

# ACTIVITES BIOLOGIQUES du centre d'AMP

Dr Hervé LUCAS



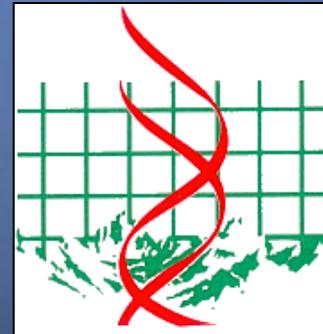
L'HOPITAL PUBLIC



Au service de la Vie

Centre Hospitalier  
Intercommunal  
d'Annemasse-  
Bonneville (CHIAB)

Laboratoire de  
Biologie  
Baltassat-Lucas



# Les différentes étapes de la FIVETE au laboratoire - Techniques du Centre 74.

**J0**

- ✓ Recueil ovocytaire .....
- ✓ Préparation du sperme .....
- ✓ Décoronisation **avant ICSI** seulement .....
- ✓ Microinjection (ICSI) .....
- ✓ Insémination des ovocytes avec les SPZ en FIV .....



**J1**

- ✓ Décoronisation des ovocytes **après FIV** .....
- ✓ Observation de la Fécondation après FIV ou ICSI .....



**J2/3**

- ✓ Observation de la qualité des Embryons .....
- ✓ Transfert embryonnaire .....
- ✓ Congélation des embryons surnuméraires .....

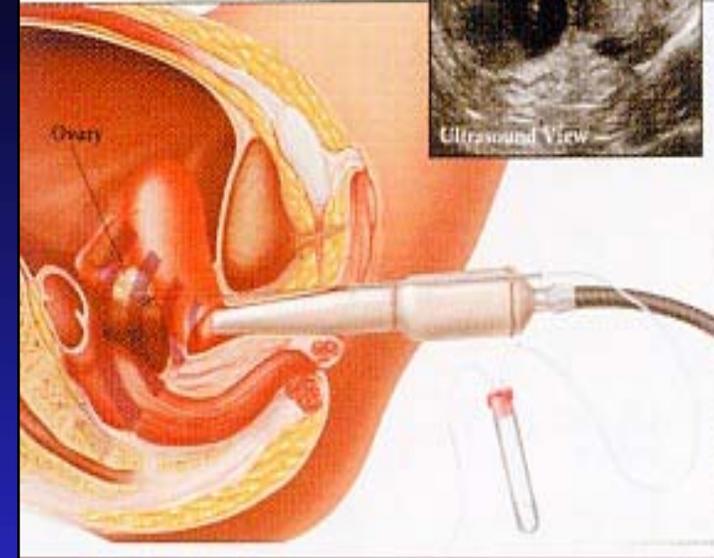


J0

# Ponction folliculaire

- recueil ovocytaire par ponction échoguidée transvaginale
- **Système d'aspiration continue**, plus sûr et moins traumatique pour les cumuli et les ovocytes.

Système de ponction folliculaire échoguidé.



Ovocyte et son cumulus de cellules de la granulosa.c

- Impossible à ce stade d'observer précisément l'état de maturation.

# Préparation des spermés

1- Prélèvement au centre.



2- Préparation des spermatozoïdes mobiles et les plus typiques. *Gradients-Migration Ascendante.*

3- Adaptation de la Technique pour le type d'AMP (IA, FIV, ICSI) et selon le type de sperme :

- ✓ Ejaculat ou prélèvement chirurgical
- ✓ Normospermie ou oligospermie,
- ✓ Sperme congelé-décongelé ou frais,
- ✓ Petit ou grand volume de l'éjaculat,
- ✓ Présence d'anticorps anti-spermatozoïdes,
- ✓ Ejaculation rétrograde...



*IMPORTANTANCE DU T.M.S. PREALABLE !*

**J0**

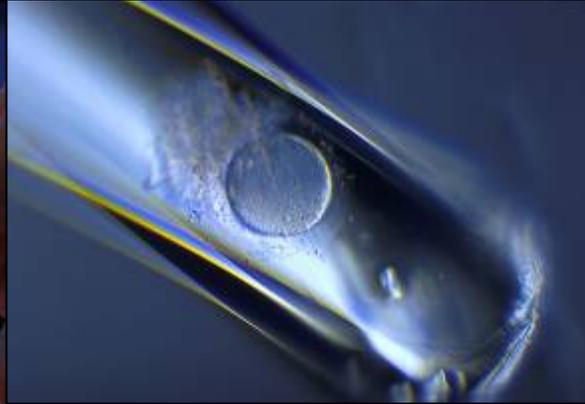
(ICSI)

ou

**J1**

(FIV)

# Décoronisation des ovocytes



La décoronisation avant ICSI est effectuée au J0, elle -permet d'observer la maturité de l'ovocyte, -facilite l'injection du spermatozoïde dans l'ovocyte.

La décoronisation après FIV est effectuée au J1 et sert à contrôler la fécondation.

En ICSI : seuls les ovocytes M2, matures, seront injectés...importance de la stimulation...l'HCG permet cette maturation nucléaire finale des ovocytes.



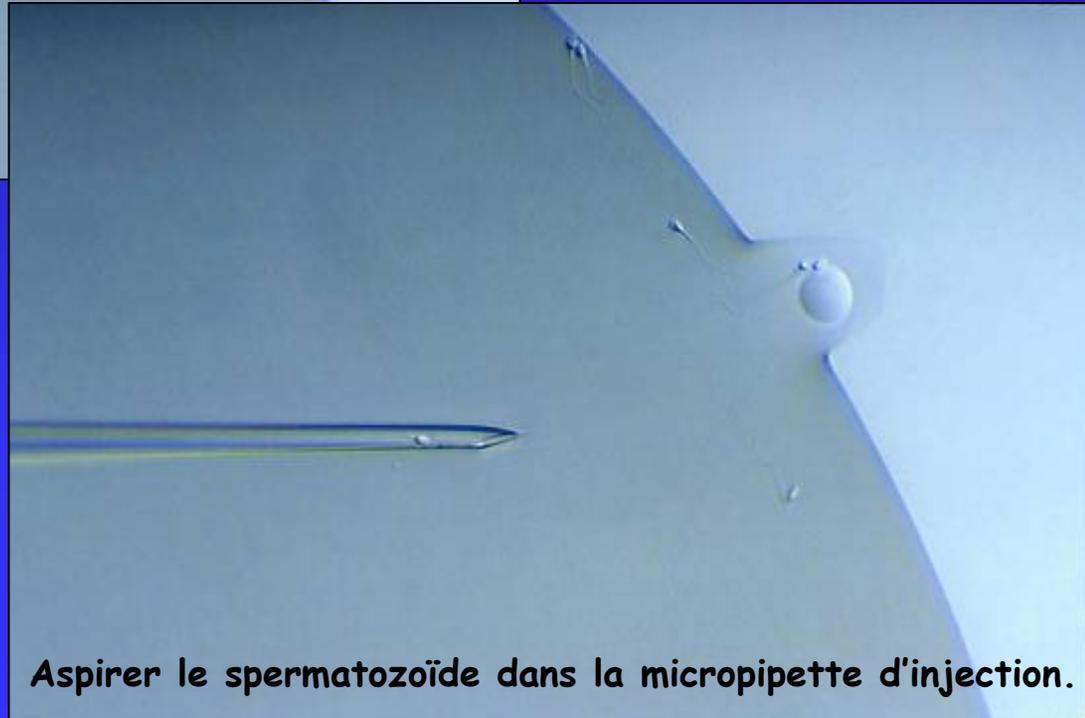
Zone de micromanipulation des gamètes, sous huile, dans des microgouttes de milieu de culture



Choisir le spermatozoïde que l'on va injecter.  
L'immobiliser en brisant son flagelle.



Aspirer le spermatozoïde dans la micropipette d'injection.



Quels spermatozoïdes utilisés en ICSI ?

...Les spermatozoïdes incompetents pour féconder,

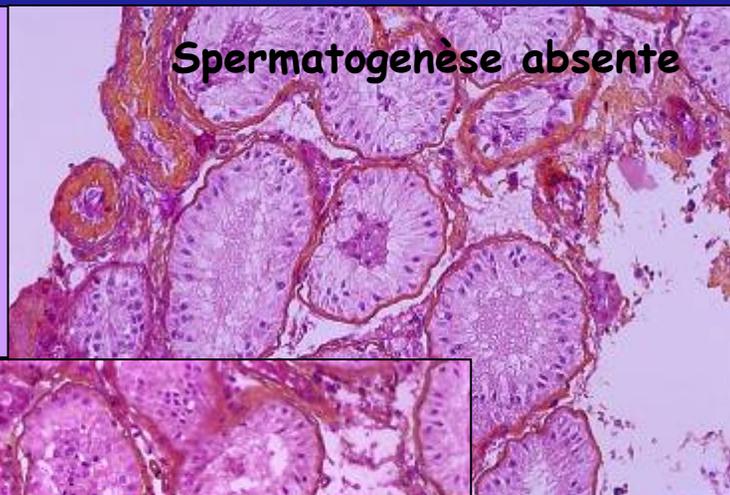
- Oligo, asthéo, tératospermies
- Les spermatozoïdes prélevés chirurgicalement
- Les causes immunologiques sévères...

SPZ Frais



SPZ  
Congelés-  
décongelés

Spermatogénèse absente



...préparer...



...Quelques spermatozoïdes...

Spermatogénèse normale



# Microinjection



Introduction de la pipette d'injection contenant le spermatozoïde à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire.



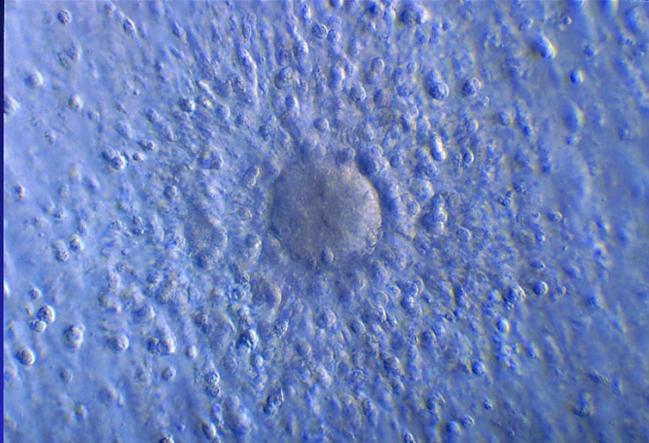
# ICSI



Dépôt du spermatozoïde à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire.

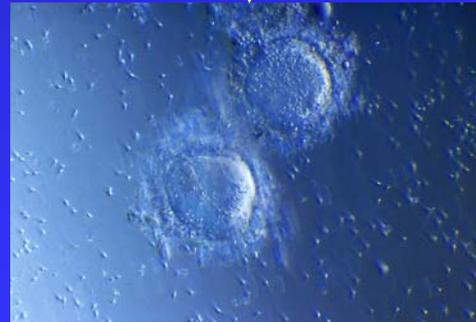


Retrait de la micropipette.



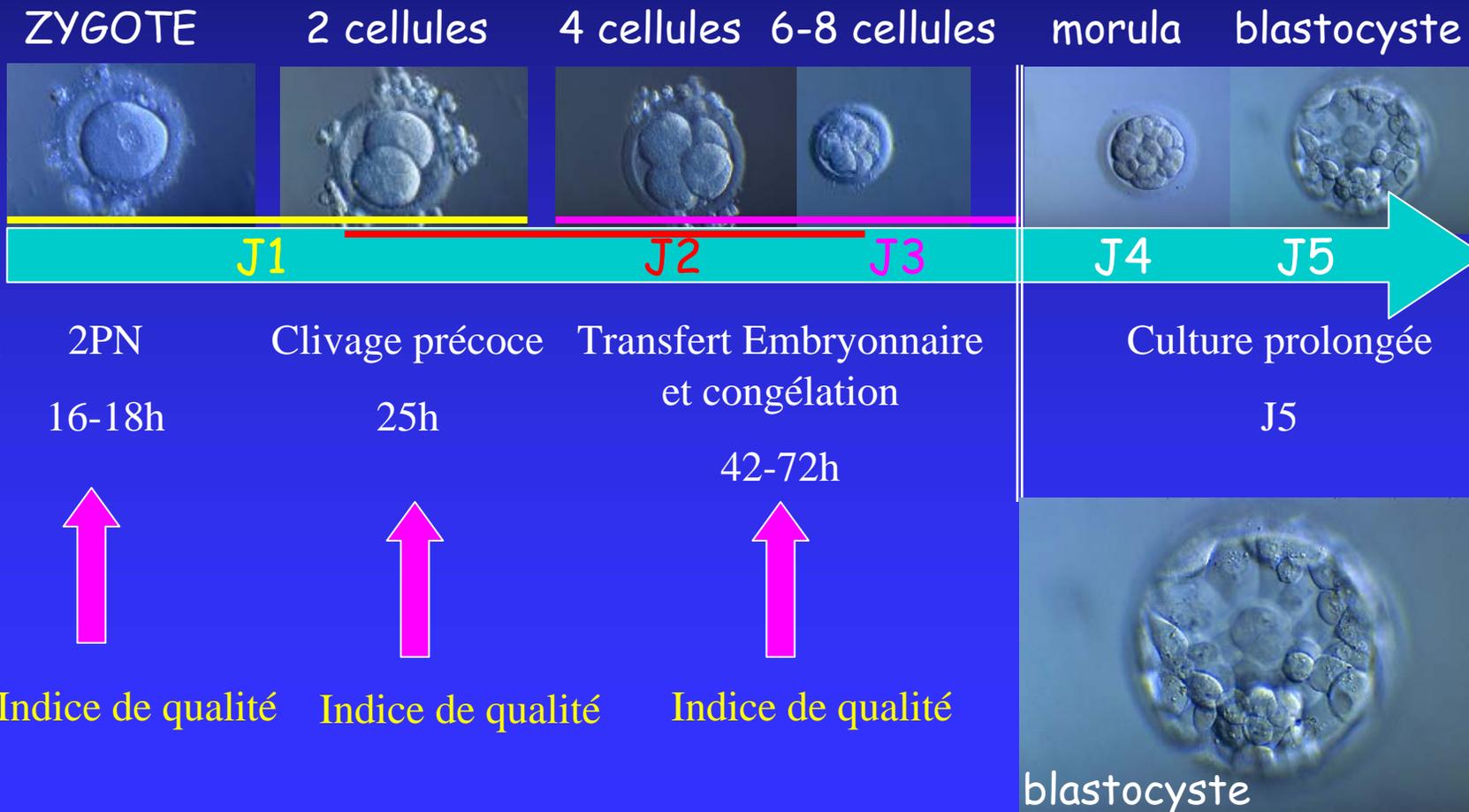
Mise en contact des gamètes pour 16-18h

Technique classique ...  
... 100 000 à 200 000 spz  
dans 0,8 ml de milieu



Microtechnique ...  
... 4000 à 8000 spz  
dans 30  $\mu$ l de milieu.

# Les Étapes du développement embryonnaire précoce



# J1 Observation des zygotes (T0 + 16-18 h)

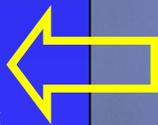
FIV et ICSI

Evaluation du taux de fécondation : Fécondé (Nb de PN ? de GP?)

Après FIV :



Grossesse Molaire, voir accouchement à terme



Après ICSI :

non expulsion du 2nd GP... lésion du fuseau meiotique ?

J2

# Observation des embryons

Ou

# Congélation des embryons

J3

A



C



B



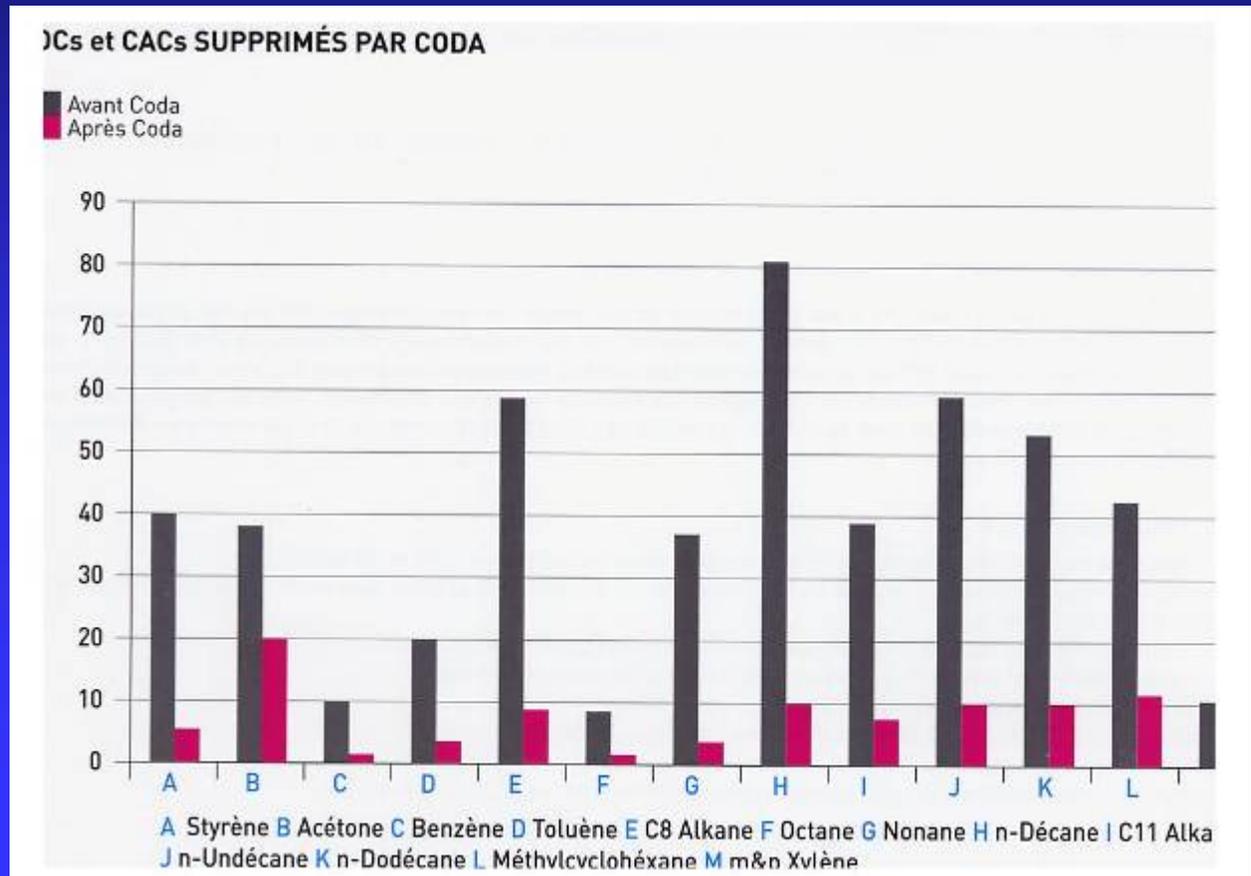
D



# Facteurs influençant la qualité embryonnaire

- La qualité d'ensemble : de la thermorégulation, des consommables et matériels utilisés ...**la qualité de l'air** :

- **Transfert à J2 ou J3**  
aucune différence.



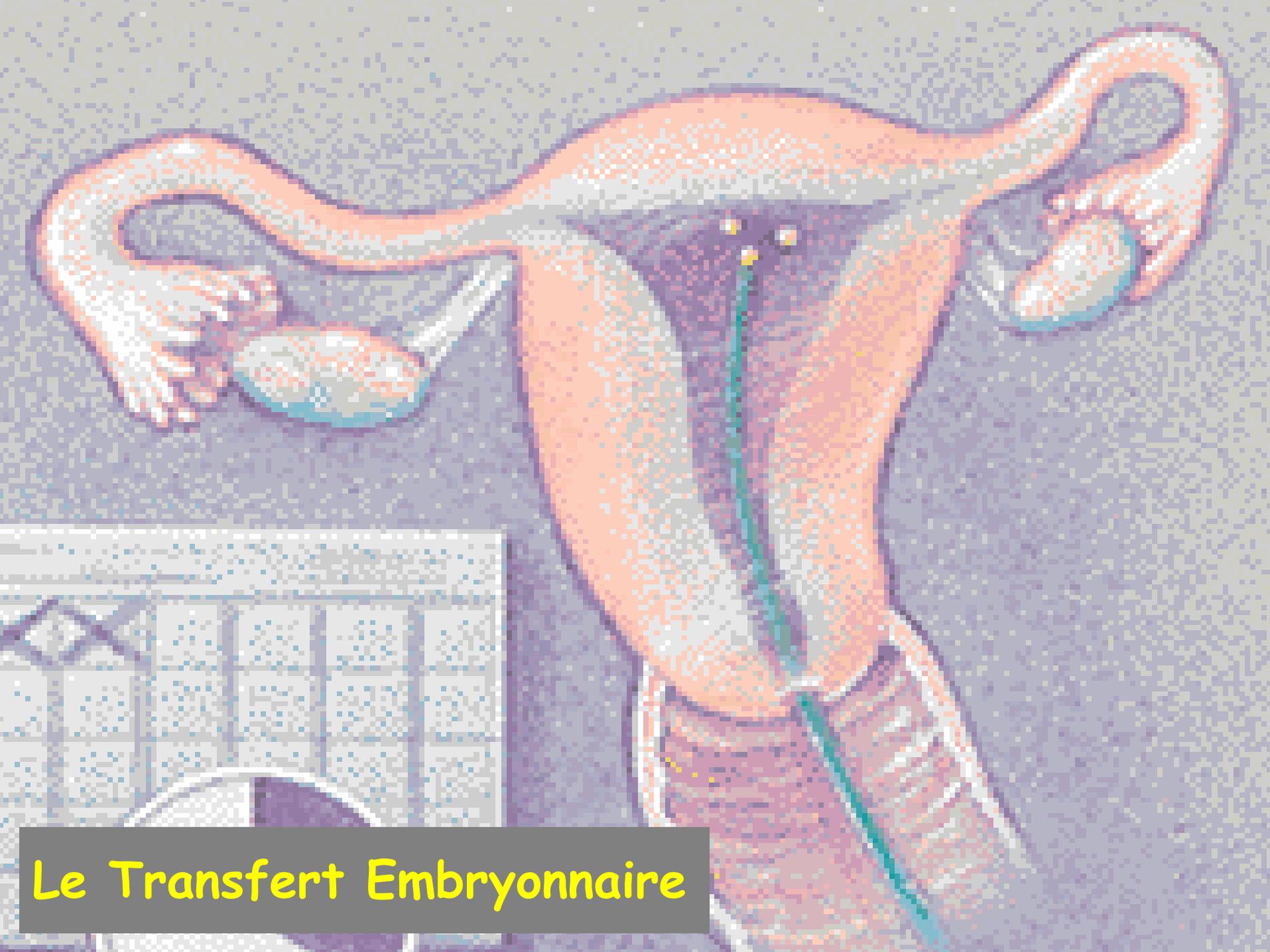
# La congélation embryonnaire



➤ **Importance** de la qualité de la congélation pour le **taux de grossesse cumulé**, pour 1 tentative

➤ Utilisation des **paillettes haute sécurité (CBS)**.





## Le Transfert Embryonnaire

# L'apport de l'andrologie en 2004

- Ne pas adapter la technique, ICSI par exemple, à la qualité du sperme...qui peut dans certains cas être grandement améliorée... Importance de l'information spécifique de l'homme.
- Causes génétiques masculines à discuter avec le couple.
- Les inflammations du tractus génital masculin sont largement sous estimées /négligées...

Après traitement ATB-AINS spécifique

- Grossesses naturelles
- Meilleurs taux de succès en IA,FIV,ICSI.

# EVALUATION D'UNE INFLAMMATION CHRONIQUE DU TRACTUS GENITAL MASCULIN

L'INTERROGATOIRE

L'EXAMEN CLINIQUE

L'ECHOGRAPHIE ENDORECTALE / TESTICULAIRE

LE SPERMOGRAMME

LA BIOCHIMIE DU PLASMA SEMINAL

LA SPERMOCULTURE

Faisceau  
d'arguments

Azoospermie → Oligospermie

Modification du type d'AMP (IA)

Amélioration de la Fécondance

Diminution du coût de santé

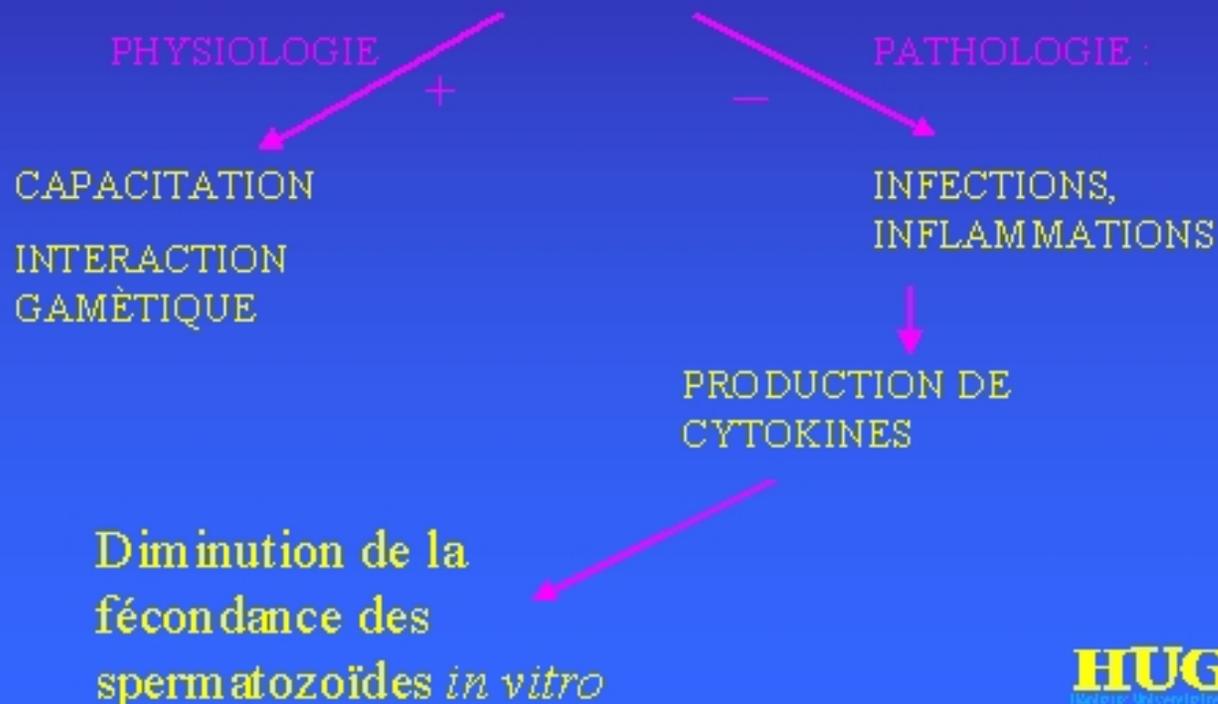
OBJECTIFS

TRAITEMENT

## DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE (DAO ou ROS) :

Intermédiaires très réactifs ( $e^-$ ) à durée de vie courte  $10^{-10}$  s

Interfèrent avec Protéines, ac. nucléiques, lipides et sucres, et modifient leur structure (Halliwell, 1996).



## ROS :

72% PATIENTS INFERTILES EN PRODUISENT EN EXCÈS VERSUS 25% DES FERTILES (*Ford et al., 1997*).

## CYTOKINES (Interféron gamma, TNF alpha) :

DIMINUENT LA MOBILITE SPERMATIQUE

DIMINUENT LE POUVOIR FUSIOGENE DES SPERMATOZOIDES

(*Berger et al., 1982; Hill et al., 1987, 1989*).

Le Fluide d'hydrosalpinx reproduit les altérations de la fécondance in vitro (*Lucas et coll., human reproduction 2001*)

## PREPARATION DES SPERMES AVANT L'ICSI (Cochin, Paris):

|                    | Lavage simple | Migration Ascendante | PureSperm     |
|--------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Effectif           | 191           | 45                   | 164           |
| Taux fécondation   | <b>54%*</b>   | <b>58,2%*</b>        | <b>73,2%*</b> |
| Taux Clivage       | 56,6%         | 54,8%                | 73,6%         |
| Taux Echecs        | 2,6%          | 6,6%                 | 0,6%          |
| Taux atrésie       | <b>12,9%*</b> | <b>13,2%*</b>        | <b>8,6%*</b>  |
| Taux gross./Transf | 28%           | 32,6%                | 35%           |
| Taux embryons A    | 21,3%         | 23,5%                | 23,2%         |

FRAGMENTATION DE L'ADN RETROUVÉE  
FRÉQUEMMENT POUR LES OVOCYTES NON  
FÉCONDÉS EN ICSI. ACTION DES ROS ?

(Lopes et al., 1998).

\* p<0,05

TECHNIQUE DE PREPARATION UTILISEE AUX HUG, AVANT ICSI :  
PURESPERM + MIGRATION ASCENDANTE.

# Quels sont les risques de l'AMP ?

Risques liés à la stimulation ?

Risques liés à la ponction folliculaire ?

Risques liés à la grossesse. Grossesses multiples ?

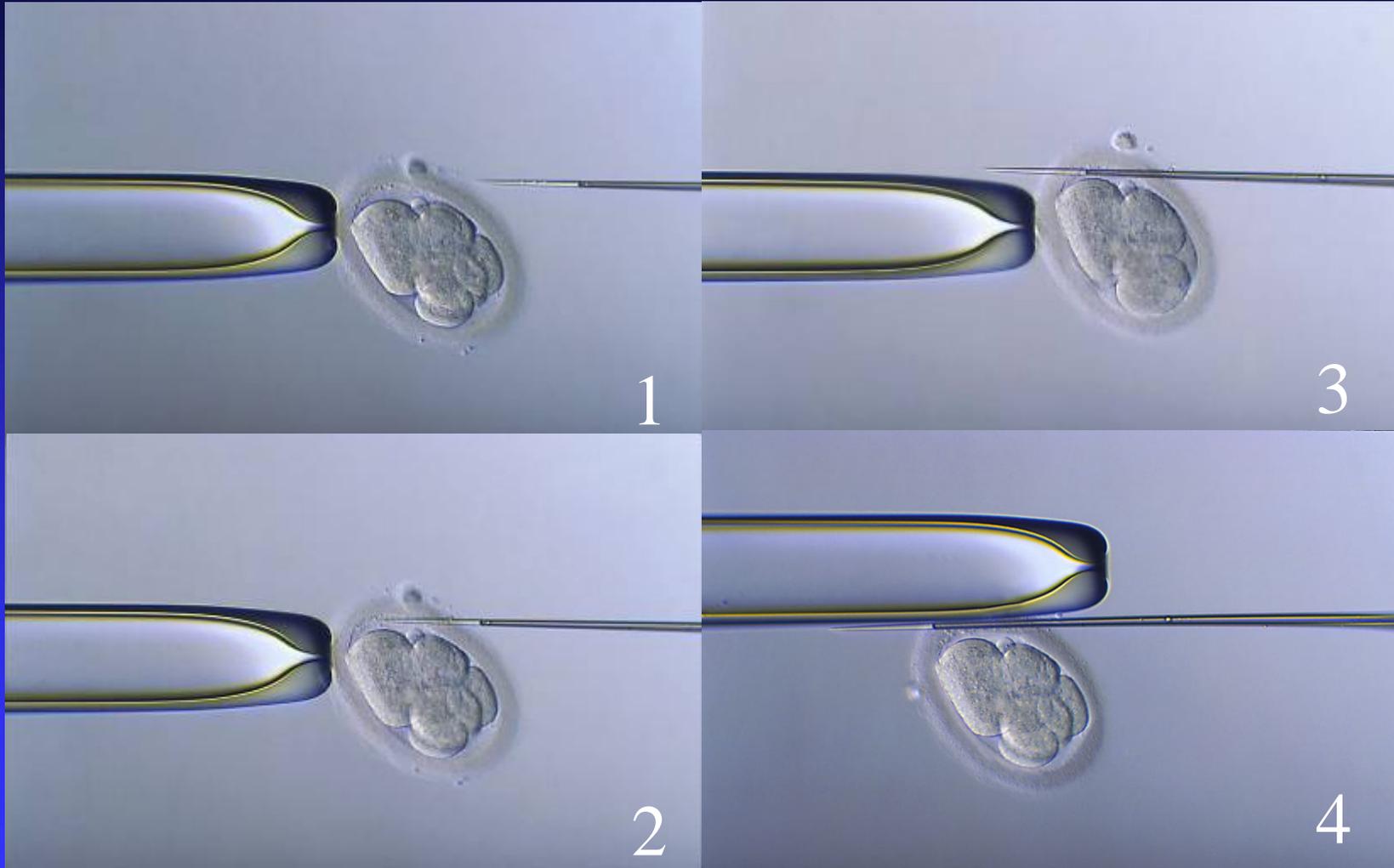
Risques liés à l'ICSI ? augmenté !!!

Risque malformation à la naissance double en comparaison avec les grossesses obtenues naturellement (prévalence élevée d'anomalies génétique chez les oligospermes).

Risques liés à la FIV classique ?

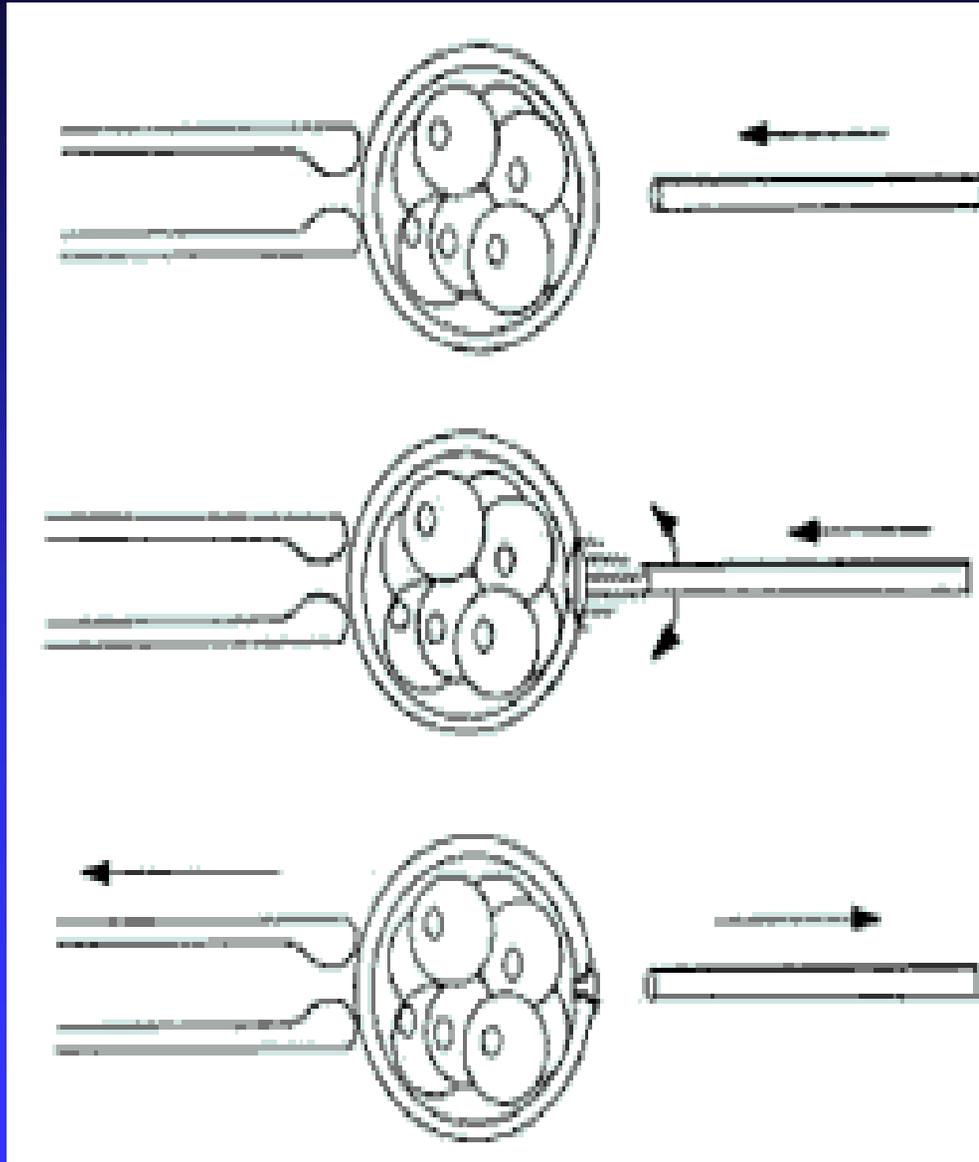
Augmenté quand comparé aux grossesses naturelles (biais d'observation très probable)

# Eclosion assistée (Hatching)



Technique manuelle

# Eclosion assistée



au tyrode acide

...

mais

maintenant,  
utilisation du  
**LASER...**

le plus sûr !

But ...



ESHRE meta-analysis don't confirm the interest of Laser Assisted Hatching in any indication

Further study to conclude ?!

# Pre-implantation Genetic Diagnosis (PGD)



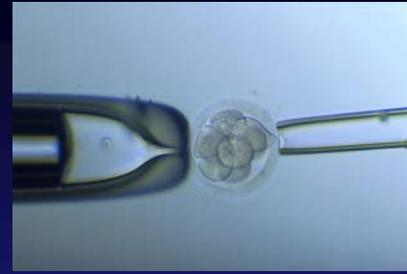
Genetic analyze (x2 cells):

Chr. Number : FISH

Gene alteration : PCR



# Pre-implantation Genetic Diagnosis (PGD)



- The benefits of PGD in **infertile** couple (2 Polar body, PCGD).
  - Research of aneuploidy in older women (decrease miscarriage)
- The benefits of PGD in **fertile/infertile** couple.
  - Sex embryo screening (Ethically discussed...)
- Who should have PGD ?
  - Fertile or Infertile couples with known and genetically detectable genetic diseases.

**Very good genetic laboratory needed !**

# What is the future in ART ?

- **Ovarian tissue cryopreservation and graft.**
- **In Vitro Oocyte Maturation.**
- **Reducing the number of embryo transferred.  
(blastocyst culture development).**
- **Pre-Implantation Genetic Diagnosis.**
- **In Vitro maturation of male germinal cells.**