé aux laboratoires autorisés pour l'AMP) ;
- le respect des conditions légales (cf. 1.2.1) ;
- la signature du consentement à l'IAC qu'il doit conserver ;
- les résultats des tests de sécurité sanitaire (sérologies VIH, hépatites B et C, et syphilis).

Il doit impérativement s'assurer auprès du clinicien des résultats de chaque cycle en cours ainsi que de l'issue d'une grossesse éventuelle, et recueille le bilan d'activité des cliniciens avec lesquels il collabore.

2.1.2. Aspects cliniques

L'insémination est généralement précédée d'une stimulation de la croissance folliculaire, en vue d'obtenir un petit nombre de follicules matures (1 à 3 au maximum). Un monitoring de l'ovulation échographique et hormonal (oestradiol, LH) est donc nécessaire permettant de surseoir à l'insémination si plus de trois follicules mûrs sont mis en évidence. Sauf exception, une insémination par cycle est suffisante. Le nombre de cycles d'inséminations ne devrait pas dépasser six.

2.1.3. Aspects biologiques

Le recueil de sperme en vue d'AMP doit avoir lieu dans un laboratoire d'AMP autorisé. Le sperme doit être recueilli par masturbation dans des conditions d'asepsie rigoureuse, après lavage et désinfection des mains et du gland. Dans certains cas (anticorps antispermatozoïdes, nécrozoospermie), le recueil direct dans un milieu de culture est nécessaire. Les procédures d'hygiène du recueil doivent être affichées dans la pièce destinée au recueil. Pour des raisons de sécurité sanitaire, il est de bonne pratique de traiter le sperme sous une hotte à flux laminaire avec du matériel à usage unique, des milieux stériles et contrôlés (de préférence à 37 °C) et répondant aux exigences réglementaires en vigueur (voir chapitre 2.2.2). Il est indispensable d'identifier chaque flacon de recueil, et chaque tube à centrifuger avec le nom du patient ou les deux noms des membres du couple s'ils sont différents. L'analyse des paramètres spermatiques le jour du recueil est indispensable avec, au minimum, l'évaluation de la numération et de la mobilité des spermatozoïdes, et une numération des leucocytes. Si nécessaire, un deuxième recueil pourra être demandé. La préparation peut se faire selon différentes techniques sélectionnées en fonction des paramètres spermatiques : lavage - migration ascendante, gradients de densité. Il est nécessaire de faire l'analyse des paramètres après préparation afin d'évaluer le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés.

Si le sperme doit être transporté, cela doit se faire dans un système permettant le maintien du prélèvement entre 20°C et 35°C en évitant les variations thermiques. L'IAC est généralement réalisée avec au moins 500 000 spermatozoïdes mobiles concentrés dans un volume de 0,2 à 0,3 ml de milieu.

2.2. La fécondation in vitro intraconjugale (FIV-C)

2.2.1. Aspects cliniques

a) Indications : La fivete (fécondation in vitro et transfert embryonnaire), avec ou sans micromanipulation, demeure une technique lourde et coûteuse dont les résultats restent limités. Ses indications peuvent être absolues (absence ou obstruction tubaire bilatérale, azoospermie...) ou relatives (altération tubaire, endométriose, insuffisance spermatique, idiopathique etc.). Dans les indications relatives, la FIV doit être proposée avec discernement, ni trop précocement avant d'avoir mis en oeuvre d'autres possibilités thérapeutiques, ni trop tardivement lorsque l'âge de la femme grèvera considérablement les chances de succès. Exceptionnellement, la FIV peut être proposée dans le but de réaliser un diagnostic biologique à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro (art. L. 162-17 CSP). Enfin, un cycle de ponction ne doit pas être débuté tant que le couple dispose d'embryons congelés provenant d'une ponction antérieure.

b) Stimulation : La stimulation ovarienne vise à obtenir un nombre raisonnable d'ovocytes matures, le nombre habituel varie de 4 à 10. L'obtention d'une moyenne différente doit faire réévaluer les protocoles utilisés. Elle sera modulée en fonction du statut ovarien de la femme. Il faudra également tenir compte des souhaits du couple (refus de congélation embryonnaire par exemple qui doit conduire à une stimulation si possible paucifolliculaire). La surveillance de cette stimulation repose sur un suivi échographique et hormonal. La surveillance échographique se fait de préférence par voie vaginale à l'aide de sondes à haute définition. La mesure des diamètres folliculaires est répétée en fonction de la réponse de chaque patiente : trois ou quatre échographies sont en général suffisantes. L'étude de l'épaisseur et des caractéristiques de l'endomètre peut y être associée.

La surveillance hormonale s'effectue par le dosage de l'oestradiol. Trois ou quatre dosages sont généralement

réalisés avant la décision du déclenchement. Le dosage de la progestérone en fin de stimulation peut être utilisé pour affiner les critères de la maturation folliculaire. Le dosage de la LH n'est utile qu'en cas de stimulation n'associant pas un analogue de LHRH. Les autres dosages n'ont pas d'intérêt en pratique clinique habituelle. Les modalités de la stimulation et de sa surveillance, de son arrêt éventuel, la décision de déclenchement de l'ovulation restent sous la responsabilité d'un clinicien agréé. En cas de réponse ovarienne excessive, le déclenchement de l'ovulation doit être annulé et la femme doit continuer à être suivie.

c) Ponction folliculaire : La ponction folliculaire est réalisée, sous la responsabilité d'un praticien agréé, trente-trois à trente-six heures après le déclenchement de l'ovulation, généralement sous échographie, par voie vaginale. Une anesthésie loco-régionale ou générale est pratiquée, en tenant compte du souhait de la patiente. Un anesthésiste doit être immédiatement disponible, même en cas d'anesthésie loco-régionale, permettant, si nécessaire, la réalisation d'une anesthésie générale. Du fait de cette éventualité, une consultation pré-anesthésique est recommandée. Les milieux de rinçage utilisés pour la ponction folliculaire sont choisis parmi les produits répondant aux normes en vigueur. Le maintien à 37 °C du prélèvement doit être assuré dès la ponction jusqu'à son traitement au laboratoire.

2.2.2. Aspects biologiques

Le traitement de gamètes et d'embryons humains dans le laboratoire nécessite le respect de règles de sécurité explicitées au chapitre 1.1.2. Pour des raisons sanitaires et afin d'éviter tout risque d'erreur, les produits venant de couples différents ne doivent pas être traités par la même personne simultanément. L'identification des gamètes et des embryons est d'une importance capitale et implique la vérification de l'identité des deux membres du couple. Par la suite, chaque flacon de recueil, tube ou boîte de culture utilisé doit porter le nom d'usage du couple (ou les deux noms s'ils sont différents).

a) Milieux de culture et matériel : Les conditions de culture optimales imposent la maîtrise de plusieurs paramètres, notamment: l'asepsie, la température et le pH. Les manipulations doivent être réalisées sous enceinte stérile à flux adapté, avec du matériel stérilisé sans substance connue comme toxique (comme l'oxyde d'éthylène) et des milieux de culture adaptés. Le personnel doit porter tenues à usage unique ou stérilisées quotidiennement, ainsi qu'un masque et des gants (cf. 1.1.2). La température est maintenue à 37 °C pendant toute la durée des manipulations et des transports éventuels des ovocytes et embryons : préchauffage du matériel plastique et des milieux de culture, utilisation d'un plateau chauffant dans la hotte, d'une platine chauffante sur le stéréomicroscope, d'une platine chauffante ou d'une enceinte thermostatée pour le microscope inversé, d'un bain-marie sec et d'un incubateur. Le pH doit être maintenu autour de 7,2 grâce à une atmosphère gazeuse enrichie en CO₂ pendant toute la durée de la culture. Plusieurs milieux de culture actuellement disponibles dans le commerce ont montré une efficacité comparable. Néanmoins, ne peuvent être utilisés que ceux répondant aux exigences réglementaires en vigueur. En cas de supplémentation, ne peuvent être utilisés que des produits biologiques provenant du couple ou des substances commercialisées satisfaisant aux réglementations. L'utilisation de produits biologiques provenant d'autres patients est interdite. Les milieux préparés au laboratoire doivent inclure des composés conformes aux normes, hautement purifiés et, lorsque cela est possible, spécifiques pour culture cellulaire. Un cahier de préparation doit être tenu comportant la composition du milieu, l'origine des composants et leur numéro de lot. De plus, un numéro de lot doit être attribué à chaque préparation de milieu. Toute nouvelle modalité de culture ou de conservation des embryons ne peut être pratiquée que dans le cadre d'une étude sur l'embryon autorisée par le ministre chargé de la santé après avis de la CNMBRDP (art. L. 152-8 et R. 152-8-3 du CSP). Dans tous les cas, les numéros de lot des milieux utilisés doivent figurer sur un document permettant d'assurer la traçabilité des milieux. En cas de culture sous huile, celle-ci doit être spécifique pour la culture cellulaire.

Le matériel plastique utilisé pour toutes les manipulations doit être non cytotoxique et, lorsque cela est possible, spécialement conçu pour culture cellulaire.

b) Technique de FIV : Le recueil du sperme doit se faire au laboratoire d'AMP autorisé notamment pour s'assurer de l'origine des gamètes. Lorsque des problèmes de recueil sont connus, le sperme pourra être congelé en dehors de toute tentative de FIV de manière à être disponible en cas d'échec de recueil le jour de la tentative (cf. Autoconservation, 2.6). La préparation du sperme peut se faire selon différentes techniques sélectionnées en fonction de sa qualité : lavage simple, lavage et migration ascendante, gradient de densité ou toute autre méthode éprouvée.

L'insémination des ovocytes non atériques est réalisée dans les heures qui suivent le recueil ovocytaire avec un nombre de spermatozoïdes mobiles compris, sauf exception, entre 50 000 et 200 000/ml. En cas d'asthénospermie, les délais entre le recueil de sperme, sa préparation et l'insémination doivent être les plus courts possible.

Lorsque le couple refuse la congélation embryonnaire, le nombre d'ovocytes inséminés doit être limité à trois, le couple en ayant été averti au moment du consentement. Les ovocytes sont examinés seize à vingt heures après l'insémination de manière à évaluer la fécondation. La culture embryonnaire est ensuite poursuivie et le transfert envisagé pour ceux présentant au plus deux pronuclei. La culture est poursuivie le plus souvent jusqu'à J 2 ou J 3. Elle peut être parfois prolongée jusqu'à J 5-J 7, soit par coculture, soit en utilisant des milieux synthétiques séquentiels, pour permettre le développement de l'embryon jusqu'au stade de blastocyste et ainsi un transfert plus tardif.

La coculture consiste à cultiver des embryons sur un tapis cellulaire. Seules les cellules autologues (cumulus, granulosa, endomètre de la patiente) n'induisent pas de risque infectieux exogène. L'usage des cellules d'une autre patiente est strictement interdit. Certains types de cellules (cellules Véro de rein de singe) ont pu être utilisées, mais n'ont fait actuellement l'objet d'aucune procédure de validation au regard de la sécurité sanitaire, en l'état de

la législation actuelle. Les techniques d'assistance médicale à la procréation innovantes non consacrées par l'usage, aboutissant à la formation d'embryons, doivent être réalisées dans le cadre d'un projet de recherche clinique et après avis de la CNMBRDP. Il convient de rappeler que lorsque ces techniques non éprouvées concernent l'embryon lui-même, elles entrent dans la procédure obligatoire d'autorisation d'études sur l'embryon humain (art. L. 152-8 et R. 152-8-1 à R. 152-8-12 du code de la santé publique).

2.2.3. Transfert embryonnaire

Au moment du transfert embryonnaire, le clinicien et le biologiste doivent s'assurer personnellement de l'identité de la patiente. Les modalités du transfert s'appuient sur les données cliniques de la patiente et les résultats d'un test de transfert préalable dont les résultats sont consignés dans le dossier d'AMP. Enfin, dans des cas exceptionnels, il doit être possible de recourir à l'anesthésie générale.

a) Choix des embryons à transférer :

Ce choix se fait en fonction des critères suivants :

- normalité de la fécondation (présence de deux pronuclei au maximum à J 1) ;
- cinétique embryonnaire, le meilleur développement étant quatre cellules à J 2 et huit cellules à J 3 ;
- morphologie embryonnaire évaluée sur l'homogénéité des blastomères et la proportion du volume des exsudats qui ne doit pas excéder 50 %.

Le choix des embryons à transférer est sous la responsabilité du biologiste et doit être explicité au couple. Selon leur aspect morphologique, le biologiste peut décider de ne pas transférer ni congeler les embryons obtenus.

b) Nombre d'embryons à transférer :

Le nombre d'embryons à transférer doit être discuté conjointement entre le couple, le clinicien et le biologiste. Ce nombre dépend de l'aspect des embryons, de l'âge de la patiente et de ses antécédents. Il doit être autant que possible limité à deux. Au-delà, les raisons doivent être justifiées dans le dossier de la patiente.

c) Les couples doivent être informés des chances de succès ainsi que du risque de grossesse multiple et de tout incident sérieux survenu au cours des phases clinique et biologique de leur tentative et pouvant compromettre leurs chances de succès. Ces éléments doivent être mentionnés sur le dossier de la patiente et sur le registre des tentatives.

2.3. FIV avec micro-injection (ICSI)

2.3.1. Aspects cliniques

L'ICSI doit être réservée à des cas où la fécondation in vitro par les techniques conventionnelles est impossible ou a de faibles chances de réussite. Il s'agit surtout des infécondités masculines sévères. Elle peut être envisagée en première intention dans les cas suivants :

- azoospermies impliquant un prélèvement épидидymaire ou testiculaire des spermatozoïdes ;
- oligo et/ou asthénie et/ou térato-zoospermie majeure ;
- akinétopermie ;
- certaines auto-immunisations antispermatozoïdes.

En dehors de ces cas, l'indication doit se discuter en fonction du taux de fécondation obtenu lors des tentatives précédentes réalisées par FIV conventionnelle. Le choix de la technique et ses raisons seront alors clairement explicités dans le dossier médical.

Un dossier-guide spécifique de l'ICSI, précisant les risques, notamment de transmission de la stérilité masculine, sera remis au couple. L'ICSI doit faire l'objet d'un consentement éclairé, signé, spécifique.

Enfin, les centres doivent collecter les données sur l'état de santé des enfants à la naissance. L'étude du devenir à long terme des enfants doit être encouragée.

2.3.2. Aspects biologiques

Par rapport à la FIV classique, trois étapes sont spécifiques de l'ICSI, la préparation des spermatozoïdes, celle des ovocytes et la fécondation assistée elle-même.

a) Préparation des spermatozoïdes : La préparation des spermatozoïdes éjaculés ou recueillis par prélèvement épидидymaire dépend de leur concentration. Il peut être demandé plusieurs éjaculats. Au-dessus de 0,5 million de spermatozoïdes mobiles par millilitre, les techniques classiques peuvent être utilisées (cf. chapitre sur les techniques de FIV 2.2.2). Au-dessous de cette limite, un simple lavage-centrifugation de la totalité de l'éjaculat est réalisé. En cas de ponction testiculaire, la biopsie est disséquée de manière à recueillir les spermatozoïdes. Lorsque les spermatozoïdes sont prélevés chirurgicalement, ceux qui ne sont pas utilisés doivent pouvoir être congelés de manière à éviter une nouvelle ponction en cas d'échec de la tentative, après accord préalable du patient. Dans l'état des connaissances actuelles, l'injection de cellules germinales immatures (spermatides) ou de spermatozoïdes dont la vitalité n'est pas établie ne peut être envisagée que dans un protocole de recherche clinique et après avis de la CNMBRDP.

b) Préparation des ovocytes : Les ovocytes prélevés en vue d'ICSI doivent être décoronés de manière à visualiser l'introduction de la micropipette et l'injection du spermatozoïde. La décoronation se fait par la hyaluronidase. Elle doit être rapide et suivie de plusieurs rinçages pour éviter une action délétère de l'enzyme. Elle permet de connaître l'état et la maturité des ovocytes qui doivent être notés sur le dossier biologique.

c) Injection du spermatozoïde : Le matériel nécessaire se compose d'un microscope inversé équipé de micro-injecteurs. Il doit être placé dans des conditions garantissant l'asepsie des manipulations (de préférence hotte à flux laminaire, salle stérile). Il est préférable d'utiliser les pipettes de maintien et d'injection commercialisées. Toutefois, lorsqu'elles sont fabriquées au laboratoire, elles doivent être nettoyées et stérilisées avant usage. L'injection se déroule dans une boîte de Pétri, sous huile (spéciale pour culture cellulaire). Le sperme est le plus

souvent placé dans une goutte de polyvinylpyrrolidone (PVP), de manière à ralentir le mouvement spermatique et faciliter l'injection, mais l'utilisation du PVP n'est pas indispensable. Le spermatozoïde est immobilisé par effet de cisaillement du flagelle. L'injection elle-même se fait au centre de l'ovocyte, ce dernier ayant été orienté de sorte que le globule polaire soit à 6H ou 12H, donc à distance du fuseau méiotique. Elle doit être rapide, non traumatisante pour l'ovocyte. Les ovocytes sont ensuite remis en culture. Il est actuellement admis que 10 % environ des ovocytes sont endommagés. Au-delà de 15 %, il est nécessaire de revoir la technique. Le reste de la technique se déroule de la même manière que pour la FIV. Cependant, la coculture ne doit pas être associée à l'ICSI.

Le traitement d'une partie des ovocytes avec et sans micromanipulation doit rester exceptionnel et documenté dans le dossier. S'il a été décidé d'entreprendre une association « FIV classique - ICSI » et que des embryons sont issus des deux techniques, seront transférés en priorité ceux provenant de FIV classique. Ils ne doivent pas être transférés simultanément (sauf justification dans le dossier), en raison notamment de la nécessité d'avoir un suivi correctement documenté des enfants qui en sont issus.

2.4. Congélation des embryons

Une bonne pratique de la FIV implique la possibilité de congeler des embryons en vue de les transférer ultérieurement. Cette possibilité est soumise au consentement écrit du couple.

2.4.1. Indications

L'indication principale concerne les cas où le nombre d'embryons obtenus est supérieur au nombre d'embryons transférés. La congélation peut aussi être proposée s'il est nécessaire de retarder le transfert pour raisons médicales (maladie, hyperstimulation, traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie, etc.), ou pour remplir les conditions de sécurité sanitaire (notamment dans le cadre du don d'ovocyte). Elle est enfin réalisable dans le cas d'impossibilité d'effectuer le transfert (accident, contretemps, etc). L'indication doit toujours figurer dans le dossier.

2.4.2. Aspects cliniques

Le transfert d'embryons décongelés peut être réalisé lors de cycles spontanés, stimulés ou substitués. Lors des cycles spontanés, le repérage de l'ovulation se base sur la mise en évidence de la décharge de LH. L'ovulation peut également être déclenchée lorsque le follicule a atteint 20 mm de diamètre. La pratique d'une stimulation ovarienne implique un monitoring échographique et hormonal. La réponse ovarienne doit rester paucifolliculaire. Les cycles substitués font appel dans un premier temps aux oestrogènes naturels. La progestérone ne sera administrée qu'après avoir vérifié l'absence d'ovulation spontanée. Le délai entre le moment estimé de l'ovulation et le transfert doit être le même que celui écoulé entre la ponction et la congélation.

2.4.3. Aspects biologiques

La congélation peut intervenir du stade des pronuclei (J 1) au stade blastocyste (J 6). Les embryons présentant plus de 30 % de fragmentation ou un retard de développement ne doivent pas être congelés. Le cryoprotecteur actuellement le plus efficace pour les embryons de deux à trois jours est le propanediol associé au sucrose. Il est conseillé de ne mettre qu'un seul embryon par paillette. On ne doit jamais en mettre plus de deux afin de maîtriser au mieux le nombre d'embryons transférés. Les paillettes doivent porter très lisiblement les indications permettant l'identification des embryons. Elles sont ensuite déposées dans un congélateur programmable avant d'être immergées dans l'azote liquide. L'induction de la cristallisation doit être parfaitement contrôlée.

La décongélation se fait par simple réchauffement à température ambiante. Le cryoprotecteur est éliminé par incubation des embryons dans des solutions de concentration décroissante en propanediol, jusqu'à élimination du cryoprotecteur. Les embryons sont transférés in utero dans les quelques heures qui suivent le réchauffement. En moyenne, après réchauffement, plus des deux tiers des embryons décongelés devraient présenter au moins 50 % de blastomères intacts. Si tel n'est pas le cas, la procédure de congélation-décongélation doit être reconsidérée. La technique de congélation-décongélation des blastocystes est différente : elle nécessite un autre cryoprotecteur, le glycérol. Chaque cycle de congélation et de décongélation doit être mentionné sur le registre de conservation des embryons (voir chapitre 1.1.3).

2.5. Recueil de spermatozoïdes par ponction

Ces ponctions ne peuvent être envisagées que sous la responsabilité d'un praticien agréé, compétent en andrologie (art. R. 152-9-3 du CSP). Le biologiste doit se trouver à proximité immédiate du bloc chirurgical, car c'est son appréciation du nombre et de la qualité des spermatozoïdes, qui va guider le chirurgien dans la poursuite ou l'arrêt du prélèvement. Les spermatozoïdes devront être transportés rapidement au laboratoire et traités sans délai. Le prélèvement peut se faire à partir de l'épididyme, du déférent ou du testicule. Le prélèvement épидидymaire peut être proposé en cas d'azoospermie obstructive, devant l'impossibilité ou l'échec de la chirurgie réparatrice. L'anéjaculation d'origine organique, en particulier chez les paraplégiques, représente une autre indication de cette technique après échec des thérapeutiques classiques (vibro-massage, électrostimulation, stimulation pharmacologique). En cas d'anéjaculation d'origine psychogène, le prélèvement épидидymaire n'est réalisé qu'après avis du psychiatre. Le prélèvement testiculaire est proposé en cas d'azoospermie obstructive lorsque le prélèvement épидидymaire est impossible (échec, obstacle en amont de l'épididyme), ou en cas d'azoospermie non obstructive.

Deux techniques de prélèvement épидидymaire sont actuellement utilisées, sous anesthésie locale, loco-régionale ou générale : prélèvement après abord chirurgical de l'épididyme ou ponction transcutanée à l'aiguille fine. En ce

qui concerne le prélèvement testiculaire, si la ponction testiculaire à l'aiguille a pu être proposée, la réalisation d'une biopsie chirurgicale semble préférable. Elle permet en effet un meilleur contrôle de l'hémostase et le recueil d'un nombre plus élevé de spermatozoïdes. Ce dernier élément est de particulière importance en raison des progrès réalisés dans la congélation des spermatozoïdes testiculaires.

b Un délai de six mois est nécessaire entre deux prélèvements.

2.6. Autoconservation de gamètes

Ce chapitre concerne essentiellement l'autoconservation de sperme. En effet, la congélation d'ovocytes et les prélèvements de fragments d'ovaire en vue de conservation pour une éventuelle AMP ultérieure restent du domaine de la recherche et doivent donc entrer dans le cadre d'un protocole de recherche et faire l'objet d'une demande à un CCPPRB.

2.6.1. Aspects cliniques

L'autoconservation de sperme doit être systématiquement proposée aux patients avant toute thérapeutique ou intervention potentiellement stérilisante (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie...). Elle peut aussi être préconisée avant ou au cours d'une tentative d'AMP. Le patient doit être informé de la qualité du sperme conservé et du nombre de paillettes. Le bilan du patient comprendra en particulier la recherche des maladies infectieuses transmissibles : VIH 1 et 2, syphilis, hépatites B et C. La durée de la conservation est prévue pour un an renouvelable sur demande écrite. Seul le déposant peut demander la restitution ou la destruction de ses paillettes. Dans ces cas, un document est alors signé par le patient et contresigné par le médecin biologiste. L'utilisation ultérieure du sperme en vue d'un acte d'assistance médicale à la procréation ne pourra se faire que dans la mesure où seront remplies les conditions prévues par l'article L. 152-2 du code de la santé publique. En cas de nécessité du déplacement des gamètes confiés à un laboratoire, celui-ci a l'obligation absolue d'en informer préalablement la personne qui lui avait confié la conservation de ses gamètes ainsi que du nouveau lieu de conservation (art. R. 184-1-14 du CSP).

2.6.2. Aspects biologiques

De nombreuses méthodes de congélation du sperme existent et ont prouvé leur efficacité. La congélation repose sur l'utilisation de cryoprotecteurs dont le plus fréquemment utilisé est le glycérol. Il est en général intégré dans des milieux plus complexes, auxquels il convient d'adjoindre des antibiotiques. La dilution dépend de la concentration spermatique avec des rapports allant de 1/1 à 1/3. Le sperme est conditionné en doses d'insémination ou paillettes. Le remplissage des paillettes s'effectue de préférence à l'aide d'une machine automatique qui en soude les extrémités. Lors de la conservation de sperme de patients à risque viral, des paillettes haute sécurité doivent être utilisées. La descente en température est soit manuelle (dans les vapeurs d'azote liquide), soit, de préférence, automatisée à l'aide d'un congélateur programmable permettant une meilleure reproductibilité. Les paillettes sont ensuite conservées dans l'azote liquide à - 196 °C. La décongélation s'effectue de préférence à 37 °C. Un test de tolérance à la congélation doit être effectué systématiquement pour chaque prélèvement afin d'en vérifier la qualité.

3. Dispositions spécifiques au don (IAD, FIV-D)

3.1. Cadre législatif

L'AMP avec don de gamètes s'entend de l'IAD et de la FIV avec tiers donneur - don de spermatozoïdes ou d'ovocyte - (art. L. 673-1 du CSP), le double don étant interdit (art. L. 152-3 al. 1 du CSP). L'AMP avec don de sperme doit être réalisée avec du sperme congelé (art. L. 673-3 du CSP). En revanche, le don d'ovocyte implique une fécondation in vitro dès leur recueil. Les embryons obtenus seront ensuite congelés afin de respecter les conditions sanitaires en vigueur (cf. 1.2.4). Le recueil, le traitement, la conservation et la cession des gamètes en vue de don ne peuvent être pratiqués que dans un établissement ou organisme de santé public ou privé à but non lucratif autorisé à cette fin (art. L. 673-5 du CSP et 511-14 du code pénal). Le don de gamètes ne peut être pratiqué que dans le respect des principes de gratuité (art. 16-5 et 16-6 du code civil, L. 665-13 du CSP et 511-9 du code pénal) et d'anonymat (art. 16-8 du code civil, L. 665-14 du CSP et 511-9 du code pénal), ce qui interdit tout accord préalable entre le couple receveur et un donneur désigné. En outre, il est interdit de subordonner le bénéfice de l'AMP à la désignation d'un donneur par le couple receveur, même en faveur d'un couple tiers anonyme (art. L. 673-7 du CSP et 511-13 du code pénal). Cette dernière disposition n'interdit pas d'informer les couples receveurs potentiels sur les difficultés rencontrées pour disposer de donneurs de gamètes et de les encourager à aider l'équipe dans cette recherche.

3.2. Dispositions relatives au donneur

Le donneur (ou la donneuse) doit faire partie d'un couple ayant procréé (art. L. 673-2 du CSP). Ses gamètes ne peuvent plus être utilisés lorsque l'équipe médicale a connaissance de la naissance de cinq enfants issus de ce donneur dans le cadre de l'AMP (art. L. 673-4 du CSP). L'utilisation de sperme frais ou de mélange de spermatozoïdes d'origines différentes est interdite (art. L. 673-3 et 511-12 du code pénal). Il en est de même, par assimilation, pour le don d'ovocytes : le transfert simultané d'embryons issus de donneuses différentes est interdit, pour permettre l'application de l'article L. 673-6 du CSP.

3.2.1. Entretiens et formalités préalables au don

Le donneur (ou la donneuse) s'entretient avec les membres de l'équipe médicale (art. R. 673-5-5 du CSP) dans une pièce aménagée à cet effet (art. R. 673-5-4 du CSP) lui garantissant confidentialité et anonymat. Il est

informé des conditions légales du don (art. R. 673-5-5 2o du CSP), notamment du principe d'anonymat et de ses corollaires (absence de responsabilité encourue, impossibilité d'établir un lien de filiation à l'égard de l'enfant à naître (art. 311-19 du code civil) et du principe de gratuité qui lui interdit de percevoir une rémunération (art. L. 665-13 du CSP). Toutefois, le remboursement des frais engagés par le don peut lui être accordé. Le donneur est informé de la nature des examens à effectuer avant le don (art. R. 673-5-5 3o du CSP). Il est informé également de la nécessité pour lui ainsi que pour son conjoint ou concubin de consentir par écrit au don de gamètes. Il devra également consentir à la conservation, sous forme rendue anonyme, d'informations à caractère personnel relatives à sa santé dans le dossier prévu à l'article R. 673-5-8 du CSP. Le contenu de ce dossier, les conditions de sa conservation et de sa consultation lui sont également précisés. Une information doit être donnée concernant les contraintes liées au recueil de gamètes (déplacements et contraintes pratiques). Pour ce qui concerne le don d'ovocyte, la femme reçoit en outre une information détaillée sur les conditions de la stimulation ovarienne et du prélèvement ovocytaire, les risques et contraintes liées à cette technique. Afin d'éviter d'éventuelles pressions, si les ovocytes proviennent d'une patiente bénéficiant d'une FIV pour elle-même et non d'une ponction effectuée exclusivement en vue du don, la patiente doit avoir préalablement été informée précisément des conséquences, notamment de la perte de chances pour elle-même consécutive à ce don. Ce don ne peut être décidé au cours du cycle de ponction. Le consentement doit avoir été signé avant le cycle de FIV (en plus du consentement habituel pour FIV), être renouvelé avant chaque cycle d'AMP et être confirmé à chaque recueil.

Le praticien agréé vérifie que le donneur remplit les conditions légales (art. R. 673-5-5 CSP). Il recueille par écrit les consentements. Le consentement peut être révoqué avant tout prélèvement (art. L. 665-11 du CSP).

3.2.2. Critères d'acceptabilité des donneurs

Cette sélection s'opère en fonction des antécédents médicaux personnels et familiaux, des résultats des tests de dépistage sanitaires obligatoires, de l'analyse du sperme ou du bilan gynécologique. L'âge doit être pris en compte pour limiter les risques génétiques.

a) Antécédents et enquête génétique : Il est indispensable de procéder à un examen clinique des donneurs et des donneuses.

Une étude complète et documentée de l'arbre généalogique du donneur doit être réalisée pour éviter la transmission à l'enfant d'une anomalie génétique sévère. Toute suspicion d'anomalie doit inciter à rechercher des renseignements précis auprès du médecin traitant avec l'accord du patient. L'établissement du caryotype est préconisé. Si le donneur appartient à un groupe de population prédisposé à certaines pathologies, il est indispensable de rechercher l'hétérozygotie (hémoglobinopathies dans le bassin méditerranéen, en Afrique, etc.). Les donneurs à risque de transmission d'une anomalie génétique mineure peuvent être acceptés. Pour conclure le dossier avant d'exclure le donneur s'il existe un doute, il est recommandé de prendre l'avis d'un généticien.

b) Analyse du sperme : Le recueil doit être fait impérativement sur place dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 2.1. Les paramètres du sperme sont analysés dans l'heure qui suit. L'utilisation du sperme congelé repose sur le test de tolérance à la congélation. Ainsi ne seront retenues que les paillettes dont le test aura montré qu'elles contiennent au moins 20 % de spermatozoïdes de mobilité progressive et, au total, huit millions de spermatozoïdes mobiles/ml.

3.2.3. Conservation des informations du donneur

Le dossier du donneur, archivé dans des conditions garantissant la confidentialité, conformément à l'article R. 673-5-8 du CSP, doit contenir, sous forme rendue anonyme, les antécédents personnels et familiaux, les résultats des tests de dépistage sanitaires obligatoires, le consentement écrit du couple donneur ainsi que le nombre d'enfants issus du don. S'il s'agit d'un don de sperme, le dossier comprend la date des dons, le nombre de paillettes conservées, la date des cessions, le nombre de paillettes cédées. S'il s'agit d'un don d'ovocytes, il comprend la date de la ponction et le nombre d'ovocytes donnés.

3.3. Dispositions relatives au couple receveur

Outre le respect des conditions légales prévues à l'article L. 152-2 du CSP pour toute AMP (cf. 1.2.1), le couple receveur doit satisfaire, dans le cas de l'AMP avec don de gamètes, à des dispositions particulières concernant la procédure préalable et le consentement.

3.3.1. Procédure préalable

L'équipe pluridisciplinaire, à laquelle doit s'adjoindre un médecin qualifié en psychiatrie ou un psychologue (art. R. 673-5-6 du CSP), délivre une information spécifique décrivant la technique d'AMP avec don de gamètes envisagée ainsi que les principales dispositions légales relatives au don (gratuité, anonymat, filiation). Les conditions législatives et réglementaires relatives aux donneurs leur sont exposées (information, consentement, précautions d'ordre médical, critères de sélection et d'appariement). Les entretiens se déroulent dans une pièce aménagée à cet effet permettant le respect de la confidentialité (art. R. 673-5-4 du CSP). Les conditions d'accueil des couples receveurs doivent rendre impossible la rencontre avec les donneurs. Dans le cadre du don d'ovocytes, les couples doivent être informés de la nécessité de recourir à la fécondation in vitro avec le sperme du conjoint de la receveuse, et de la congélation des embryons qui en sont issus, ainsi que du délai d'attente de six mois au minimum avant leur transfert, rendu nécessaire pour refaire les tests sanitaires chez la donneuse. Le couple doit avoir dans tous les cas un ou plusieurs entretiens avec le psychiatre ou le psychologue qui lui expose les enjeux du don de gamètes et évoque avec lui les questions soulevées éventuellement pour l'information de l'enfant sur les circonstances de sa conception. L'opportunité d'une demande d'adoption doit être

également envisagée. L'équipe pluridisciplinaire évalue les motivations du couple dans l'intérêt de l'enfant à naître. Un doute sérieux sur la santé psychique des demandeurs ou la validité de leurs motivations pourra conduire, après entretien avec le psychiatre ou le psychologue et concertation au sein de l'équipe, à leur proposer un délai de réflexion supplémentaire ou à ne pas accepter leur demande. Un consentement est recueilli et confirmé dans les mêmes conditions que pour l'AMP avec les gamètes du couple, comportant notamment, dans le cadre du don d'ovocytes, un consentement pour la congélation des embryons. De plus, le responsable de l'équipe doit exiger la production de l'acte de consentement effectué par déclaration conjointe devant un juge du tribunal de grande instance ou un notaire dans les conditions des articles 1157-2 et 1157-3 du nouveau code de procédure civile. Cet acte mentionne que les informations relatives à la filiation ont été données par le juge ou le notaire. Il doit être fait mention de la date et du lieu de la déclaration conjointe dans le dossier conservé par l'établissement. Le consentement interdit toute contestation relative à la filiation de l'enfant, à moins qu'il ne soit soutenu que cet enfant n'est pas issu de l'AMP ou que le consentement a été privé d'effet. C'est pourquoi il convient d'être très attentif à la pérennité du consentement. En effet, outre l'éventuelle révocation par écrit, le consentement peut être privé d'effet à la suite de l'une des circonstances suivantes : décès de l'un des membres du couple, dépôt d'une requête en divorce ou en séparation de corps ou cessation de la communauté de vie. Dans ce cas, la filiation de l'enfant pourrait être remise en question.

3.3.2. Attribution et cession des gamètes

Un appariement entre le couple receveur et un donneur ou une donneuse est souhaitable, avec comme seul objectif de ne pas introduire de caractères discordant entre le couple et l'enfant à naître. Il s'effectue en tenant compte des caractéristiques physiques et, éventuellement, des groupes sanguins du couple receveur. Les gamètes provenant de don ne peuvent être délivrés qu'au praticien mettant en oeuvre l'AMP (insémination artificielle ou FIV) ou au couple receveur (art. R. 673-5-7 du CSP). Avant toute utilisation de gamètes de donneur et tout transfert d'embryons congelés issus de don d'ovocytes, le praticien devra prendre connaissance des éléments concernant les tests de sécurité sanitaire (art. R. 673-5-13 du CSP). Les gamètes et embryons issus d'ovocytes cédés doivent être accompagnés du document décrit à l'article R. 673-5-12 du CSP.

3.3.3. Aspects cliniques et biologiques

a) Don de sperme : L'infertilité masculine demeure l'indication essentielle de l'insémination artificielle avec sperme de donneur (art. L. 152-2 du code de la santé publique, al. 2). En pratique, dans ce cas, sont regroupées les stérilités masculines vraies comme l'azoospermie mais aussi les hypofertilités masculines plus ou moins sévères pour lesquelles une assistance médicale à la procréation intraconjugale ne peut aboutir ou n'a que de très faibles chances de réussite. Elle peut aussi avoir pour objet d'éviter la transmission à l'enfant d'une maladie d'une particulière gravité (art. L. 152-2 du code de la santé publique, al. 2) ; cela concerne :

- l'indication d'IAD pour cause génétique : elle permet d'éviter de transmettre à l'enfant une maladie génétique engageant son pronostic vital ou entraînant un handicap sévère (maladie dominante chez le père par exemple) ;
- l'indication d'IAD pour séropositivité de l'homme (VIH) : elle reste la seule technique sans risque de contamination de l'enfant et de la partenaire. La décision d'insémination artificielle avec sperme de donneur quelle qu'en soit l'indication ne peut être prise qu'après concertation de l'équipe pluridisciplinaire. La technique d'insémination est décrite au chapitre 2.1.2. La technique de congélation est décrite au chapitre sur l'autoconservation du sperme (cf. 2.6.2). Dans le cas du don, les paillettes sont préalablement codées de façon anonyme.

b) Don d'ovocytes : Les indications de cette procédure concernent des femmes en âge de procréer principalement, chez lesquelles l'ovulation est impossible : ménopause précoce, dysgénésie gonadique, castration chirurgicale, séquelles de chimiothérapie, de radiothérapie, etc. L'absence ou l'insuffisance marquée de réponse ovarienne à la stimulation lors de plusieurs tentatives de FIV peut également constituer une indication du don d'ovocytes. Enfin, le don d'ovocytes peut être proposé en cas d'anomalie génétique d'une particulière gravité transmissible. En ce qui concerne la donneuse, il est particulièrement important de suivre des règles de grande prudence dans la stimulation ovarienne, pour ne pas l'exposer à des risques excessifs d'autant que cette dernière ne tire aucun bénéfice pour elle-même de la fécondation in vitro. Il faut de plus la mettre en garde sur les risques de grossesse spontanée pour elle-même. Les ovocytes d'une même donneuse pourront être utilisés pour plusieurs couples receveurs.

En ce qui concerne la receveuse, il est conseillé de ne pas transférer plus de deux embryons, car, dans cette indication, les taux d'implantation sont élevés et le risque de grossesse multiple important. Il est aussi nécessaire d'insister sur l'importance de mettre en place des procédures permettant de garantir l'anonymat entre donneuses et receveuses.

Lexique

AMP : assistance médicale à la procréation.

CCPPRB : comité consultatif de protection des personnes pour la recherche biomédicale.

CMV : cytomégalo virus.

CNIL : Commission nationale Informatique et liberté.

CNMBRDP : Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.

CSP : code de la santé publique.

FIV : fécondation in vitro.

FIV-D : fécondation in vitro avec gamètes de donneur (spermatozoïdes ou ovocytes).

FIVETE : fécondation in vitro et transfert embryonnaire.
FSH : Follicle Stimulating Hormone.
HTLV : Human T-cell Lymphoma Virus.
IAC : insémination artificielle avec sperme de conjoint.
IAD : insémination artificielle avec sperme de donneur.
ICSI : Intracytoplasmic Sperm Injection (micro-injection).
IGG : immunoglobuline G.
IGM : immunoglobuline M.
LH : Luteinizing Hormone.
LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone.
PVP : polyvinylpyrrolidone.
VIH : virus de l'immunodéficience acquise humaine.

VASECTOMIE

Dr Eric HUYGHE

Service d'Urologie Andrologie, Hôpital Paule de Viguière, Toulouse

1. INTRODUCTION

La contraception est une préoccupation majeure en santé publique. Jusqu'à ce jour, elle est majoritairement confiée à la femme, bien qu'il existe un large éventail de méthodes de contraception masculines [1]. Parmi les différentes possibilités de contraception masculine, le canal déférent est un organe cible, puisqu'il est indispensable à l'acheminement des spermatozoïdes, et que son interruption ne retentit pas sur le fonctionnement des organes de voisinage. La vasectomie est une intervention pratiquée à très large échelle dans certains pays notamment en Asie (Chine, Inde), et en Amérique du Nord. En France, la législation a évolué, permettant sa réalisation et précisant son cadre réglementaire. Cette revue résume la littérature disponible sur les méthodes chirurgicales déférentielles à visée contraceptives existantes et les voies de recherche en évaluant les résultats et la tolérance de chacune.

2. TECHNIQUE DE VASECTOMIE

La vasectomie consiste à isoler le déférent chirurgicalement, à le couper puis à le coaguler et / ou à l'occlure. La vasectomie est une méthode très efficace et relativement peu onéreuse pour prévenir la grossesse de manière permanente (stérilisation) [2]. La vasectomie reste l'une des méthodes contraceptives les plus utilisées dans le monde. L'évolution de la loi française va certainement contribuer à rendre la vasectomie plus populaire. Cependant sa réversibilité reste hypothétique. La présence de la vasectomie dans cet article ne doit pas faire oublier que la vasectomie est avant toute une technique de stérilisation et non de contraception puisque par définition la contraception implique un retour à la fertilité lorsque le couple le désire.[3]

Rappel de la technique classique de vasectomie

A ce jour, l'excision avec ligature reste la méthode la plus commune de vasectomie. Il est conseillé d'exciser une petite longueur de déférent pour diminuer les chances de reperméabilisation, et de demander une analyse anatomo-pathologique. L'interposition de tissus (soit par une enveloppe du déférent lui-même, soit par un tissu conjonctif adjacent) entre les 2 extrémités du déférent, est largement utilisée en association avec une technique d'occlusion pour diminuer le risque de reperméabilisation. D'après les résultats d'une étude randomisée contrôlée récente [4] les résultats de la vasectomie sont améliorés par l'enfouissement de l'extrémité du déférent. Certains proposent de

laisser une extrémité testiculaire du déférent non liée afin de minimiser la pression d'amont et diminuer l'atteinte de l'épididyme [5]. Par ailleurs, certains chirurgiens ont proposé l'irrigation de l'extrémité distale par de l'eau stérile ou par une solution spermicide pendant la vasectomie pour faciliter la vidange de la réserve de spermatozoïdes dans l'extrémité distale du déférent [6,7]. Cependant ces études n'ont démontré aucune réduction du temps avant azoospermie ni d'amélioration des résultats avec l'irrigation déférentielle [7,8] quelle que soit la nature du liquide utilisé (eau stérile, solution spermicide) pour le lavage déférentiel [6].

Efficacité

L'échec de la vasectomie (défini par une absence d'azoospermie ou la survenue d'une grossesse) survient dans moins d'1 % des cas, faisant de la vasectomie l'une des méthodes de stérilisation les plus fiables. [9,10] Les taux de grossesses après vasectomie sont approximativement de 1/800. Les trois causes d'échec sont :

(1) l'existence de rapports non protégés avant que le sperme n'ait été stérilisé. Le patient doit être informé de ce risque et de la nécessité de réaliser des spermogrammes jusqu'à obtention d'une azoospermie. Après vasectomie, il est souvent nécessaire d'attendre 20 éjaculats pour voir disparaître les spermatozoïdes de l'éjaculation. [11] La réalisation d'un spermogramme de contrôle post- chirurgie est donc nécessaire pour s'assurer du succès de la procédure.

(2) le non respect de la procédure chirurgicale : Les taux d'échec sont généralement plus bas quand la vasectomie est réalisée par un chirurgien expérimenté [12]. En cas d'échec, l'examen anatomopathologique permet d'attester que les 2 déférents ont bien été sectionnés

(3) la reperméabilisation spontanée précoce ou tardive du déférent.

L'occlusion du déférent, est associée à la production d'anticorps anti-spermatozoïdes et à la formation de granulomes spermatiques (réactions inflammatoires secondaires à la fuite de spermatozoïdes du tractus génital vers les tissus environnants) limitent les chances de succès des chirurgies reconstructrices [13].

Complications

Les complications précoces (hématome, infection, granulome, orchépididymite, épididymite congestive) surviennent dans 1-6 % des cas [10,12,14] avec moins de 3 % de cas nécessitant une consultation médicale [2]. Les complications les plus fréquentes sont : hématome, saignements, infection, douleur aiguë ou chronique et épididymite congestive [9].

Risque

Une revue systématique de la littérature publiée en 1998 n'a pas retrouvé d'association entre la vasectomie et le cancer de la prostate [15]. Ce résultat a été confirmé par une étude cas témoin portant sur 753 cancers de prostate et 703 contrôles (OR=1.10 ; 95 % CI, 0,9 -- 1,4) [16].

Indications

La vasectomie devrait être recommandée à des couples désirant une « contraception » permanente et non réversible. Comparée à la ligature tubaire bilatérale, la vasectomie expose à moins de complications graves, et est moins onéreuse. La vasectomie devrait donc être préférée à la ligature tubaire bilatérale dans la majorité des cas. De plus, après vasectomie, la quantité de sperme éjaculé n'est pas diminuée car la sécrétion de la prostate et des vésicules séminales n'est pas modifiée.

Variante technique : la vasectomie sans scalpel.

La vasectomie sans scalpel est une technique particulière de vasectomie. D'après Douglas Huber, "si la vasectomie peut être accomplie avec une chirurgie mini invasive, alors les chirurgiens devraient justifier pourquoi plus est nécessaire" [17,18].

La vasectomie sans scalpel a été initialement développée en Chine où elle a été appliquée à plus de 10 millions d'hommes dans la province du Sichuan depuis son introduction en 1974 [17,19]. Après la Chine, d'autres pays asiatiques (Thaïlande, Sri Lanka, Népal, Japon), et ailleurs dans le monde (États-Unis, Europe) ont développé cette technique [20,21].

La technique consiste à amener le déférent sous la peau à l'aide d'une pince spécifiquement développée pour cette chirurgie sous anesthésie locale. La peau et les tuniques du déférent sont ensuite écartées à l'aide d'une pince dotée de pointes acérées, permettant la dissection du déférent qui est alors extrait par cette incision avant d'être lié et sectionné. Dans la technique de vasectomie sans scalpel, les deux déférents peuvent être extraits par la même incision (sur la ligne médiane) [19].

Cette technique donnerait une efficacité comparable à la vasectomie classique. En terme de complication, elle serait associée à une diminution du risque d'hématome.

La courbe d'apprentissage de cette technique est relativement longue (15 à 20 procédures) [22].

La technique sans scalpel peut également être utilisée pour extérioriser le déférent afin d'appliquer d'une autre méthode [23].

3. STERILISATION CONTRACEPTIVE CHEZ LES MAJEURS CAPABLES : EVOLUTION DE LA LOI

Avant 1994, il n'y avait pas de loi spécifique régissant la pratique de la stérilisation, mais l'interprétation des textes généraux du droit pénal français amenait à conclure qu'une intervention aux conséquences stérilisantes n'était admise que dans le cadre d'une nécessité thérapeutique. La stérilisation n'était donc pas licite et sanctionnée par la loi comme un délit de "violences entraînant une mutilation ou une infirmité permanente" (article 222-9 du Nouveau Code Pénal) dans la mesure où

elle constitue une atteinte corporelle anatomique entraînant la perte définitive de la capacité de se reproduire.

La vasectomie ne peut être considérée comme une méthode contraceptive en raison du caractère inconstant du succès de la vaso-vasostomie et du caractère palliatif des possibilités d'assistance médicale à la procréation.

La loi de bioéthique du 29 juillet 1994 a introduit un article au Code civil (art. 16-3), modifié par la loi CMU du 27 juillet 1999 : Elle n'a pas levé l'interdiction de la stérilisation contraceptive, mais le terme médical y est substitué au terme thérapeutique. Le nouveau texte laissait donc une plus grande liberté au médecin pour apprécier la raison de santé.

La loi n°2001-588 du 4 juillet 2001 relative à la contraception a complètement changé la philosophie de la stérilisation contraceptive. La ligature des trompes et des canaux déférents peut désormais être pratiquée sur une personne majeure exprimant une volonté libre, motivée et délibérée. Cette volonté requiert une information claire et complète sur les conséquences de l'opération envisagée. L'acte chirurgical ne peut être pratiqué que dans un établissement de santé et après expiration d'un délai de réflexion de quatre mois. Au cours de la première consultation, le médecin devra informer le patient des risques médicaux qu'il encourt et des conséquences de l'opération. Après réflexion, l'intéressé devra signer une fiche de consentement. (art. L.2123-1 Code de santé publique)

4. CONCLUSION

La vasectomie reste la seule technique chirurgicale déférentielle validée. Bien que les techniques microchirurgicales reconstructrices aient permis d'améliorer le taux de reperméabilisation, la vasectomie doit être considérée comme une méthode de stérilisation (définitive).

Les autres techniques chirurgicales du déférent à visée contraceptives (réversibles) n'ont pas donné les garanties nécessaires à leur utilisation en dehors de protocoles.

D'un point de vue légal, depuis la réforme relative aux chirurgies stérilisantes contenue dans l'article L2123-1 du code de la Santé Publique, la réalisation de la vasectomie est autorisée dans un cadre réglementaire.

REFERENCES

1. Lobel B, Le Lannou D, Olivo JF. Contraception masculine. *Prog Urol* 1991;1(5):920-4.
2. The family planning methods. *People Count* 1992;2(10):1-3.
3. Hendrix NW, Chauhan SP, Morrison JC. Sterilization and its consequences. *Obstet Gynecol Surv* 1999;54(12):766-77.
4. Chen-Mok M, Bangdiwala SI, Dominik R, et al. Termination of a randomized controlled trial of two vasectomy techniques. *Control Clin Trials* 2003;24(1):78-84.
5. Errey BB, Edwards IS. Open-ended vasectomy: an assessment. *Fertil Steril* 1986;45(6):843-6.
6. Gandrup P, Berthelsen JG, Nielsen OS. Irrigation during vasectomy: a comparison between sterile water and the spermicide euflavine. *J Urol* 1982;127(1):60-1.
7. Mason RG, Dodds L, Swami SK. Sterile water irrigation of the distal vas deferens at vasectomy: does it accelerate clearance of sperm? A prospective randomized trial. *Urology* 2002;59(3):424-7.
8. Pearce I, Adeyoju A, Bhatt RI, et al. The effect of perioperative distal vasal lavage on subsequent semen analysis after vasectomy: a prospective randomized controlled trial. *BJU Int* 2002;90(3):282-5.
9. Royal College of Obstetricians G. male and female Sterilisation. Evidence-based guidelines N°4. London: RCOG press, 1999.
10. Hendry WF. Vasectomy and vasectomy reversal. *Br J Urol* 1994;73(4):337-44.
11. Barone MA, Nazerali H, Cortes M, et al. A prospective study of time and number of ejaculations to azoospermia after vasectomy by ligation and excision. *J Urol* 2003;170(3):892-6.
12. Schwingl PJ, Guess HA. Safety and effectiveness of vasectomy. *Fertil Steril* 2000;73(5):923-36.
13. Herr JC, Howards SS, Spell DR, et al. The influence of vasovasostomy on antisperm antibodies in rats. *Biol Reprod* 1989;40(2):353-60.

14. van der Spoel AC, Jeyakumar M, Butters TD, et al. Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: a nonhormonal approach to male contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17173-8.
15. Bernal-Delgado E, Latour-Perez J, Pradas-Arnal F, Gomez-Lopez LI. The association between vasectomy and prostate cancer: a systematic review of the literature. *Fertil Steril* 1998;70(2):191-200.
16. Stanford JL, Wicklund KG, McKnight B, et al. Vasectomy and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(10):881-6.
17. Huber DH. A short history of no-scalpel vasectomy. *AVSC News* 1988;26(1):1,3.
18. Martinez-Manautou J, Hernandez D, Alarcon F, Correu S. Introduction of non-scalpel vasectomy at the Mexican Social Security Institute. *Adv Contracept* 1991;7(2-3):193-201.
19. Huber DH. The no-scalpel vasectomy: a new technique. *AVSC News* 1988;26(1):1,2.
20. Huber D. No-scalpel vasectomy: the transfer of a refined surgical technique from China to other countries. *Adv Contracept* 1989;5(4):217-8.
21. Nirapathpongporn A, Huber DH, Krieger JN. No-scalpel vasectomy at the King's birthday vasectomy festival. *Lancet* 1990;335(8694):894-5.
22. Arellano Lara S, Gonzalez Barrera JL, Hernandez Ono A, et al. No-scalpel vasectomy: review of the first 1,000 cases in a family medicine unit. *Arch Med Res* 1997;28(4):517-22.
23. Burket-picolino A, Costa FJ. No-scalpel vasectomy (NSV) procedure and nursing care. *J Urol Nurs* 1992;11(2):83-92.