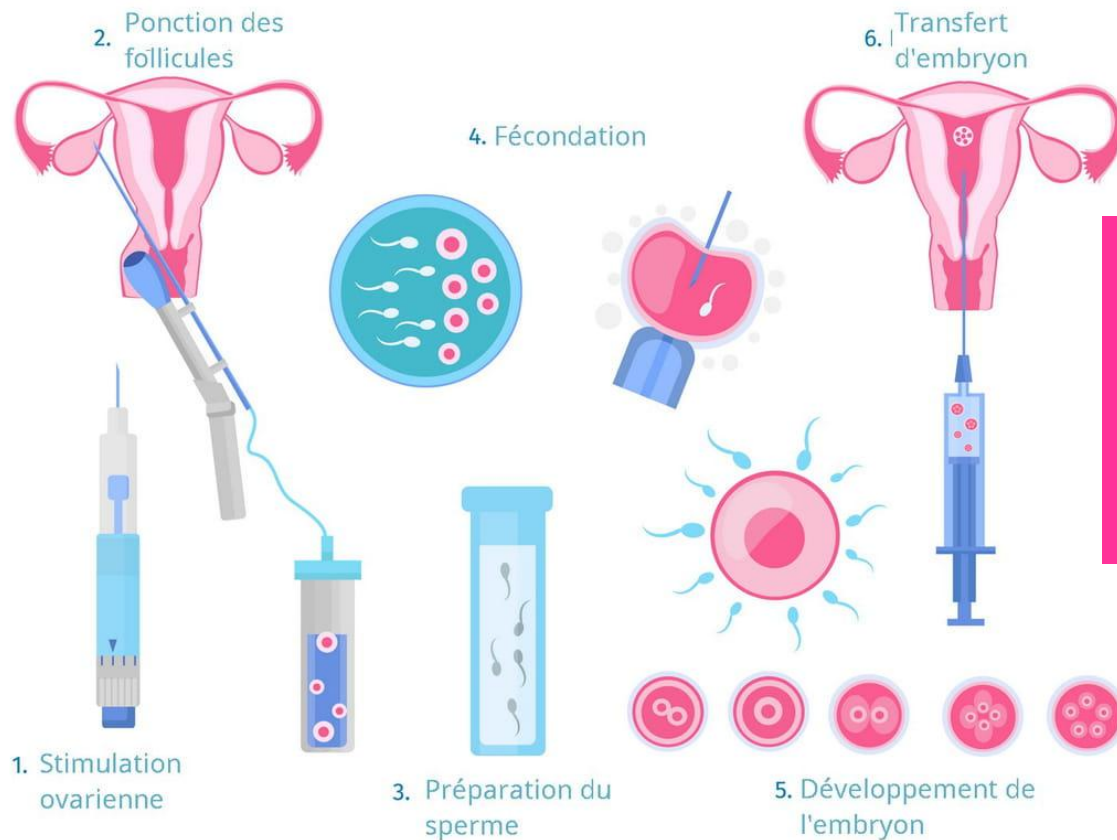


Généralités sur l'assistance médicale à la procréation

Fécondation In Vitro



Pr Sadjia Bouzid
EPH Hassen Badi
Cours graduation 5eme année

24 NOVEMBRE 2021

Généralités - Introduction

- L' Assistance Médicale à la Procréation (AMP) consiste à reproduire en laboratoire une partie des processus naturels de la fécondation et du développement embryonnaire précoce.

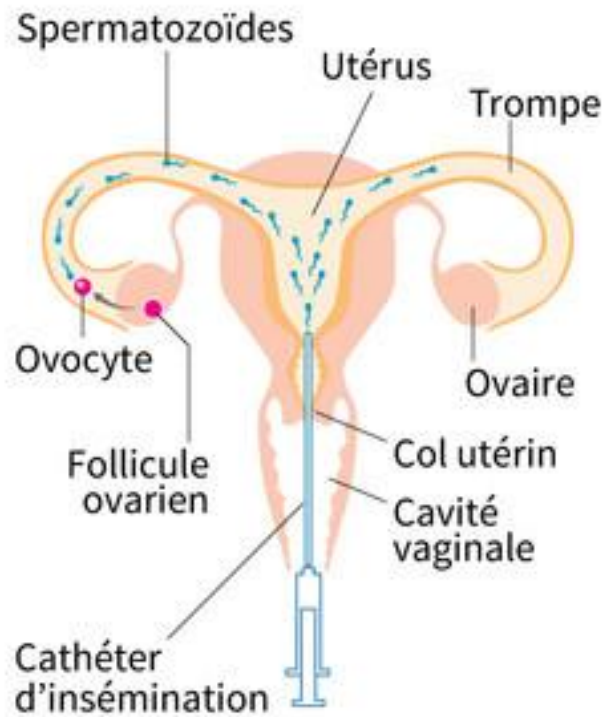
(la fécondation est dissociée du rapport sexuel).

- Comprend toutes les techniques médicales et biologiques avec manipulation des gamètes en vue d'obtenir une grossesse.
- Ces techniques sont proposées pour la prise en charge
 - des couples infertiles,
 - mais également pour empêcher la transmission de pathologies de particulière gravité à l'enfant ou à l'autre membre du couple.
- Actuellement, les techniques d'AMP ont fait leurs preuves mais elles restent une épreuve tant physique que psychologique pour chaque couple.

Fécondation In Vitro

Insémination artificielle

Introduire artificiellement le sperme dans la cavité utérine de la femme



2. Ponction des follicules



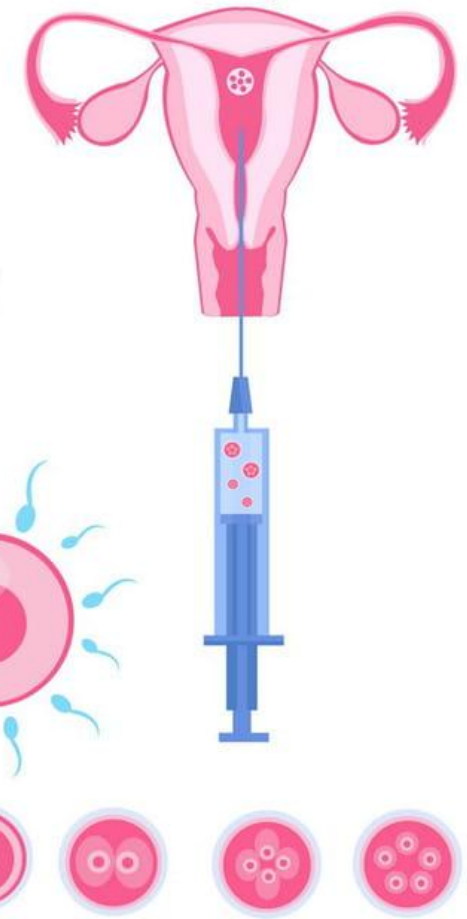
1. Stimulation ovarienne

4. Fécondation



3. Préparation du sperme

6. Transfert d'embryon



5. Développement de l'embryon

- Les techniques d'AMP incluent:
 - les inséminations artificielles (inséminations intra-utérines [IIU]), IIC GIFT
 - la fécondation in vitro (FIV)
 - avec ou sans micro-injection de spermatozoïdes (*intracytoplasmic sperm injection* [ICSI])
 - et les transferts d'embryons.

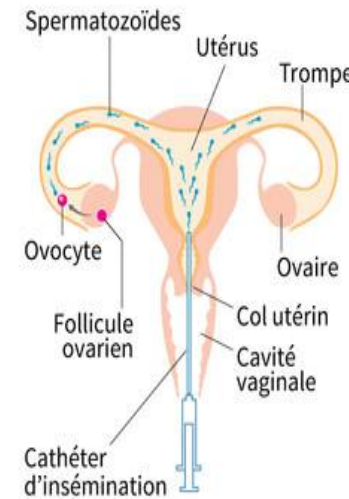


- Toutes ces techniques peuvent être réalisées avec:

- les gamètes du couple → AMP intraconjugale
- les gamètes de donneurs →
 - dons d'ovules
 - ou de spermatozoïdes,
 - dons d'embryon

Insémination artificielle

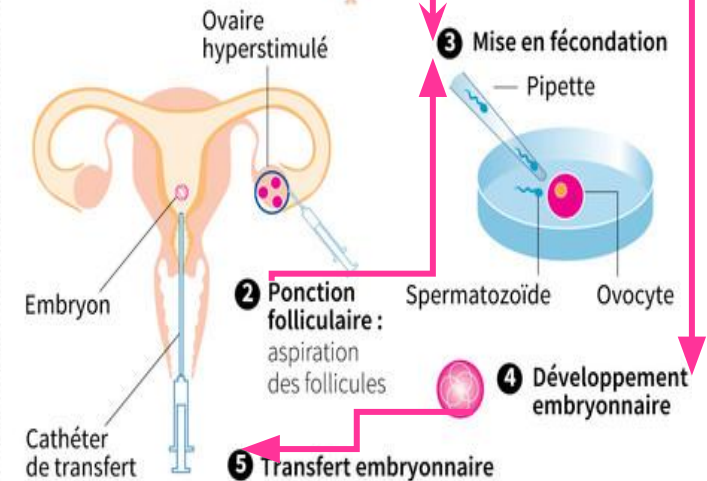
Introduire artificiellement le sperme dans la cavité utérine de la femme



Fécondation in vitro (FIV)

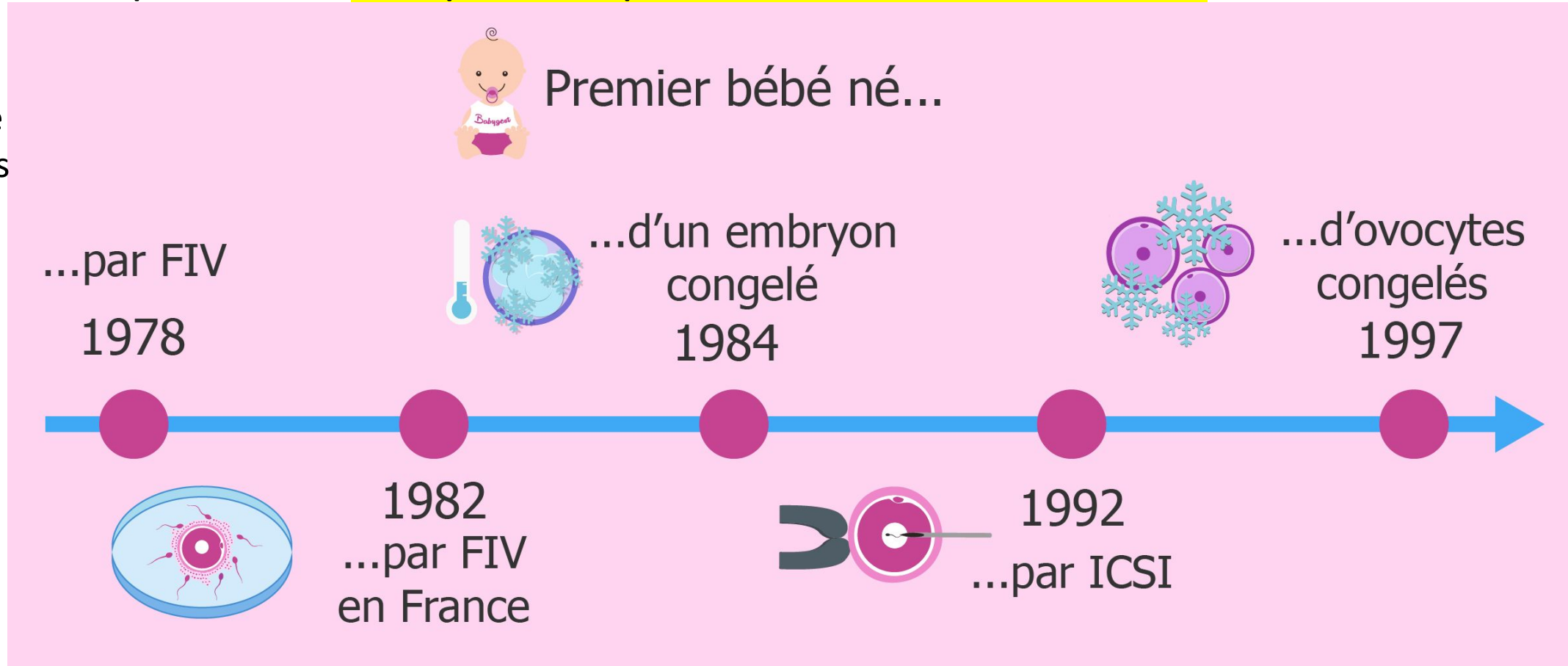
1 Stimulation :

Maturation des follicules par injections hormonales



- L'aide à la procréation existait avant l'AMP proprement dite puisque les premières inséminations recensées remontent au tout début du xix^e siècle.
- La création des premières banques de sperme dans les années 1970

L'évolution des techniques a été marquée par des étapes fondamentales telles que la congélation embryonnaire (1984) puis la vitrification des ovocytes et des embryons



La naissance du premier enfant conçu par FIV en 1978 en Grande-Bretagne puis en 1982 en France

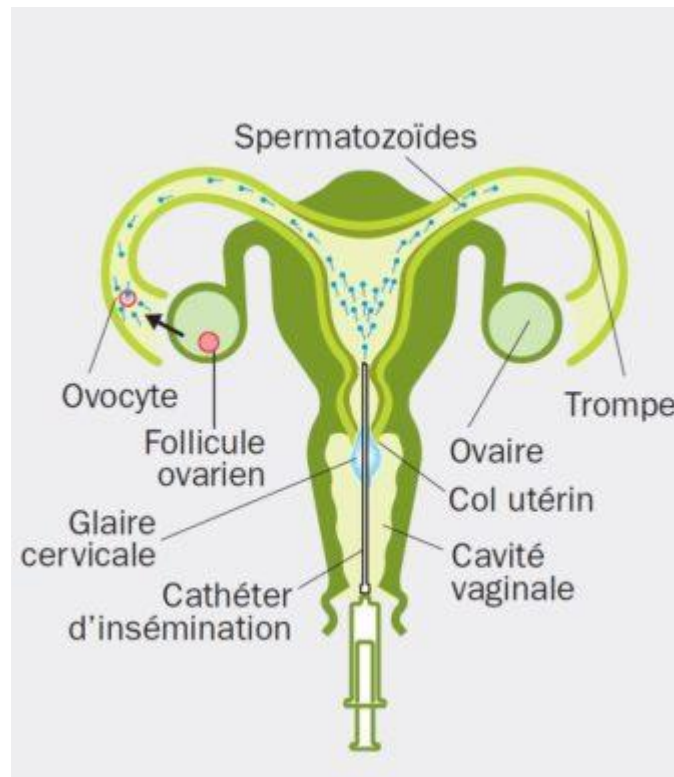
Ainsi que la première naissance après ICSI en 1994 ont ouvert de nouvelles voies et options thérapeutiques pour les couples infertiles.

- Pour toute prise en charge en AMP, le couple doit
 - confirmer avoir été informé des techniques,
- Pour chacun des membres du couple, il convient de vérifier les sérologies:
 - (VIH),
 - virus de l'hépatite B [VHB],
 - virus de l'hépatite C [VHC],
 - [TPHA-VDRL] *Treponema pallidum haemagglutination assay - venereal disease research laboratory*
- Ces sérologies, doivent dater de moins de 3 mois pour toute première tentative puis de moins de 12 mois pour les tentatives ultérieures
- Des prélèvements bactériologiques (vaginal et spermoculture)

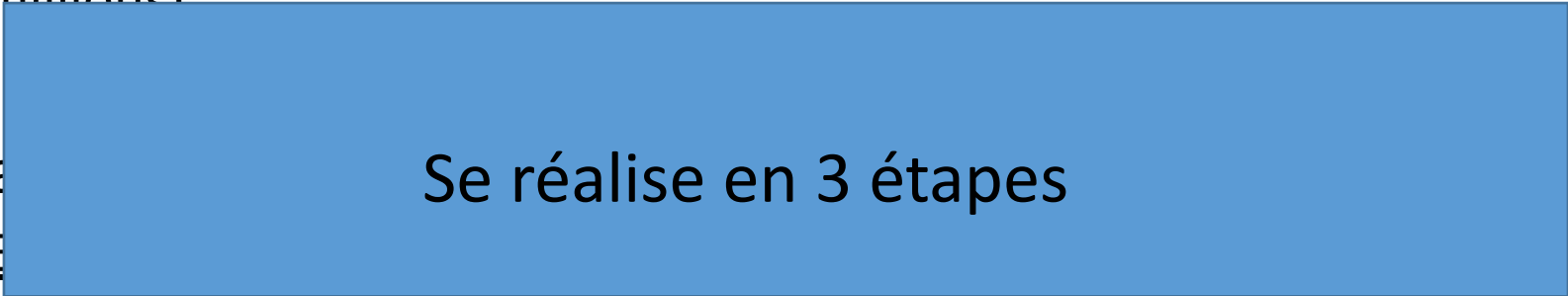
Insémination artificielle



- L'insémination artificielle est une méthode d'aide à la fécondation « in vivo » qui consiste à :
 - introduire au moment de l'ovulation de façon instrumentale dans le tractus génital (intra-cervical ou intra-utérin) des spz sélectionnés
 - La pratique de l'insémination intra-cervicale a quasiment disparu, au profit de l'IUI



Indications

- L'IIU n'est réalisable que si :
 - au moins une des trompes est perméable
 - et si les paramètres spermatiques sont compatibles (≥ 1 million de spz mobiles récupérables dans l'éjaculat après le test de migration survie [TMS] et au mieux > 5 millions)
- En pratique, l'IIU  se réalise en 3 étapes
 1. En cas de dysfonctionnement des trompes (après échec des stimulations simples) : l'IIU n'est pas réalisable, on passe alors à la FIV, à moins qu'aucune pathologie ovulatoire, spermatique ou tubaire majeure n'a été mise en évidence)
 2. En cas de dysovulation après échec des stimulations simples
 3. Les causes cervicales d'infertilité, majoritairement post-chirurgicales (conisation,)
 4. Des pathologies spermatiques mineures, corrigées par le TMS)
 5. Pour contrôler le risque de transmission du virus au conjoint (VIH, du VHB ou du VHC)
 6. L'absence de rapports sexuels (discutée) pour toute raison physique ou psychique, mais dans ce cas des auto-inséminations intra-vaginales peuvent être proposées dans un premier temps

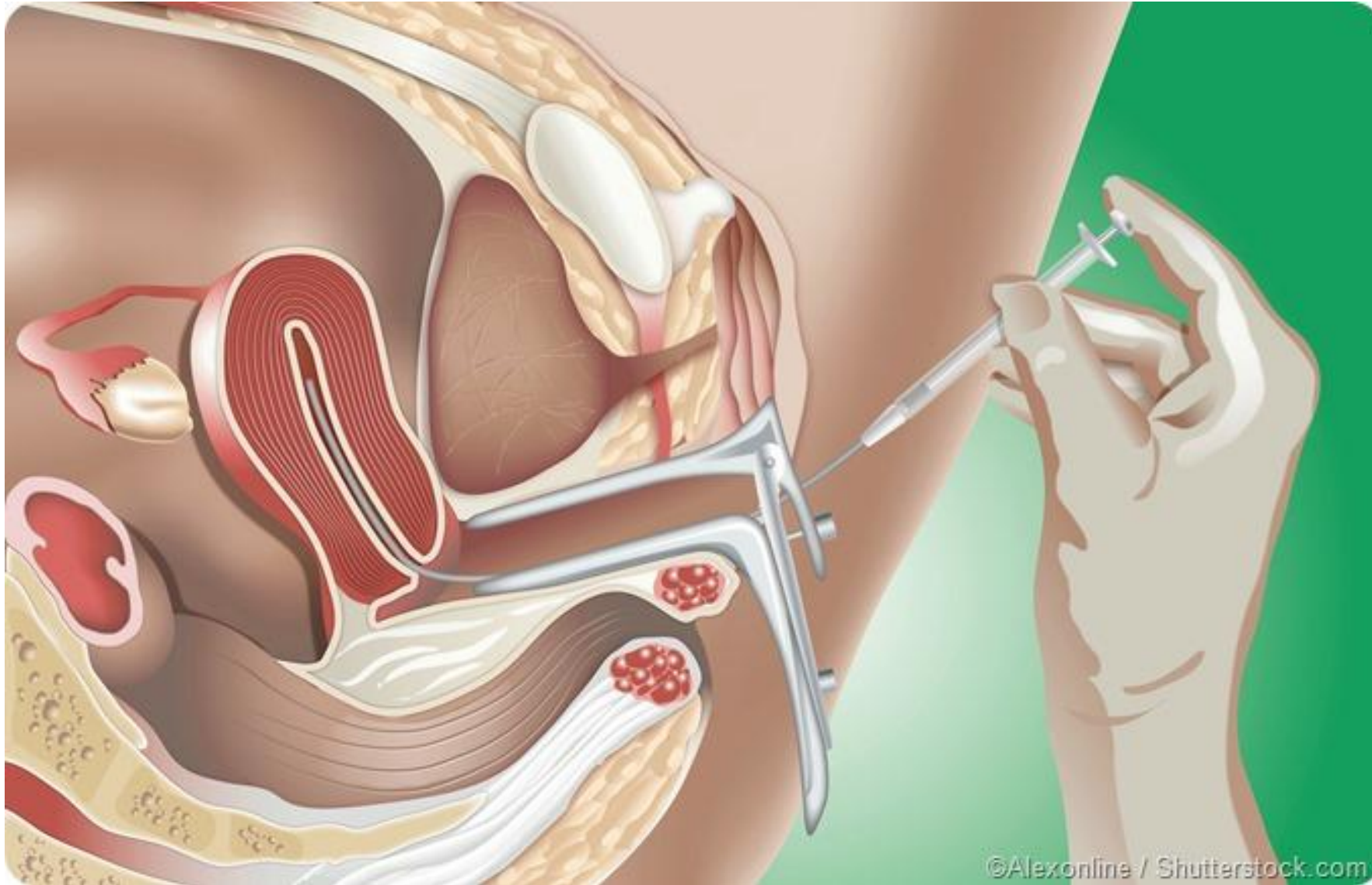
1.Stimulation ovarienne

- L'IIU en cycle spontané \Rightarrow 2 indications mécaniques :
 - l'infertilité cervicale isolée ou
 - l'impossibilité d'avoir des rapports sexuels complets.
- Dans tous les autres cas, elle donne de meilleurs résultats associée à une stimulation ovarienne .
 - La stimulation ovarienne a pour but de soutenir la croissance folliculaire pour obtenir un follicule mature, et d'optimiser le timing de la rencontre ovule/spz
 - Les inducteurs de l'ovulation peuvent être utilisés pour la réalisation de la stimulation en vue d'IIU.(antiestrogènes – gonadotrophines)
 - HCG induction pdite ovulation 36h avant IIU

2.Préparation spermatique

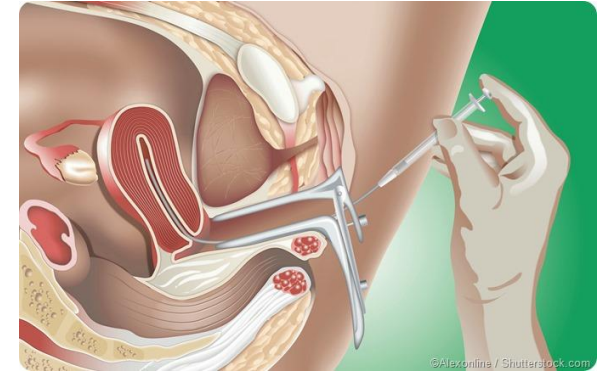
- Une préparation du sperme est réalisée **le matin de l'insémination** dans un laboratoire de biologie de la reproduction agréé, et non à domicile.
- Après recueil du sperme, celui-ci est préparé pour **ne récupérer que des spz sélectionnés (mobiles, vivants)** replacés dans un **faible volume** de milieu de culture stérile (0,2 à 0,3 ml environ).
- L'ensemble est **centrifugé** et le culot, qui contient les spz les + mobiles et donc **potentiellement les plus féconds**, est récupéré puis à nouveau centrifugé pour lavage dans le milieu de culture.
- Il est nécessaire d'avoir **au minimum 1 million de spz** sélectionnés pour pouvoir réaliser l'IU.
- En dessous de ce seuil, il est recommandé, selon le guide de bonnes pratiques, de ne pas réaliser l'IU, car elle n'offrirait que de faibles chances de grossesse

3. Réalisation de l'IU



3. Réalisation de l'IIU

- Elle peut être effectuée entre 16 h et 40 h après le déclenchement de l'ovulation par l'injection d'hCG).
 - Le geste d'IIU est indolore.
 - La femme installée en position gynécologique,
 - après la pose du spéculum,
 - le col est nettoyé à l'eau stérile
 - puis la préparation de spz est déposée dans la cavité utérine après franchissement du col utérin à l'aide d'un fin cathéter introduit jusqu'au milieu de la cavité utérine.
- Une échographie est parfois réalisée en parallèle pour guider le geste
- Après l'IIU, un soutien de phase lutéale par progestérone administrée par voie vaginale est souvent prescrit.



Fécondation in vitro dite « classique » et fécondation in vitro avec injection intra-cytoplasmique du spermatozo



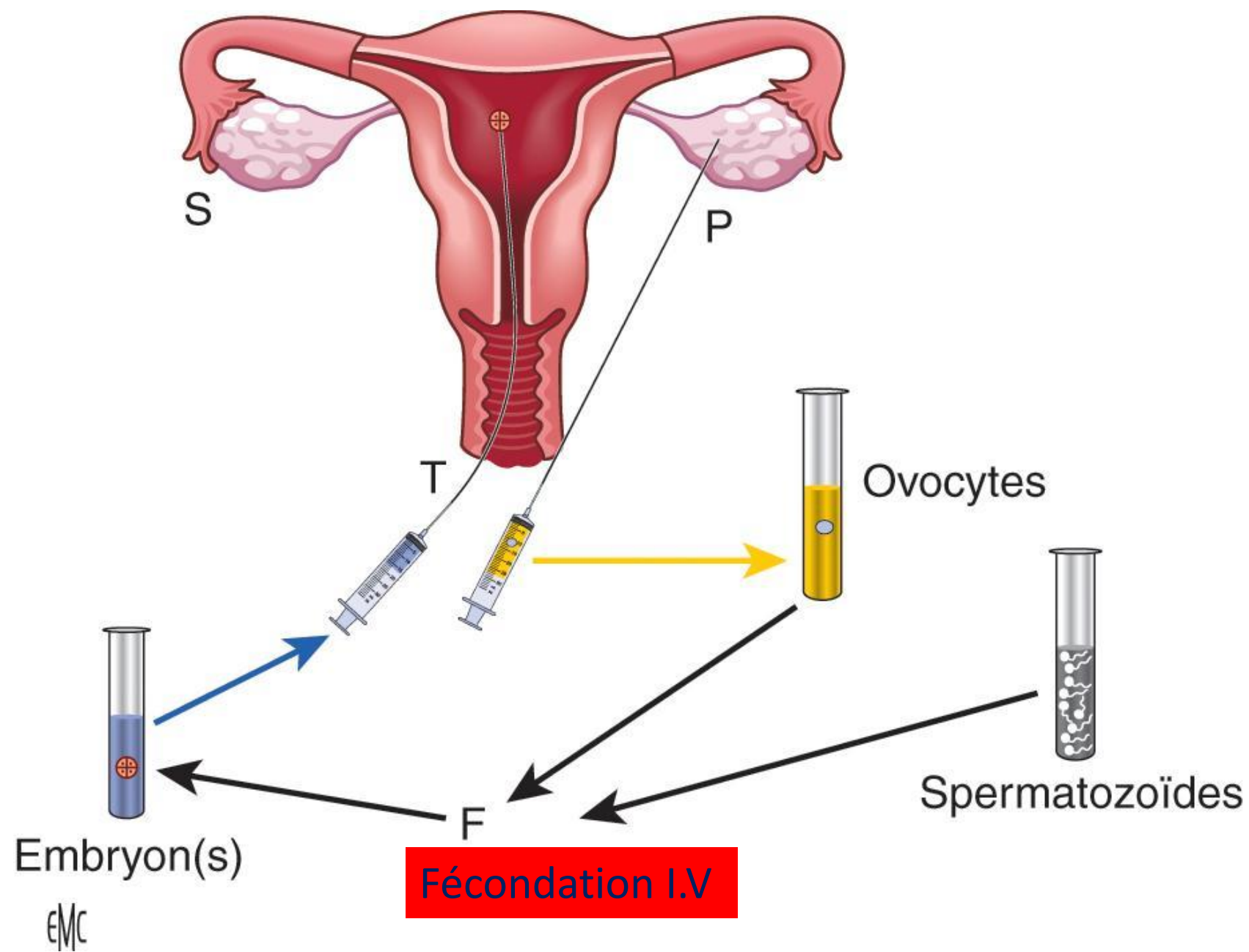
- La FIV permet la mise en présence des gamètes mâle et femelle en dehors de l'appareil génital féminin.
- La FIV « classique » consiste en l'insémination simple in vitro des ovocytes avec les spz sélectionnés du conjoint.
- La FIV avec ICSI comprend une étape supplémentaire de manipulation gamétique avec décoronisation des ovocytes recueillis et injection à l'aide d'une micropipette d'un spz sélectionné dans chaque ovocyte mature



Indications

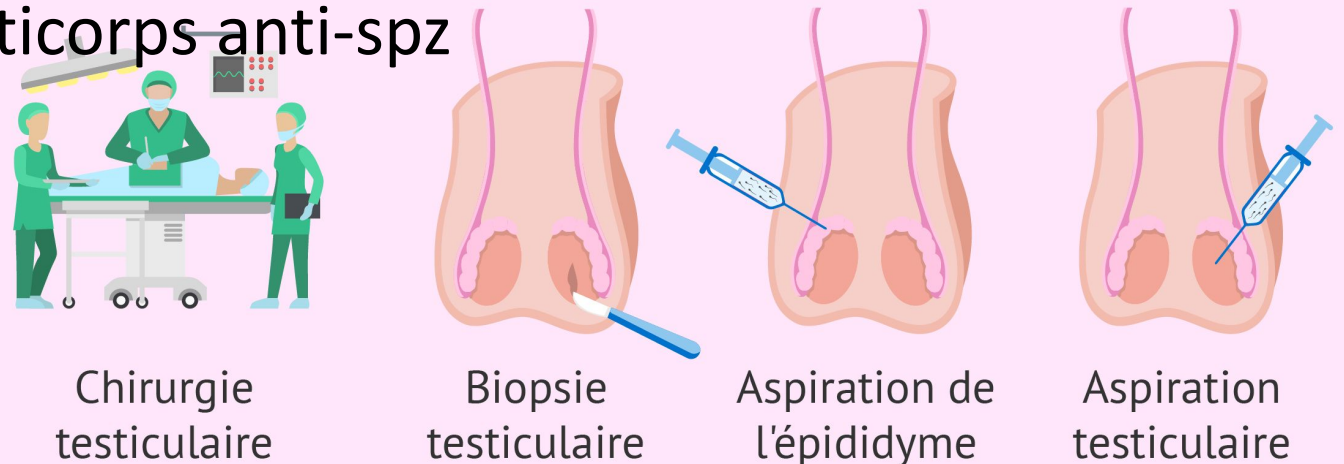
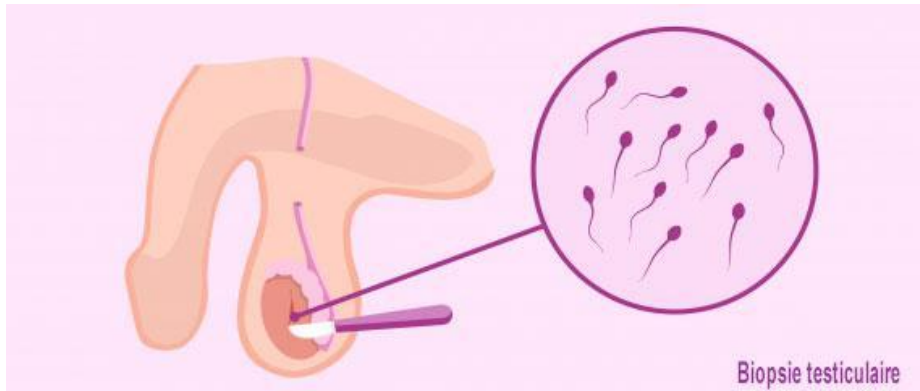
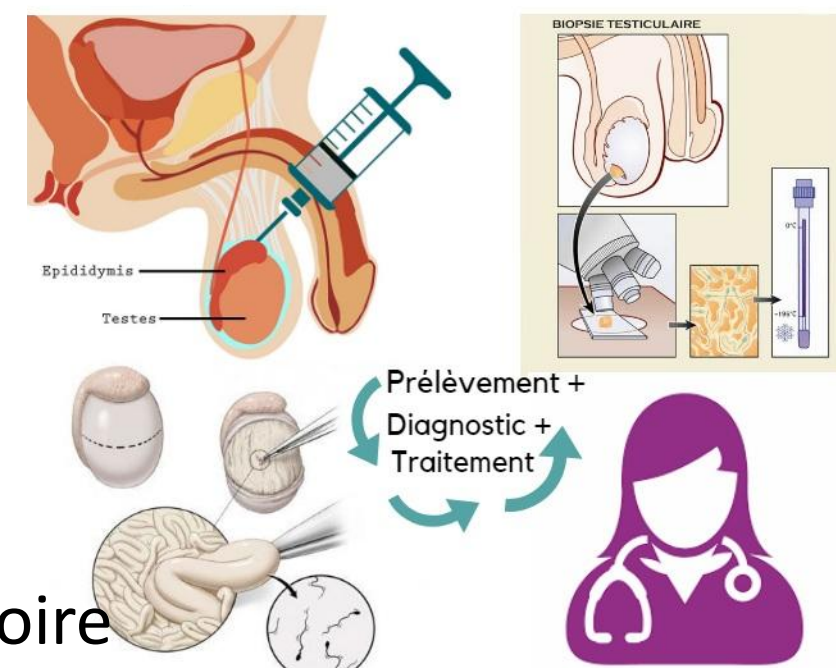
Les principales indications d'une FIV sont :

- une altération ou obstruction tubaire bilatérale non curable ou après échec de plastie tubaire,
- l'endométriose modérée à sévère,
- les échecs d'IIU quelle qu'en soit l'indication initiale
- ou les échecs de stimulations simples pour hyper-réponse



L'ICSI est indiquée en cas

- d'altérations spermatiques :
 - oligo-asthéo-térato-spermie (OATS)
 - ou en cas d'azoospermie excrétoire ou sécrétoire
lorsque des spz ont pu être récupérés lors d'une biopsie testiculaire ou d'une ponction épидидymaire ou déférentielle.
- en cas d'échec de FIV
- ou en cas de présence d'anticorps anti-spz



- En dehors de ces indications, de nombreux travaux indiquent que l'ICSI n'apporte pas de succès supplémentaire comparée à la FIV, notamment en cas de problématique tubaire ou d'âge féminin.
- Le caractère intrusif de l'ICSI qui implique une intervention humaine dans le choix du spz injecté, donc une transgression du hasard de la sélection spermatique par l'ovule, a été et est encore, quoique rarement, un objet de réticence des couples.
- Toutes les étapes du processus de FIV et de FIV-ICSI sont équivalentes hormis le processus de fécondation au laboratoire après décoronisation de l'ovocyte.

Stimulation ovarienne

- La première étape consiste à réaliser une hyperstimulation ovarienne contrôlée.
- Son but est de recruter plusieurs follicules de la cohorte prête en début de cycle afin d'en rendre plusieurs, et non un, dominants.

Les protocoles sont variés, mais ils comportent tous 3 principales étapes :

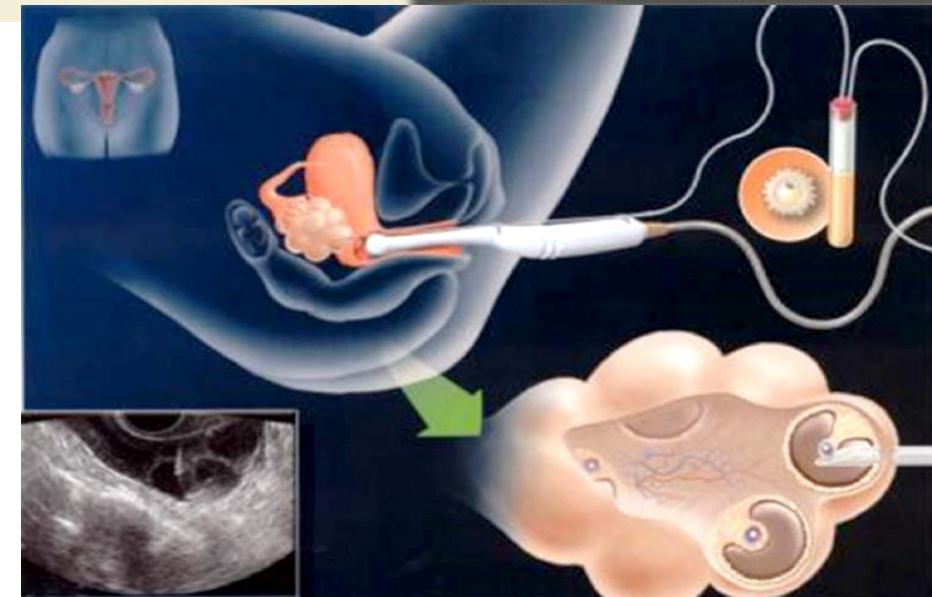
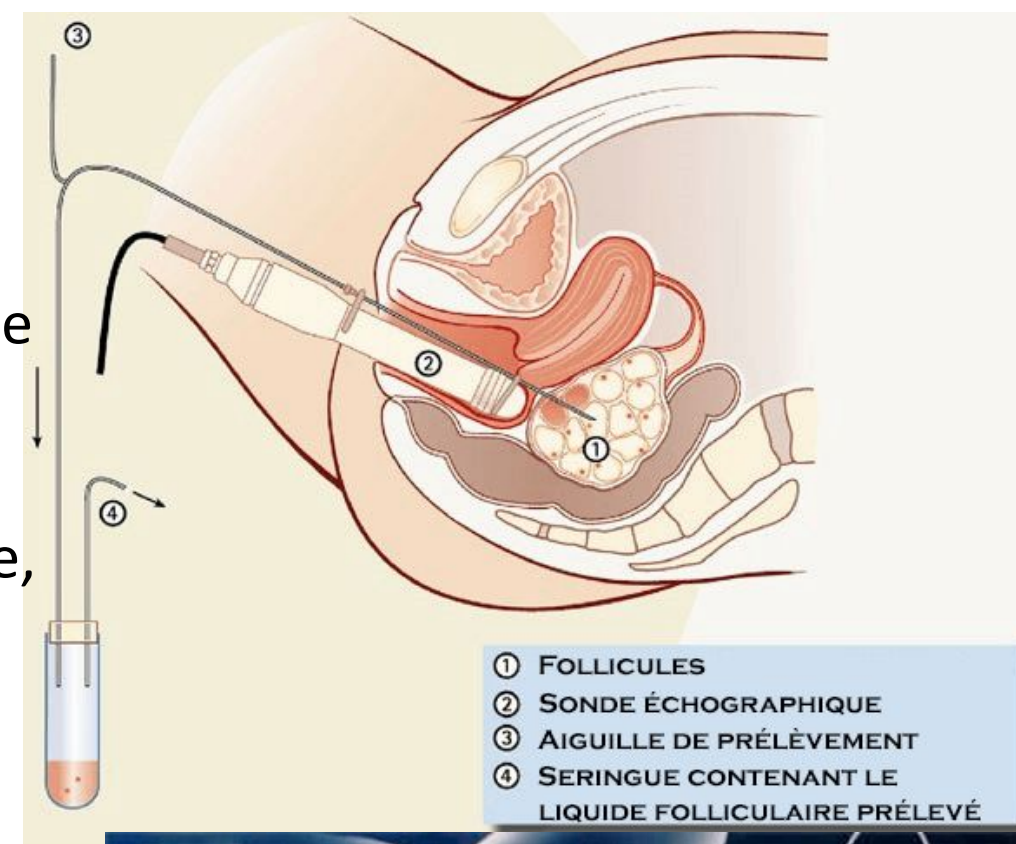
1. une étape de blocage de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (inhibition de l'ovulation spontanée),
2. une étape de stimulation ovarienne
3. une étape de maturation folliculaire et ovocytaire finale (ou déclenchement de l'ovulation).

- L'étape d'inhibition de l'ovulation est possible grâce à l'administration d'agonistes ou d'antagonistes de la *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH) (protocoles « agoniste » ou « antagoniste »),
- la stimulation de l'ovulation par l'injection de gonadotrophines (FSH \pm LH urinaires ou recombinantes)
- et le déclenchement de l'ovulation par administration, le plus classiquement, d'hCG.

- Les 2 protocoles les plus fréquemment utilisés sont:
 - le protocole « agoniste long »
 - et le protocole « antagoniste »
- Le protocole agoniste « court » utilise l'effet *flare-up* de l'agoniste préalable à l'effet désensibilisant. (est réservé aux femmes dont la réponse est présumée faible)

Ponction folliculaire

- La ponction folliculaire permet de récupérer les liquides folliculaires contenant les ovocytes, elle se fait actuellement par ponction échoguidée trans vaginale.
- Elle est réalisée au bloc op en conditions d'asepsie, s/AG, locale ou, de + en + fréquemment, s/ sédation.
- Après désinfection vaginale puis rinçage attentif des tissus préalablement aseptisés, le liquide folliculaire de chaque follicule est aspiré à l'aide d'une seringue ou d'une pompe, puis transmis immédiatement au laboratoire dans des tubes conservés à 37 °C.

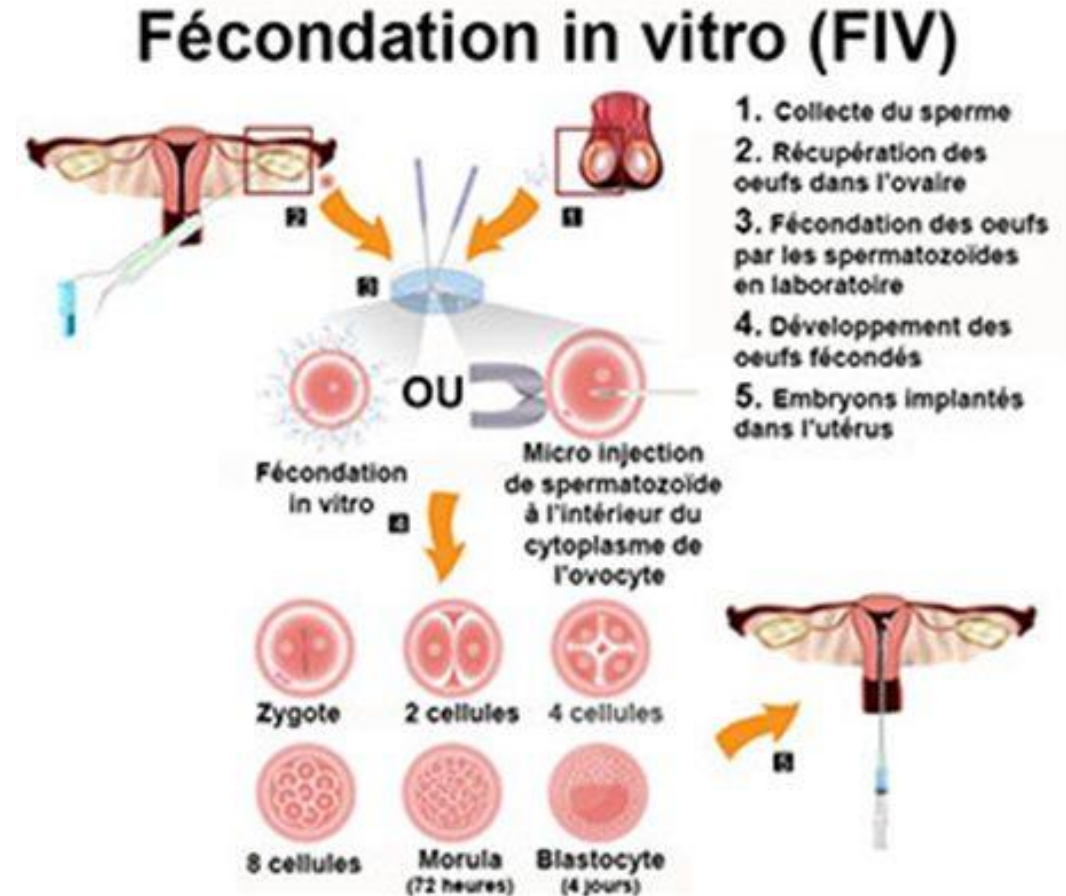


Traitement des ovocytes

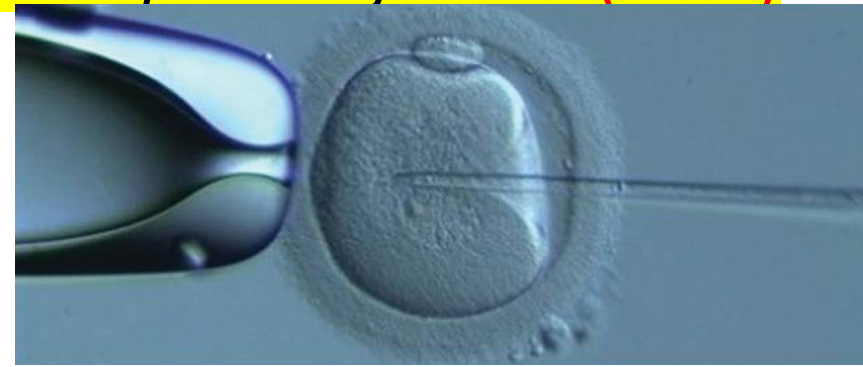
- Les liquides folliculaires recueillis sont transmis au laboratoire où les biologistes et les techniciens récupèrent les **complexes cumulo-ovocytaires** (CCO).
- En cas de FIV « classique », ce sont ces CCO qui seront mis en présence des spz sélectionnés sans pouvoir connaître le statut de maturité ovocytaire avant la mise en fécondation.
- En revanche, dans le cadre de l'ICSI, les ovocytes vont être préalablement **décoronisés** (débarrassés des cellules de la corona radiata) et seuls les ovocytes ayant expulsé leur premier globule polaire (**ovocyte « mature » ou en métaphase II de méiose**, donc « **fécondable** ») **seront injectés par un spz**

Traitement des spermatozoïdes

- Les spz sont le plus souvent issus du sperme du conjoint
- **Emis le jour de la ponction,**
- mais aussi issus de paillettes de spz préalablement congelées (après plusieurs recueils ou après biopsie testiculaire ou recueil épидидymaire ou déférentiel).



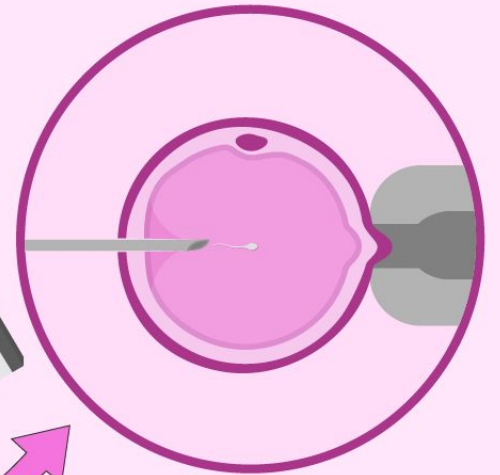
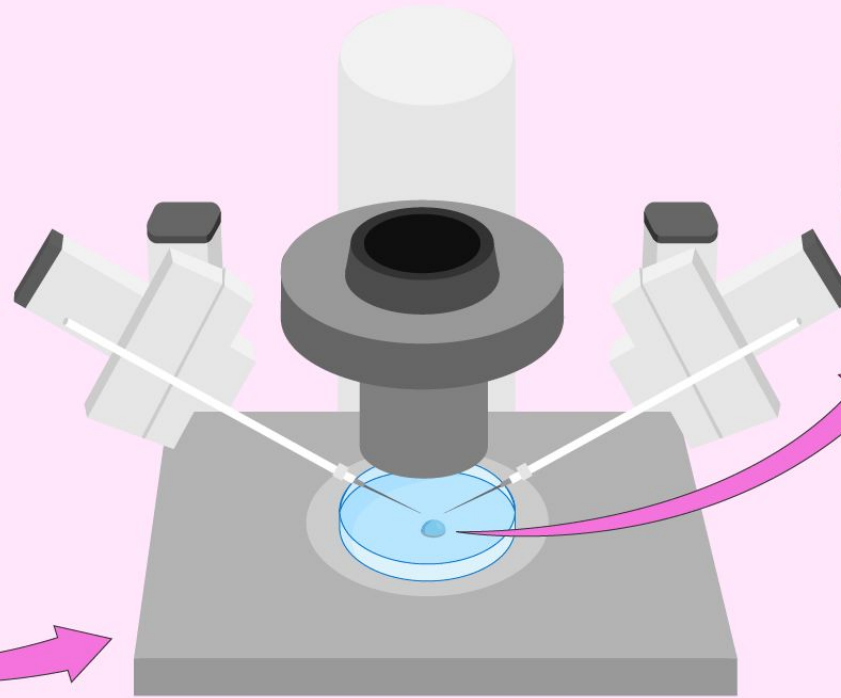
- La préparation des spz pour la FIV est la même que pour l'IIU (processus de sélection/centrifugation/lavage).
- En cas de **FIV « classique »**, on dépose **environ 5000 à 10 000 spz** mobiles par ovocyte recueilli.
- En cas d'**ICSI**, le processus de sélection spermatique peut être différent si le nombre de spz est trop faible.
 - Chaque ovocyte mature va être injecté, à l'aide d'une micropipette, par un spz sélectionné (spz vivant, si possible mobile et avec l'aspect le plus typique possible à un grossissement de $\times 400$).
- Une technique particulière de sélection de spz à plus fort grossissement que l'ICSI a été développée pour certains cas **d'échecs d'ICSI**,
- il s'agit de l' ***intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)*** (grossissement $\times 6000$)





Magnification
x6.000

Sélection du
spermatozoïde



Micro-injection

Culture in vitro des embryons

- Après insémination, les boîtes de culture, contenant les ovocytes dans un milieu de culture, sont placées dans une étuve à 37 °C avec une atmosphère adaptée.
- Une première observation des ovocytes a lieu 16 à 18 heures après la mise en fécondation.

- L'observation de **2 pronuclei** (mâle et femelle) et de 2 globules polaires signe la fécondation (**stade zygote, j1 du développement embryonnaire**) Cette étape permet de s'assurer de l'existence d'une fécondation et de la normalité de celle-ci.
- **Quarante-huit h** après la mise en fécondation (**j2** du développement embryonnaire), l'embryon possède habituellement **4 cellules** régulières et peu de fragments



- À **j3**, il possède **huit cellules**,
- à j4 il atteint le stade de **morula** avant **l'apparition progressive du blastocèle** avec la différenciation de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme qui signent la formation du **blastocyste** (**j5–j6**)
- L'éclosion du blastocyste après rupture de la zone pellucide a lieu classiquement **entre j6 - j7**

Congélation embryonnaire

- Le transfert embryonnaire peut avoir lieu soit au stade j2 ou j3, soit au stade de blastocyste. le diamètre de l'embryon est de 0,15 mm.
- Le choix du nombre d'embryons à transférer dépend de nombreux paramètres :
 1. du souhait du couple,
 2. de la patiente (âge, pathologies, rang de la tentative, antécédents médicaux, antécédents gynéco-obstétricaux, etc.)
 3. et de l'embryon (nombre de cellules, régularité cellulaire, pourcentage de fragments, cinétique de développement, etc.)

Transfert d'embryon

- Habituellement, 1 ou 2 embryons sont transférés.
- Dans la perspective de réduire le taux de grossesses multiples, une politique de transfert d'un embryon unique (*elective single embryo transfer* [eSET]) a été développée.
- Elle concerne les patientes
 - jeunes (< 35 ans) pour une première ou deuxième tentative
 - et lorsque plusieurs embryons présentent des caractéristiques d'évolutivité en adéquation parfaite avec le stade où la décision est prise.

Technique

- Le geste de transfert embryonnaire est simple et indolore en dehors d'une sténose cervicale.
- Un test de transfert peut être réalisé au préalable, si une pathologie cervico-isthmique est soupçonnée au bilan préalable, ou de façon systématique selon les équipes.
- Le geste de transfert est réalisé en position gynécologique, après pose du spéculum et nettoyage cervical à l'eau stérile.
- À l'aide d'un fin cathéter, et le plus souvent sous contrôle échographique, le ou les embryons sont déposés au sein d'une goutte de milieu de culture à environ 1,5 cm du fond de la cavité utérine.

Phase lutéale

- Après une stimulation ovarienne contrôlée pour FIV, la phase lutéale est toujours anormale (non physiologique).
- Il est donc nécessaire de soutenir celle-ci.
- Le traitement de première intention est la progestérone naturelle micronisée administrée par voie vaginale (pour une meilleure biodisponibilité) poursuivie au minimum jusqu'au test de grossesse (soit 14 j après la ponction folliculaire), mais très souvent jusqu'à l'échographie de 6 à 8 semaines d'aménorrhée.
- Une administration de progestérone (IM ou S/cutané) ou des injections de faibles doses d'hCG sont parfois préférées.

Transferts d'embryons décongelés (TEC)

- Les embryons surnuméraires, s'ils sont de qualité satisfaisante, peuvent être congelés pour un transfert ultérieur.
- La congélation lente était utilisée principalement jusqu'en 2012.
- La **vitrification** est une technique de congélation ultrarapide qui a permis une **amélioration des taux de récupération embryonnaire** après le processus de congélation-décongélation (plus de 90 %).
- La préparation du **transfert peut s'effectuer sur un cycle naturel**, sans stimulation ou avec une stimulation très courte, avec une stimulation quasi équivalente à celle réalisée en vue d'une IUI, ou avec un traitement hormonal substitutif séquentiel par estrogènes puis estrogènes et progestérone

Risques pour la femme

- L'allergie aux produits utilisés est possible mais très rare
- Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne, 3 à 6 % des stimulations sévère dans 0,1 à 3 % des cas.
- Une hyper-estradiolémie et d'une ↗ du risque thromboembolique (tout comme la grossesse).
- La torsion d'annexe est une autre complication de la stimulation ovarienne, rare.
 - Elle doit être évoquée devant toute douleur abdominale brutale et intense dans ce contexte d'ovaire hyperstimulé, donc ↗ de volume

Classification du syndrome d'hyperstimulation ovarienne, selon [8] .

	Forme légère	Forme modérée	Forme sévère
Douleur abdominale	Faible ou gêne	Modérée	Souvent intense
Nausées-vomissements	±	±	±
Diarrhées	±	±	±
Ascite sous tension	-	-	+
Oligoanurie	-	-	+
Dyspnée	-	-	+
Hyperleucocytose/mm ³	< 15 000	15 000–25 000	> 25 000
Hématocrite %	< 45	45–55	> 55
Cytolyse hépatique	-	±	+
Hyponatrémie	-	-	+
Hyperkaliémie	-	-	+
Ascite à l'échographie	Cul-de-sac de Douglas	Dépasse l'utérus	Atteint la loge de Morrison
Taille des ovaires (cm)	9–12	> 12	> 12
Épanchement pleural	-	-	+

- Le risque carcinologique
- Les complications liées au geste de ponction sont principalement
 - hémorragiques,
 - infectieuses
 - ou plus rarement secondaires à l'administration de produits anesthésiques.

□ Ces complications sont rares mais doivent être prévenues par une consultation pré-anesthésique

Risques fœtaux et pédiatriques

- Au total, il faut retenir que l'immense majorité des enfants nés après AMP ne présente aucun problème néonatal ni de développement ultérieur spécifique.

Assistance médicale à la procréation avec don

- L'AMP avec don de gamètes est beaucoup moins fréquente que l'AMP intraconjugale mais alimente la majeure partie des controverses en AMP, en raison du bouleversement des systèmes classiques de filiation dans nos sociétés.

Diagnostic préimplantatoire

- Certains couples, fertiles ou infertiles, porteurs de pathologies génétiques à l'origine de conséquences particulièrement graves pour l'enfant, peuvent éventuellement bénéficier d'un DPI.
- Cette technique impose une conception par FIV, avec la nécessité pour la femme d'avoir une assez bonne réponse ovarienne pour permettre l'obtention puis l'analyse de plusieurs embryons.
- Le DPI consiste à analyser une ou deux cellules embryonnaires au stade j2 ou j3 ou au stade j5, de faire un diagnostic génétique rapide de la pathologie parentale, puis de transférer au stade de blastocyste les embryons sains après parfois une étape de congélation/décongélation embryonnaire.
- L'ablation d'une ou deux cellules au stade précoce n'entrave pas, d'après les données actuelles, l'évolution ultérieure de l'embryon mais peut diminuer les taux d'implantation lorsque la cellule est extraite au stade j2 ou j3.
- Ce DPI ne dispense pas de la proposition d'un DPN pour augmenter la sensibilité du dépistage de la pathologie génétique parentale

- Dans certains cas, il est possible de faire un diagnostic pré-conceptionnel sur l'ovocyte par l'étude du premier globule polaire. Celui-ci, éliminé par l'ovocyte lors de l'ovulation, contient une copie du patrimoine génétique de l'ovocyte susceptible d'être analysé pour permettre une sélection ovocytaire avant mise en fécondation

Préservation de fertilité

- Au sein des activités d'AMP, la conservation de gamètes et de tissus germinaux qui vise à préserver la fertilité de jeunes patientes, avant un traitement gonadotoxique ou mettant en différé un projet de grossesse, est pratiquée dans 46 centres en France spécifiquement autorisés.
- Chez le jeune garçon ou chez l'homme, les congélations de tissu testiculaire (lorsque le garçon est prépubère) ou de spz (après la puberté) sont les 2 options possibles de préservation de la fertilité.
- Actuellement, seuls les spz congelés peuvent permettre d'assurer une fertilité ultérieure au patient puisque la spermatogenèse in vitro à partir de tissu testiculaire prépubère congelé n'est pas encore possible.

- Chez la fille et la femme, plusieurs options sont possibles mais nécessitent dans tous les cas une intervention invasive.
- Chez la fille prépubère, une congélation de fragments du cortex ovarien contenant les follicules est possible.
- Pour l'instant, la seule possibilité de réutilisation ultérieure de ces fragments est leur greffe sur l'ovaire restant ou sur le péritoine, ce qui a mené à l'obtention de plusieurs grossesses de par le monde. Si cette greffe n'est pas envisageable (risque de réintroduction d'une pathologie), pour l'instant la maturation folliculaire in vitro n'est pas encore opérationnelle.
- Chez la jeune fille ou la femme pubère peuvent être proposées également la congélation de fragments de cortex ovarien mais également une stimulation ovarienne en vue de congélation ovocytaire (ou embryonnaire si la patiente est en couple) par vitrification ou encore une maturation in vitro d'ovocytes récupérés immatures sans stimulation préalable.

Autres techniques

Maturation ovocytaire in vitro (MIV) ?

- Après le recueil d'ovocytes qui n'ont été soumis à aucune stimulation préalable (ou parfois à une très faible stimulation ou juste à une injection d'hCG), ces ovocytes immatures vont être mis en culture dans un milieu spécifique pour permettre leur maturation.
- Cette technique a été utilisée initialement chez des patientes porteuses d'ovaires polykystiques difficiles à stimuler.
- Actuellement, son indication majeure est la préservation de fertilité féminine avant traitement gonadotoxique puisqu'elle ne nécessite pas de stimulation hormonale préalable et qu'elle est réalisable sans délai.

Gestation pour autrui ?

- Certaines femmes privées d'utérus ou dont l'état de santé est incompatible avec le déroulement d'une grossesse peuvent, dans certains pays (États-Unis, Grande-Bretagne, etc.) accéder à la GPA, qui correspond au concept de « mère porteuse ou de substitution ».

Greffe d'utérus ?

- La greffe d'utérus est une technique en cours de développement actuellement à partir de donneuses vivant à l'étranger.
- Plusieurs naissances ont été rapportées dans le monde à ce jour.
- Elle pourrait être une alternative à la GPA dans certains cas.
- Un programme de greffe d'utérus à partir de donneuses décédées a été lancé en France en 2015

En conclusion.....

- L'AMP a été depuis plus de 30 ans un formidable espoir pour les couples dont l'infertilité masculine, tubaire, ou plus complexe ne trouvait pas de solution thérapeutique.
- L'AMP comprend des techniques d'insémination, de FIV, d'ICSI et de transfert d'embryons.
- Ces techniques sont en développement et évolutions continus
- leur mise en œuvre est, depuis 1994, encadrée étroitement par la loi.
- Leurs indications sont posées après un bilan étiologique complet des deux membres du couple.
- L'orientation rapide vers un centre spécialisé en cas de nécessité de recours à une AMP améliore le pronostic de prise en charge de l'infertilité.
- Les risques pour la femme et l'enfant restent modérés mais doivent continuer à être explorés. Ils doivent par ailleurs être connus par tout couple s'engageant dans une procédure d'AMP, de même que les taux de grossesse qui restent également modérés mais s'améliorent au fur et à mesure du développement et de l'optimisation des techniques.

Merci
de
votre attention

