

ANDROLOGIE, BIOLOGIE, PMA

Beaune 2003

Dr Hervé Lucas, MD, PhD

Biologiste, Andrologue

ANDROLOGIE et PMA : where is the link ?



Il y a des bijoux qu'on achète... d'autres pas!

Exemples d'opportunités médicales avant ... une « éventuelle » AMP

Exemple 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

Diminuer Apoptose des spz

OBJECTIFS

TRAITEMENT

ATB + AINS

**TRAITEMENT D'UNE PROSTATITE CHRONIQUE ou
D'UNE AUTRE INFLAMMATION CHRONIQUE
du TRACTUS GENITAL MASCULIN**

QUINOLONE II (OFLOXACINE 200 mg x 2/J)

ANTI-INFLAMMATOIRE NON STERODIEN

20 j

PHASE 1

puis

METRONIDAZOLE (500 mg x 2/J)

10 j

PHASE 2

DOXYCYCLINE (100 mg x 2/J)

16 j

SPERMOGRAMME DE CONTRÔLE (> 3 sem.)

(Volume, Mobilité-Vitalité, Leucocytes, biochimie PS, SPCult, Clinique)

CONCLUSION 1

L' EXAMEN CLINICO-BIOLOGIQUE des hommes est
indispensable

Pour qu'une AMP (IIU/ICSI)
ait les meilleures chances de succès

..... La biologie du sperme le filtre pour dépister les
soucis masculins,

Aspects biologiques de la fertilité masculine

- L 'analyse biologique des spermatozoïdes et du liquide séminal est une étape clé de l 'évaluation de la fertilité masculine et donc du potentiel fécondant des spermatozoïdes
- Ces analyses donnent également des indications sur la fonction testiculaire et sur l 'intégrité du tractus génital masculin

THE BIBLE :

**WHO laboratory manual
for the examination of
human semen and
sperm–cervical mucus
interaction**

FOURTH EDITION



WORLD HEALTH ORGANIZATION

L'analyse de sperme consiste en:

- analyse macroscopique
volume, pH, temps de liquéfaction
- analyse microscopique
concentration, mobilité et viabilité
- analyse immunologique
recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes
- analyse bactériologique
détection d'infection, en plus de la colonisation toujours présente
- évaluation de la morphologie des spermatozoïdes
examen détaillé de la morphologie de 100 à 200 spermatozoïdes
- analyse biochimique du plasma séminal
marqueurs des glandes annexes

Reference values of semen variables^a

Volume	2.0 ml or more
pH	7.2 or more
Sperm concentration	20x10 ⁶ spermatozoa/ml or more
Total sperm count	40x10 ⁶ spermatozoa or more
Motility more after	50% or more motile (grade a+b) or 25% or with progressive motility (grade a) within 60 min collection.
Morphology	*
Vitality	75% or more live
White blood cells	Fewer than 1x10 ⁶ /ml
Immunobead test particles	Fewer than 50% spermatozoa with adherent
MAR test particles	Fewer than 50% spermatozoa with adherent

^aWHO manual, 4th edition, 1999.

* Data from ART programmes suggest that, as sperm morphology falls below 15% normal forms, using the methods and definitions described in this manual, the fertilization rate in vitro decreases.

Reference values of semen variables^b

(2)

Seminal plasma biochemical analysis

Epididymal markers

α -glucosidase (neutral) 20 mU or more per ejaculate

Carnitine 0.8-2.9 μ mole per ejaculate

Prostate markers

Zinc (total) 2.4 μ mole or more per ejaculate

Citric acid (total) 52 μ mole or more per
ejaculate

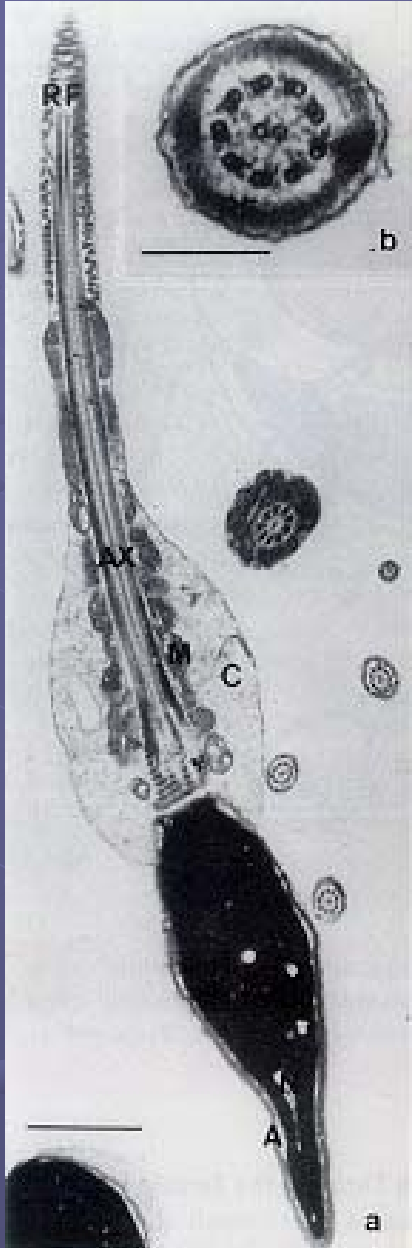
Acid phosphatase (total) 200 U or more per ejaculate

Seminal vesicle marker

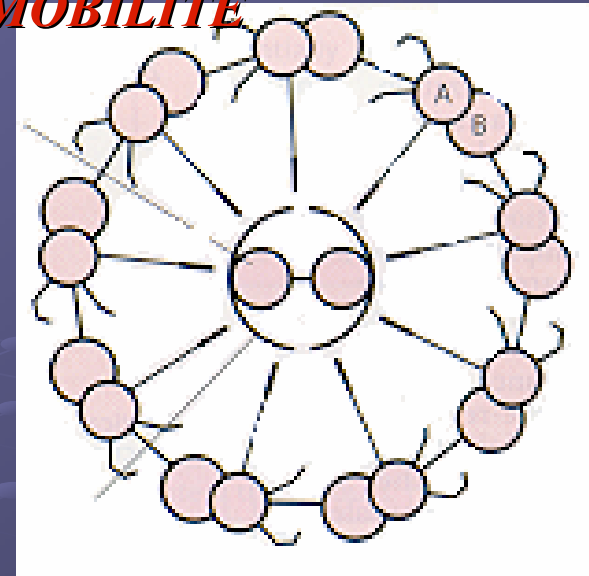
Fructose (total) 13 μ mole or more per ejaculate

^bWHO manual, 3rd edition, 1992

CAS PARTICULIER : LES TROUBLES DE LA MOBILITÉ SPERMATIQUE CONSTITUTIONNELS:



LES DYSKINESIES
FLAGELLAIRES....
Un diagnostic souvent
difficile.



BRAS EXTERNES DE DYNÉINE : mobiles mais Tests Pénétration

dans Glaire -

BRAS INTERNES DE DYNÉINE : Immotile Cilia,
Kartagener syndrome.

TUBULES CENTRAUX : 9+0 Syndrome (*Neugebauer et al., 1990*)

La Globozoospermie

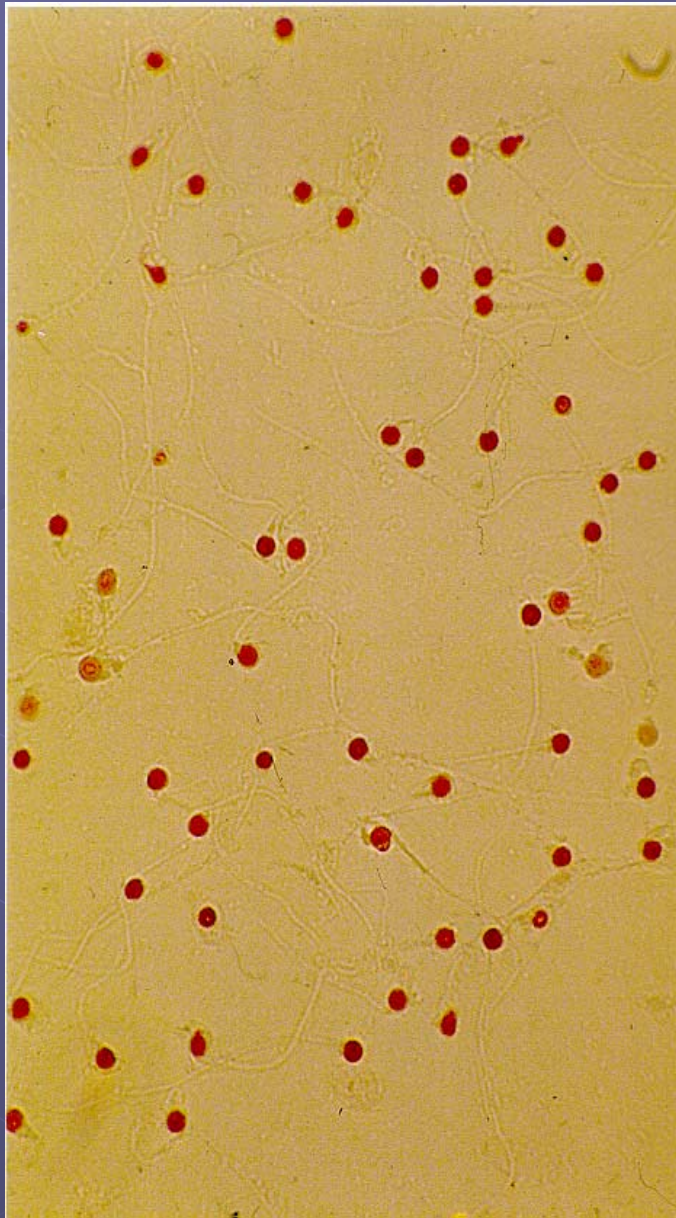






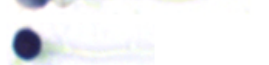






Figure 4.6. Transmission electron microscopy. Spermatozoa have spherically shaped nuclei, completely lacking both acrosome and postacrosomal sheaths.

Morphologie des spermatozoïdes humains.

Têtes normales

- 1. 
- 2. 
- 3. 
- 4. 








Anomalies de la tête

- 5. Macrocéphale 
- 6. Microcéphale 
- 7. Pyriforme 
- 8. Tapering 
- 9. Ronde (avec acrosome) 
- 10. Ronde (sans acrosome) 
- 11. Double tête (amorphe) 
- 12. Amorphe 
- 13. Amorphe 
- 14. Amorphe 
- 15. Amorphe 
- 16. Amorphe

Anomalies de la pièce intermédiaire

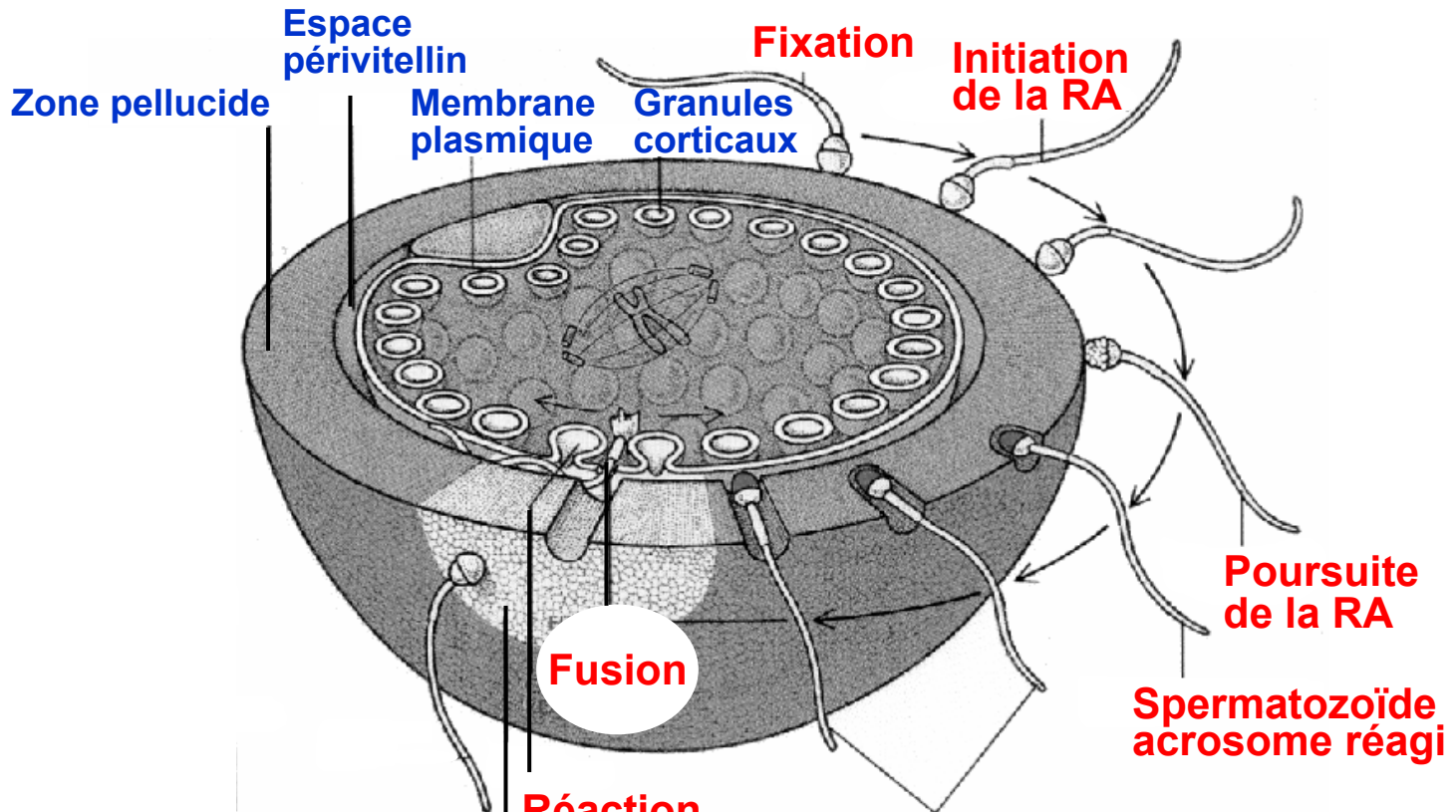
- 17. Reste cytoplasmique 
- 18. Angulation 

Anomalies du flagelle

- 19. Double 
- 20. Court 
- 21. Enroulé 
- 22. " 
- 23. " 
- 24. Absent 
- 25. Angulé 

Certaines anomalies morphologiques peuvent compromettre la capacité fécondante des spermatozoïdesquelques exemples....

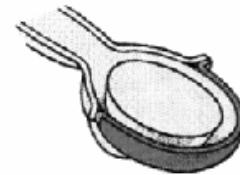
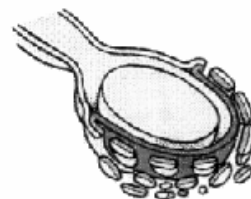
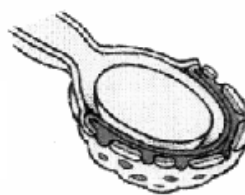
- Une anomalie de la pièce intermédiaire ou du flagelle peut perturber la mobilité
- Un acrosome incomplet ou absent peut empêcher la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte.
- Une tête trop volumineuse est un signe que la compaction de l'AND du noyau est incomplète



Modification de la ZP après la réaction corticale

Réaction corticale

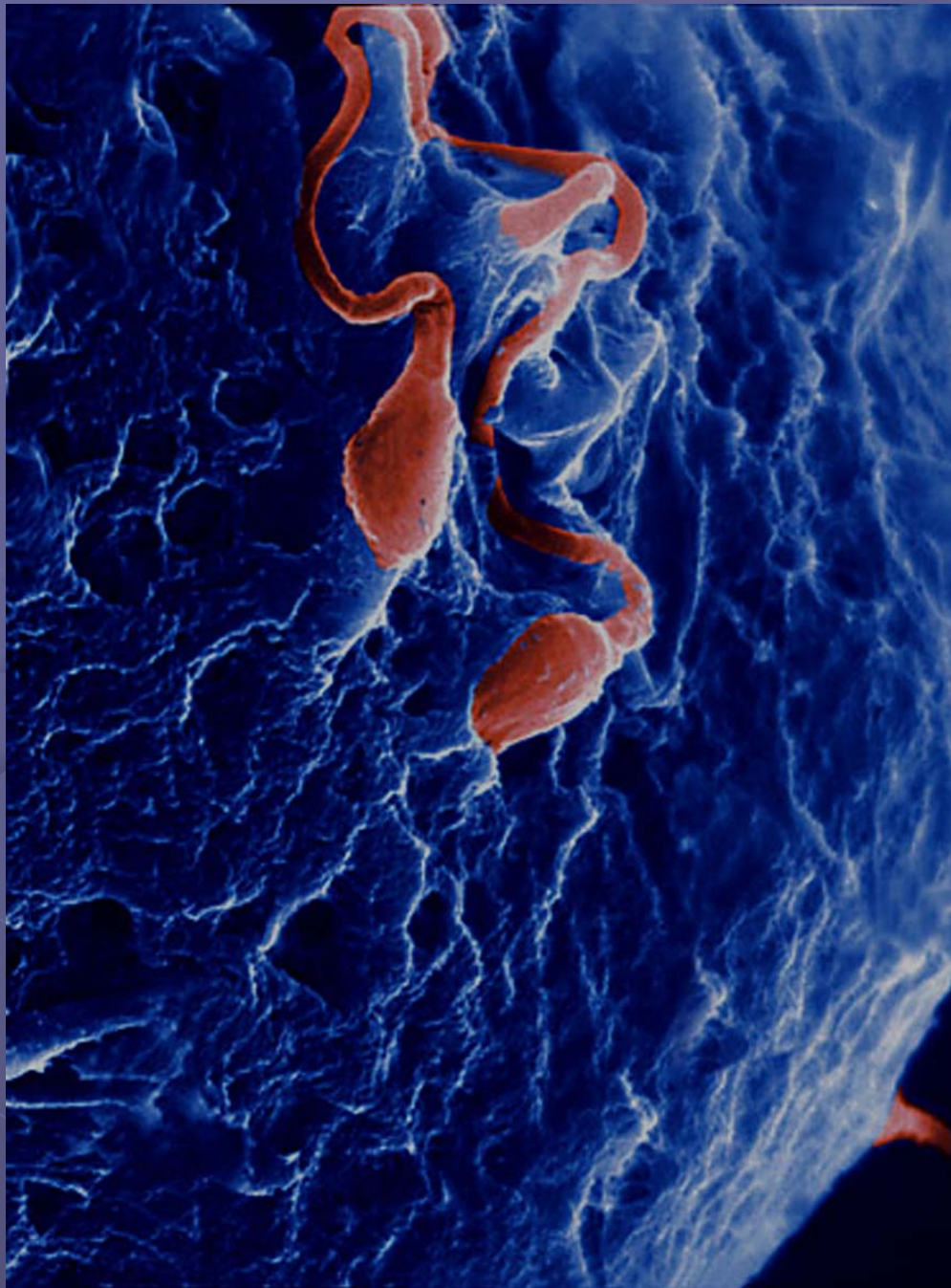
Pénétration de la ZP



Fusion membranaire

Vésiculation

Spermatozoïde acrosome réagi



Mechanisms of Disease

Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men

G. Charles OSTERMEIER et al.

THE LANCET.Vol 360.September 7, 2002.

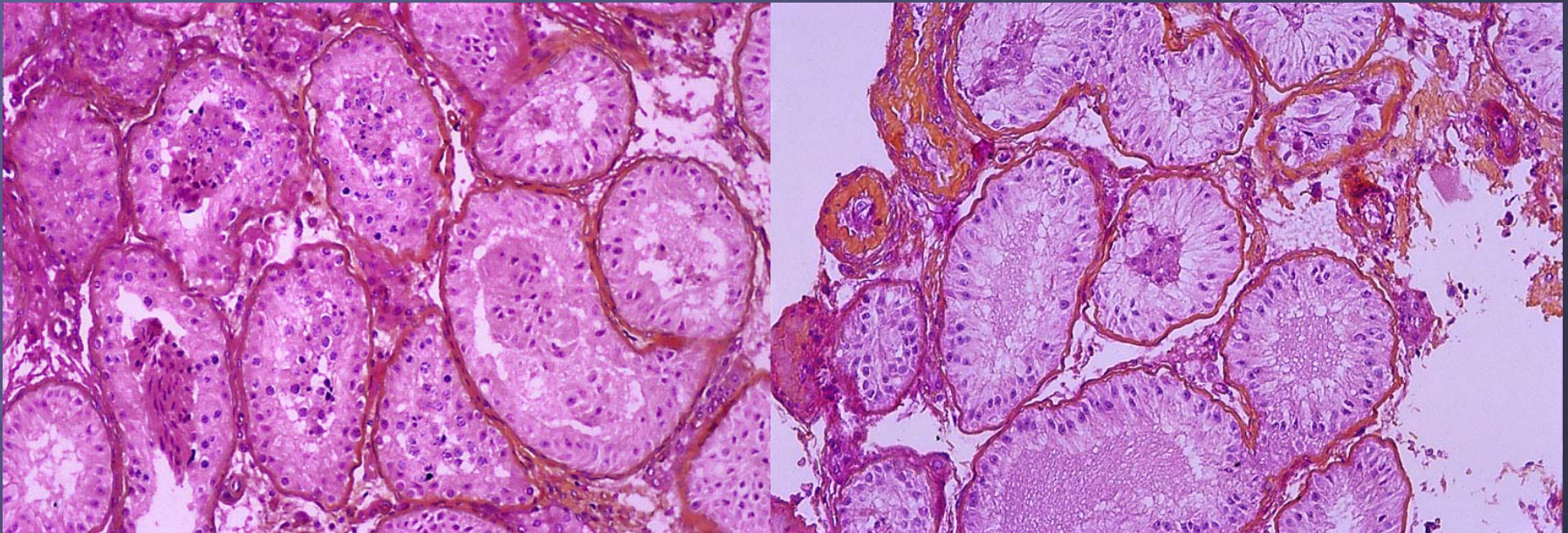
Le spermatozoïde,

Son noyau et sa chromatine

Infertilités masculines d'origine génétique

La spermatogénèse normale et pathologique

Les ARNm et leurs rôles éventuels



- Les ARNm des spermatozoïdes sont le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse,
- Le/Les profil(s) de ces ARNm n'ont jamais été clairement établis,
- L'objectif de ce travail a été de déterminer comment on pourrait utiliser les ARNm extraits des spermatozoïdes de l'éjaculat pour donner une « empreinte génétique » de la spermatogénèse humaine normale.

Utilisation de la technique du microarray pour identifier les gènes correspondants aux ARNm transcrits.

Echantillons

Ejaculats poolés/9 hommes fertiles

Ejaculat/1 homme fertile

Testis/19 victimes d'accidents

Microarrays : ~ 30'000 ESTs (Expressed Sequence Tags)

Application des cDNA marqués des différents échantillons

Détection des spots après exposition photo, analyse informatisée,

Détermination des protéines correspondantes aux gènes exprimés.

Technique

Extraction des ARNm ,
purification,

rtPCR, synthèse de cDNA,
marquage au ^{32}P ,

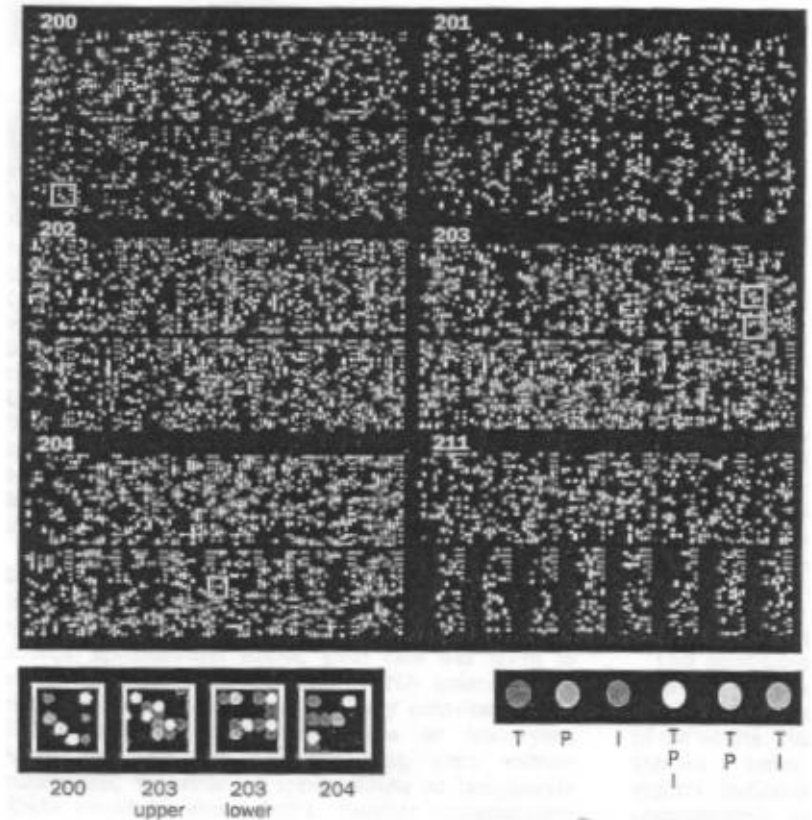
Fig 3 :

cDNA **testis** reconnaît : 7157 ESTs

cDNA **pool d'éjaculats** : 3281 ESTs
tous reconnus par **testis**

cDNA **éjaculats isolé** : 2780 ESTs
tous reconnus par **testis** et **pool d'éjaculats**

cDNA **éjaculat isolé** : 4 ESTs
non reconnus par **testis** et **pool d'éjaculats**



9 ARNm présents dans testis et éjaculats poolés dont les protéines ont été identifiées :

FOXG1B, WINT5A, SOX13, clusterin, AKAP4, oscillin, HSBP1

Protéines correspondant aux gènes exprimés

Prot membranaires et nucléaires

Rôle : transduction signaux, prolifération cellulaire dans spermatogenèse (?), fécondation, développement embryonnaire.

Comparaison transcrits OVOCYTES HUMAINS Non Fécondés
et transcrits des spermatozoïdes

Aucun ARN en commun

Idem chez la souris

Les transcrits de ZYGOTES (échec de fécondation) possèdent en plus de ceux détectés dans des OVOCYTES NON FECONDES des **ARNm associés avec la fécondation, l'embryogenèse et la morphogenèse.**



ROLES IMPORTANTS POUR LES ARNm DES SPERMATOZOÏDES
DURANT PUIS APRES LA FECONDATION ?

ETABLISSEMENT D'UNE EMPREINTE GENETIQUE DES SPZ

VALIDATION TECHNIQUE

CONCLUSION

Que doit-on penser de l'utilisation des spermatozoïdes en ICSI et de l'incidence éventuelle sur le conceptus



Les études à larges effectifs sont en cours pour affiner nos connaissances sur « le risque de l'ICSI »

Importance de la recherche des causes génétique connues actuellement...dans l'attente d'une « empreinte génétique du sperme ».

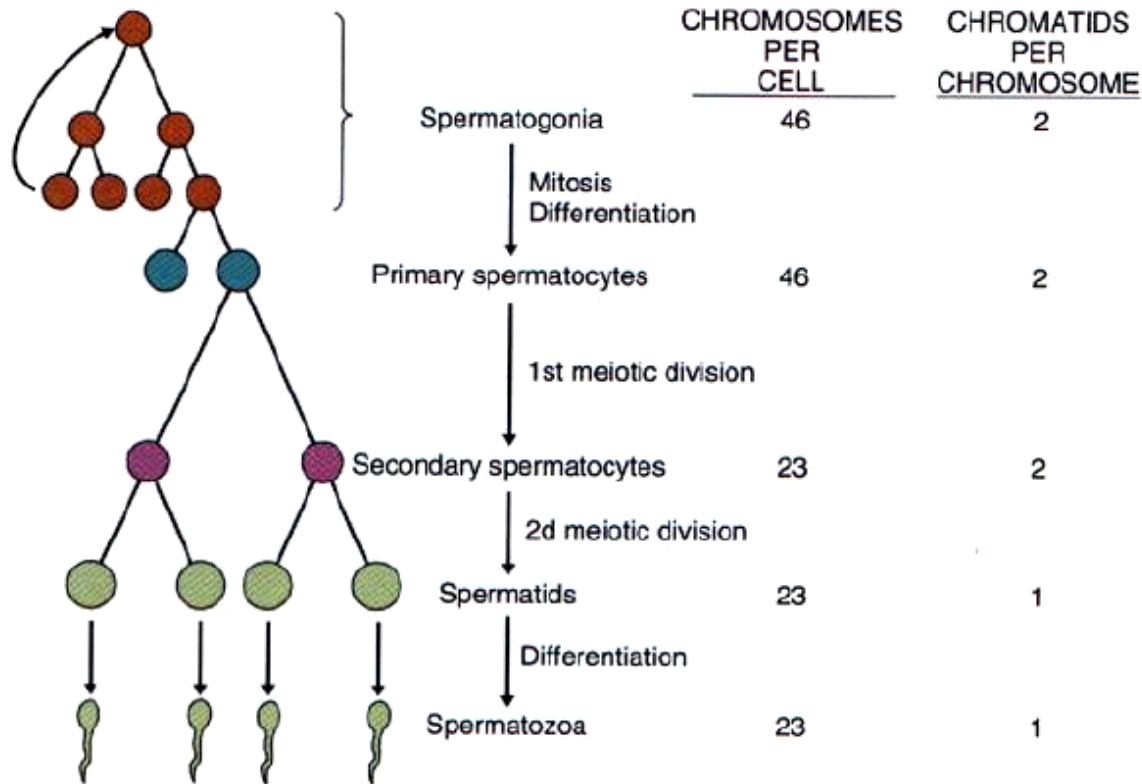
Génétique et infertilité masculine

remerciement au Dr Sophie DAHOUN, Génétique Médicale HUG
pour le prêt de diapositive

Un caryotype est recommandé:

- Chez l'**homme**:
 - azoospermie ou OAT (<20mio /éjaculat)
 - signes cliniques
- Chez **chaque partenaire** si notion familiale:
 - fausses couches à répétition
 - naissance enfants anormaux
 - stérilité
 - PMA non développement des embryons

Spermatogenesis



Une anomalie du caryotype est retrouvée dans environ 10-15 % des oligospermies extrêmes (<5 M spermatozoïdes)...explication de l'oligospermie par une perturbation de la méiose.

Les gènes

- état de la recherche:
 - souris transgéniques
- **AZF et DAZ (Deleted in Azoospermia)**
- **Mucoviscidose (CF, gène CFTR)**
 - autosomique récessive
 - atteint 1/2000 --> porteur 1/20
 - >700 mutations décrites (60% $\Delta F508$)
 - 95% des atteints agénésie déférents
 - 6% azoospermie: excrétoire
 - atteinte clinique est fonction du type de mutation
 - mutations + ou - pathogènes

L'analyse moléculaire du gène CFTR (mucoviscidose) est recommandé:

● chez l'**homme**:

- agénésie (même unilatérale) des canaux déférents
- OAT sévère (< 20 mio total) quoique controversé
- notions d'affections pulmonaires à répétitions, de pancréatites
- antécédents familiaux de mucoviscidose

● chez la **femme**:

- notion familiale
- si mutation trouvée chez partenaire
- 21 mutations testées négatives chez conjoint avec CAVD

Risque mucoviscidose patient CAVD



CAVD



Porteuse



Mucoviscidose
pulmonaire



CAVD

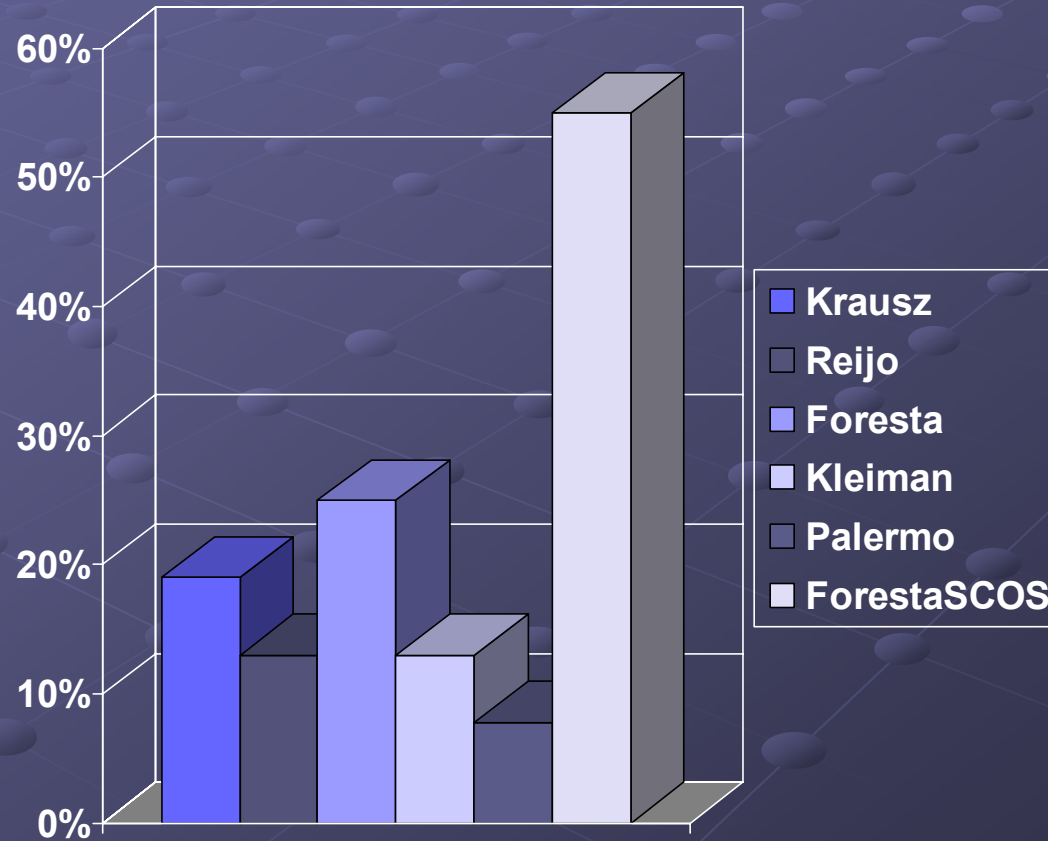


— mutation pathogène CFTR

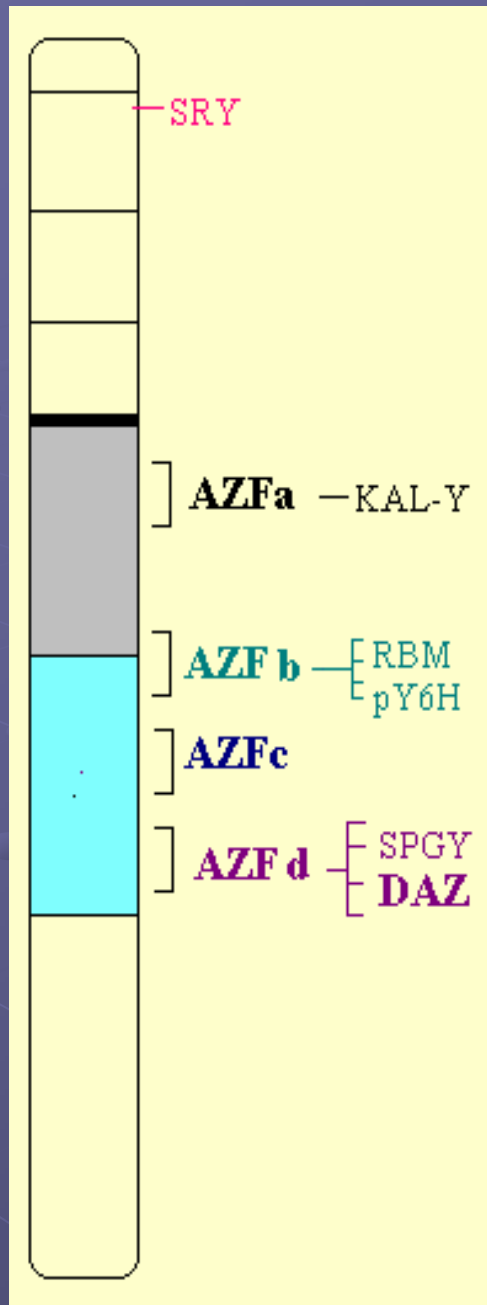
— mutation peu pathogène

Délétions bras long Y

6 études: 671 patients



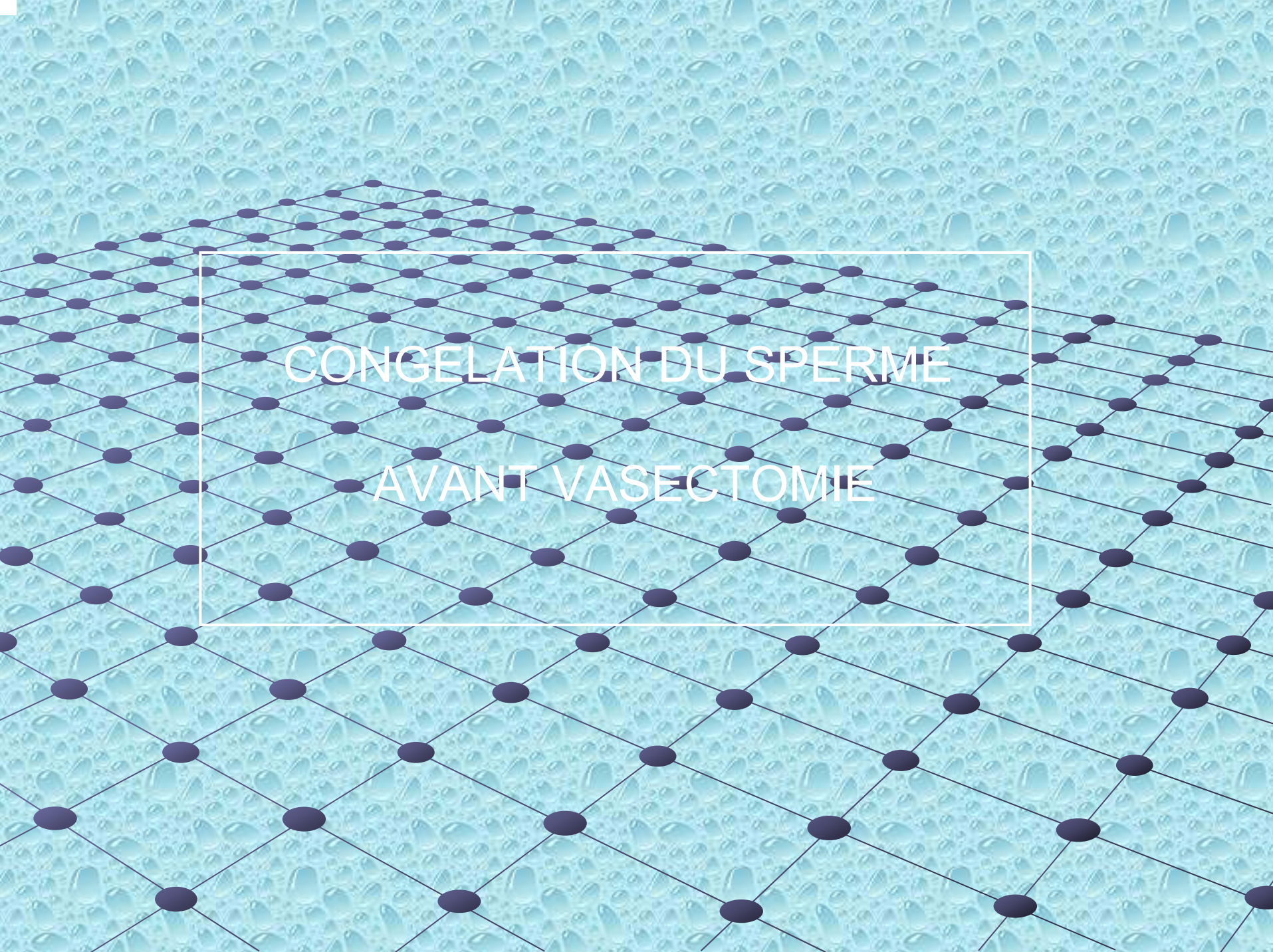
Conseil génétique: Délétions Yq



- **kit** disponible recherchant les délétions de 18 endroits spécifiques de l'Y
- conseil génétique: transmission de la stérilité aux garçons
- cas rares décrits de pénétrance incomplète
- test **optionnel** ou **diagnostic**?

Identification de maladies généétiques

- **causes** de l'infertilité
- potentiellement **transmissibles** à la descendance
- PMA => levée de **barrières** naturelles
- **Consultation génétique:**
 - **aide** au diagnostic
 - implication génétique dans la pathologie
 - moyens **diagnostiques**
- **Conseil génétique:**
 - **explication**
 - **risque** pour la descendance
 - variation expression
 - mode de transmission



CONGELATION DU SPERME
AVANT VASECTOMIE

Le problème des vasectomisés est **double** et est en rapport avec la fécondance des spermatozoïdes après reperméabilisation :



PRODUCTION D'ANTICORPS anti-SPERMATOZOÏDES.

DEGATS IRREVERSIBLES DE L'EPIDIDYME.

RECEPTEURS SPERMATIQUES IMPLIQUES DANS L'INTERACTION GAMETIQUE HUMAINE

FA-1	fixation pellucidaire	Naz <i>et al.</i> , 1992
p95 (ZRK)	fixation pellucidaire	Burks <i>et al.</i> , 1995
α -D-mannosidase	fixation pellucidaire	Tulsiani <i>et al.</i> , 1990
Enzyme trypsine-like	fixation pellucidaire	Llanos <i>et al.</i> , 1993
Protéine de 20 kDa	fixation pellucidaire	Boettger-Tong <i>et al.</i> , 1993
Antigène de 94 kDa et 95 kDa, FA-2, HU9	fixation pellucidaire	Moore <i>et al.</i> , 1987; Naz <i>et al.</i> , 1993; Emiliozzi et Fénichel, 1997
mannose-lectine	fixation pellucidaire	Benoff, 1997
galactose-lectine	fixation pellucidaire	Goluboff <i>et al.</i> , 1995
fucose-lectine	fixation pellucidaire	Mahony <i>et al.</i> , 1993
P34H	fixation pellucidaire	Boué <i>et al.</i>, 1996
SP-10	fixation pellucidaire	Wright <i>et al.</i> , 1990
P-sélectine	fixation à la membrane ovocytaire	Fusi <i>et al.</i> , 1996
Intégrines, vitronectine, fibronectine	fixation à la membrane ovocytaire	Bronson et Fusi, 1996
PH-30 ou fertiline	fixation à la membrane ovocytaire	Gupta <i>et al.</i> , 1996

..... Liste non exhaustive

La P34H

(Sullivan et Bleau, 1985; Sullivan et Robitaille, 1989)

Protéine homologue de la P26h (hamster) et de la P25b (bovine).

Origine épидидymaire

Localisée sur la portion antérieure de la tête des spermatozoïdes

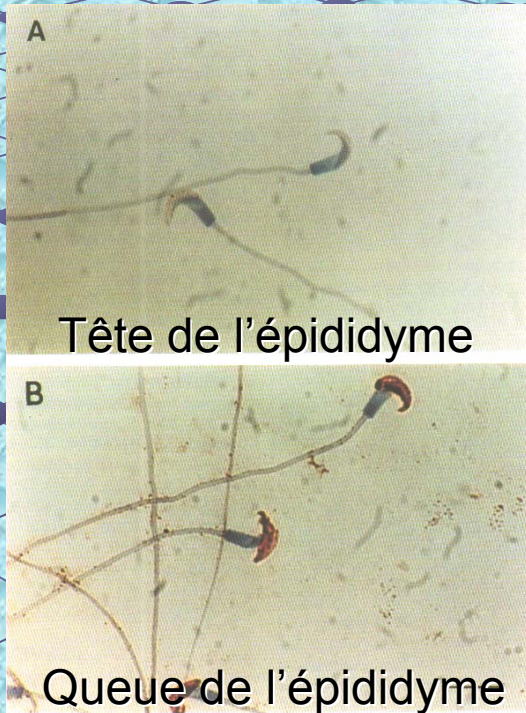
Anticorps polyclonal anti-P34H (Boué et al., 1994) :

- Inhibe la fixation des spermatozoïdes à la ZP
- Sans action sur la mobilité des spermatozoïdes
- Sans action sur la fusion avec l'oocyte

Mécanisme permettant le transfert de P26h aux spermatozoïdes durant le transit épидидymaire

(Légaré et al., 1999)

P26h



Transfert de P26h actif par l'intermédiaire de prostasomes

Liaison aux spermatozoïdes par l'intermédiaire de « phosphatidylinositol-anchored proteins »

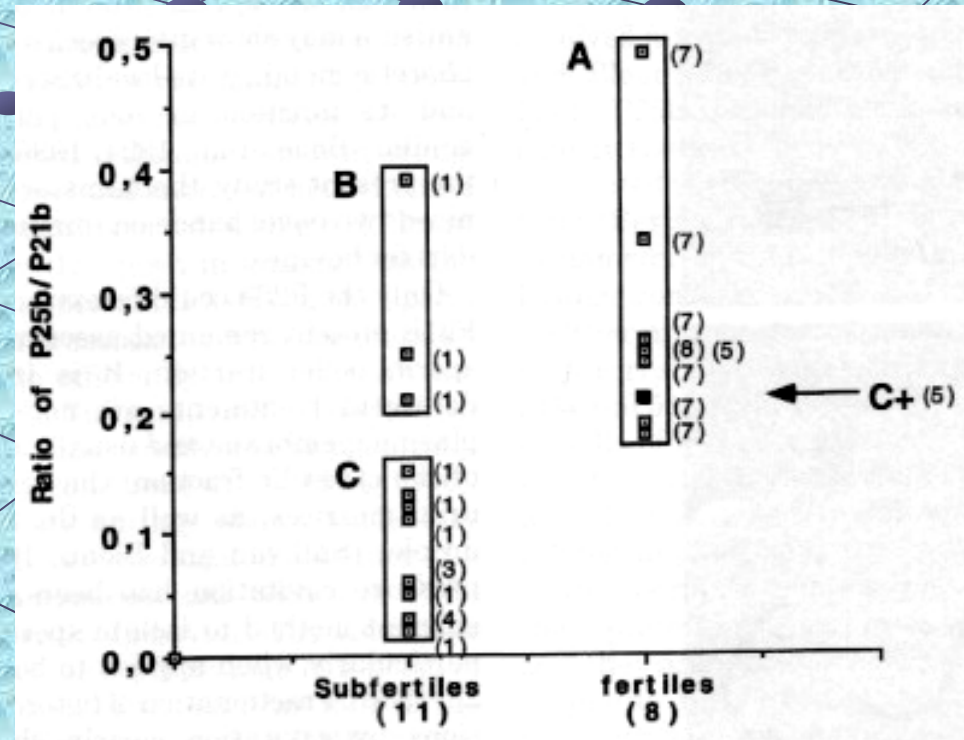
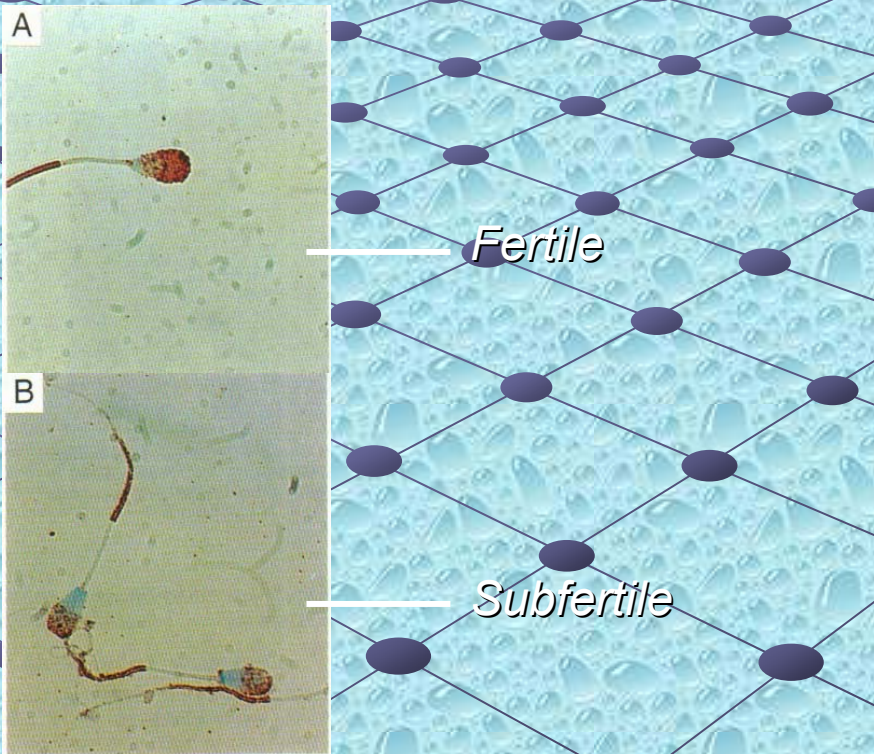
Phospholipase C spécifique a permis de démontrer le rôle des phosphatidylinositol-anchored proteins dans l'ancrage de P26h aux prostasomes et aux spermatozoïdes.

Corrélation entre fertilité et P25b

(Parent et al., 1999)

P25b est sur la portion antérieure de la tête et corrélée avec la fécondance.

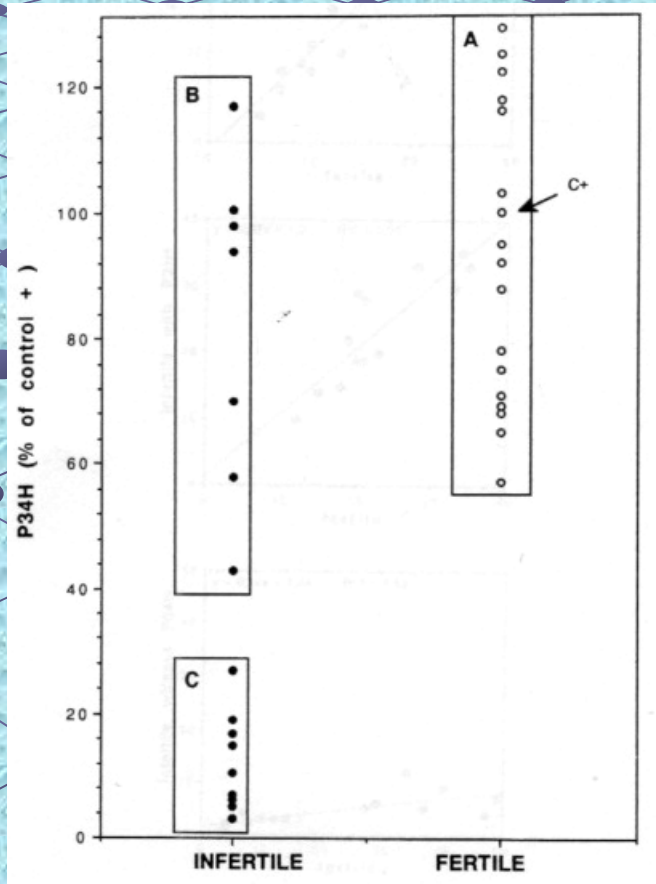
P25b



Corrélation entre fertilité et P34H (1)

(Boué et Sullivan, 1996)

Comparaison de la protéine P34H chez les hommes fertiles versus infertiles (Infertilités idiopathiques)



P34H en moyenne moins représentée chez les infertiles

Certains infertiles ont un taux normal de P34H

Infertilités idiopathiques se subdivise en 2 populations d'hommes

TEST FIXATION ZP

-

+

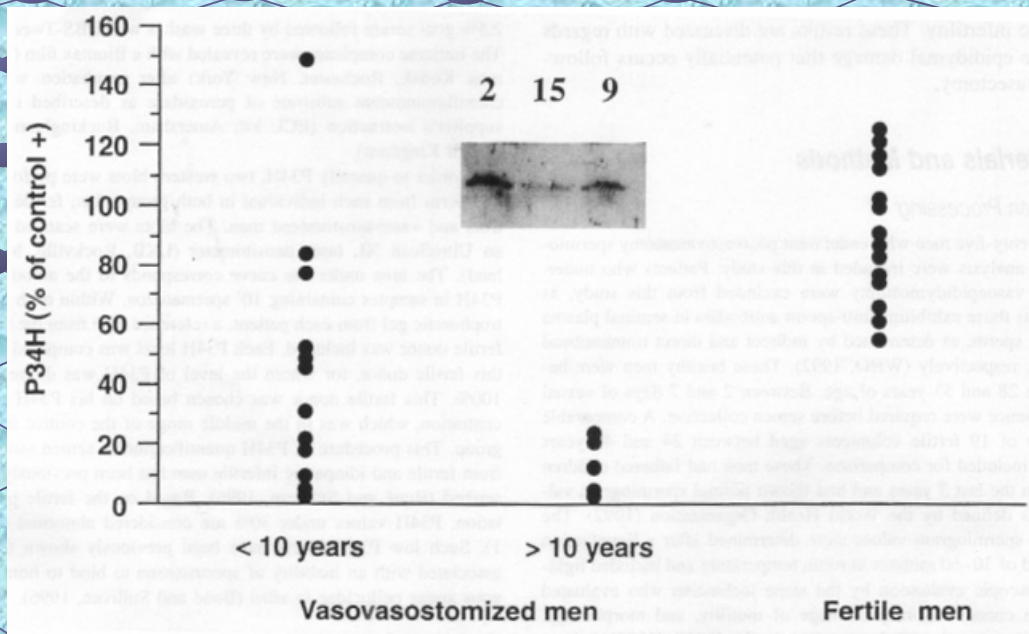
P34H basse

P34H normale

Corrélation entre fertilité et P34H (2)

(Guillemette et al., 1999)

Le délais entre la vasectomie et la vaso-vasostomie est important à considérer pour estimer les chances de restauration de la fertilité



P34H très basse chez les vasectomisés > 10 ans

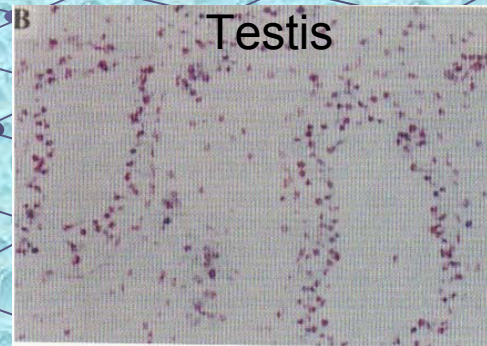
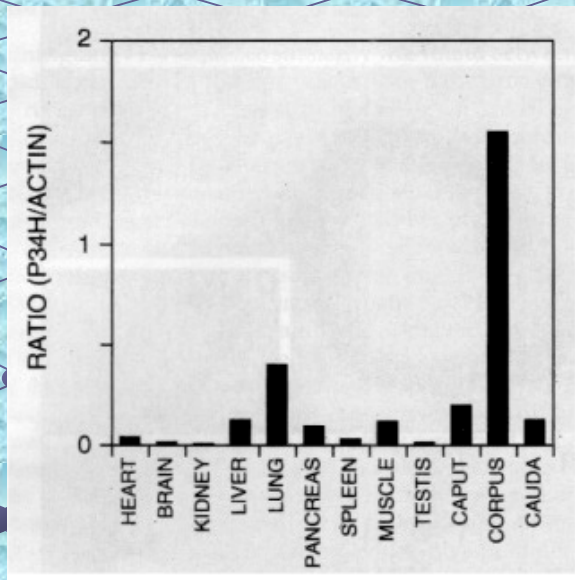
P34H parfois normale chez les vasectomisés < 10 ans

P34H est un marqueur épидидymaire qui démontre que la vasectomie cause des altérations de l'épithélium épидидymaire

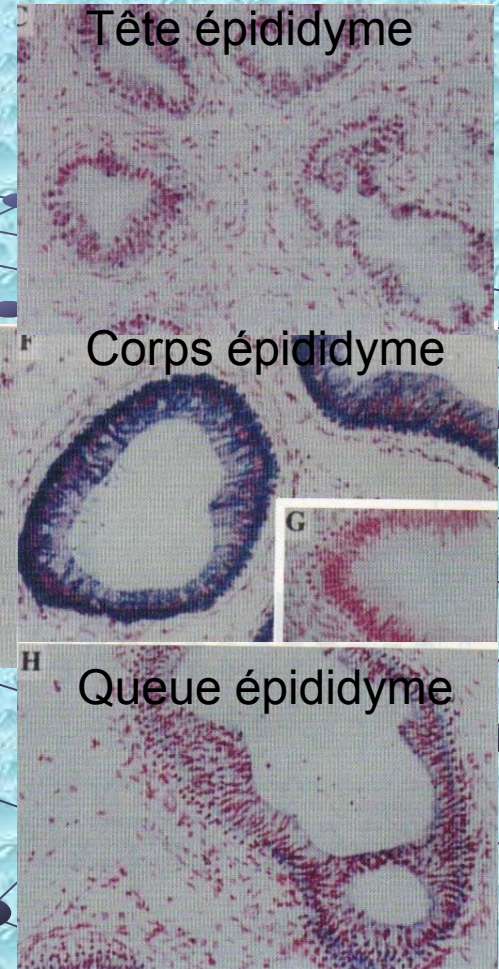
Clonage de la protéine P34H

(Légaré et al., 1999)

Transcription du gène dans l'épididyme et principalement dans le corps. Absent dans le testis.



Localisation des transcrits de P34H

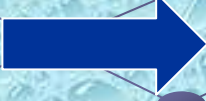


Homologie à 71 % avec la carbonyl réductase intestinale porcine, membre de la famille des protéines SDR (short-chain deshydrogenase / reductase).

CONCLUSION

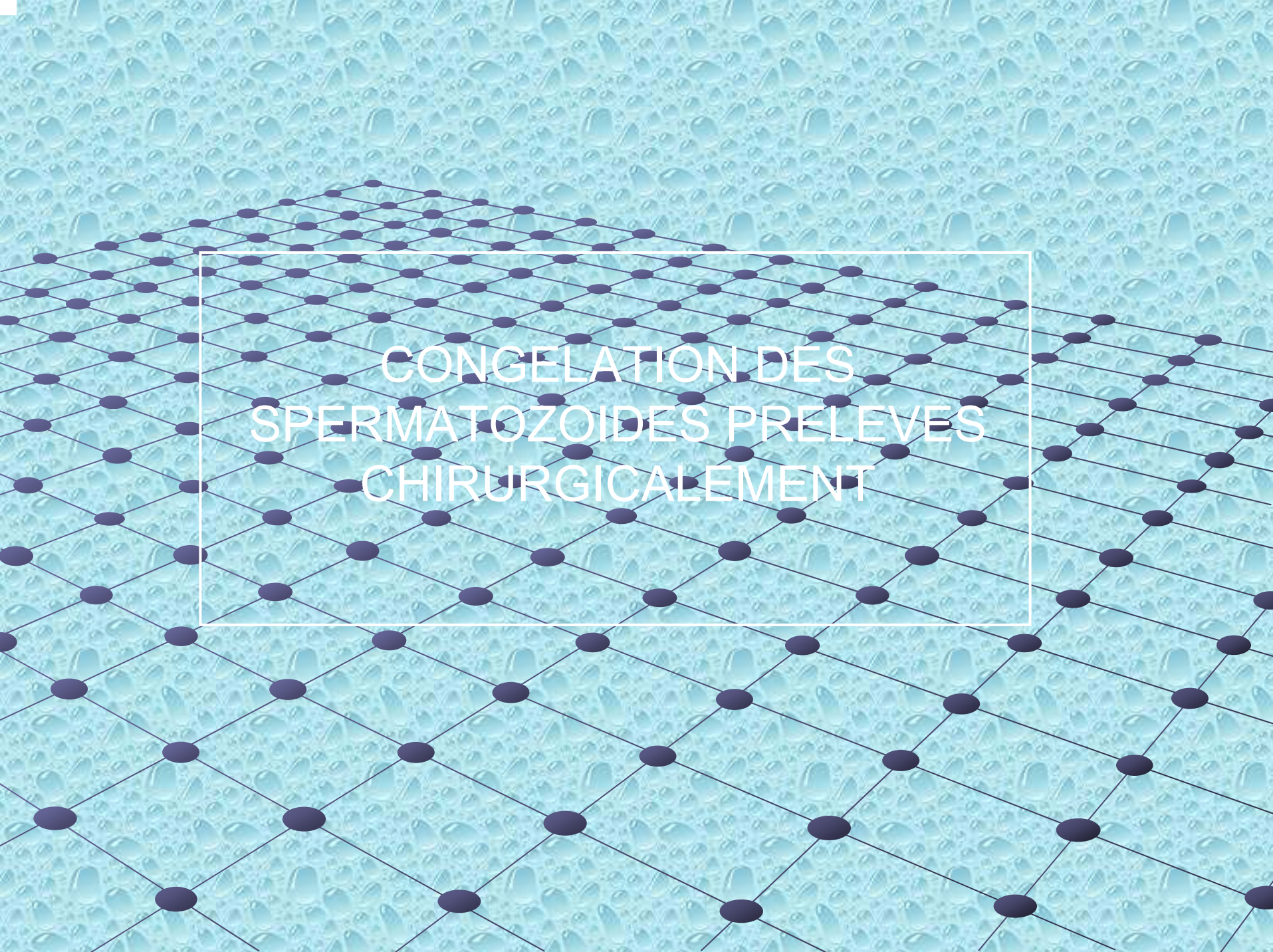


P34 utilisée en test diagnostic pour estimer la fertilité ?



Chez un patient vasectomisé, bien discuter des avantages et inconvénients de tenter la reperméabilisation.

ICSI avec SPZ prélevés chirurgicalement ?

The background features a light blue surface covered in numerous small, glistening water droplets. Overlaid on this is a dark blue grid pattern that recedes into the distance, creating a sense of depth. A white rectangular box is centered on the grid, containing the title text.

CONGELATION DES
SPERMATOZOIDES PRELEVES
CHIRURGICALEMENT

BILAN 1999-2000 aux HUG :

19 cas opérés

ABCD : 3

Spermatogénèse focale : 2

Aplasia germinale : 4 (2 Klinefelter)

Obstruction : 10 (1 vasectomie)

1 discordance ANAPATH-LABO GAMETES

Spermatogénèse focale.

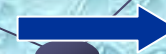
1 Hypospermatogénèse : Post vasectomie.

5 utilisations en ICSI (10 tentatives),



1 grossesse

6 reperméabilisations,



2 grossesse

BILAN 1999-2000 aux HUG : UTILISATION

5 couples,

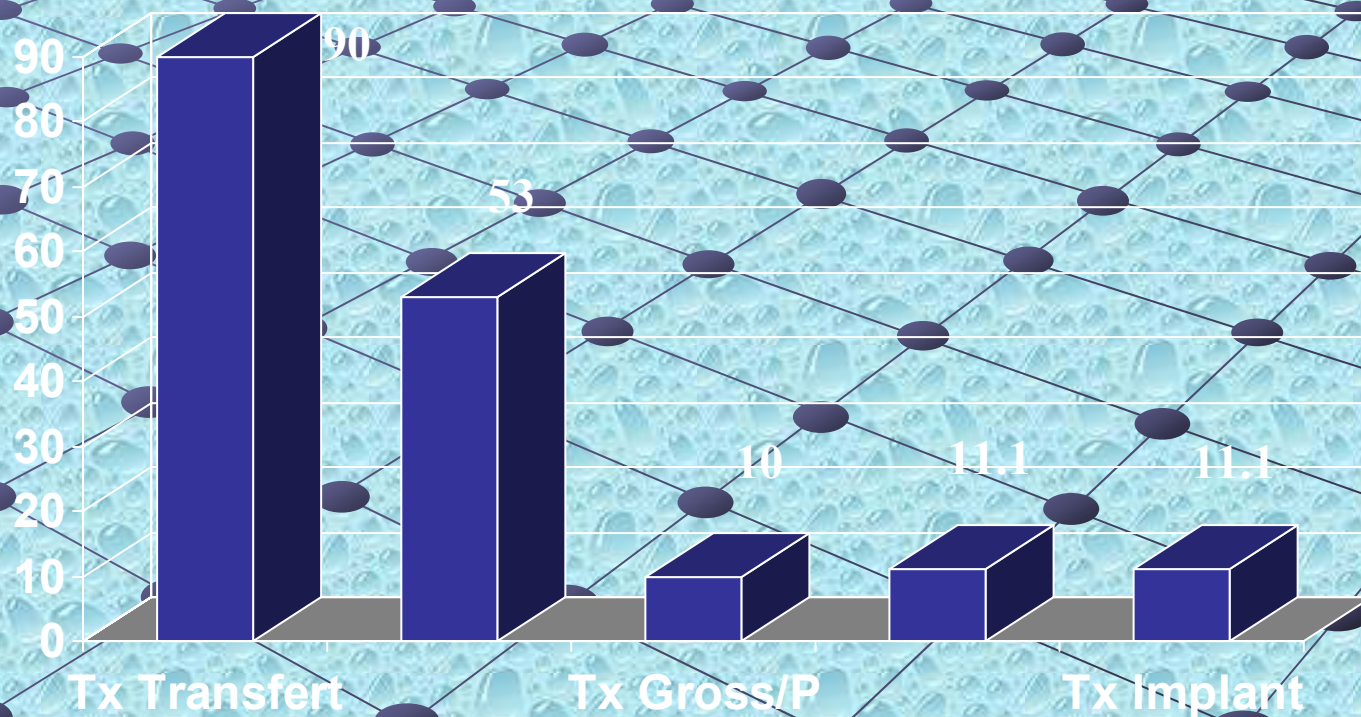
10 ICSI,

40 ovocytes,


21 ovocytes fécondés,

18 embryons transférés,

2 implantations.



NOMBRE DE CONSERVATIONS POST-CHIRURGICALES EN FRANCE : 376



	95	96	97
Azoospermie excrétoire	23	117	138
278			
Azoospermie sécrétoire	-	43	55
98			

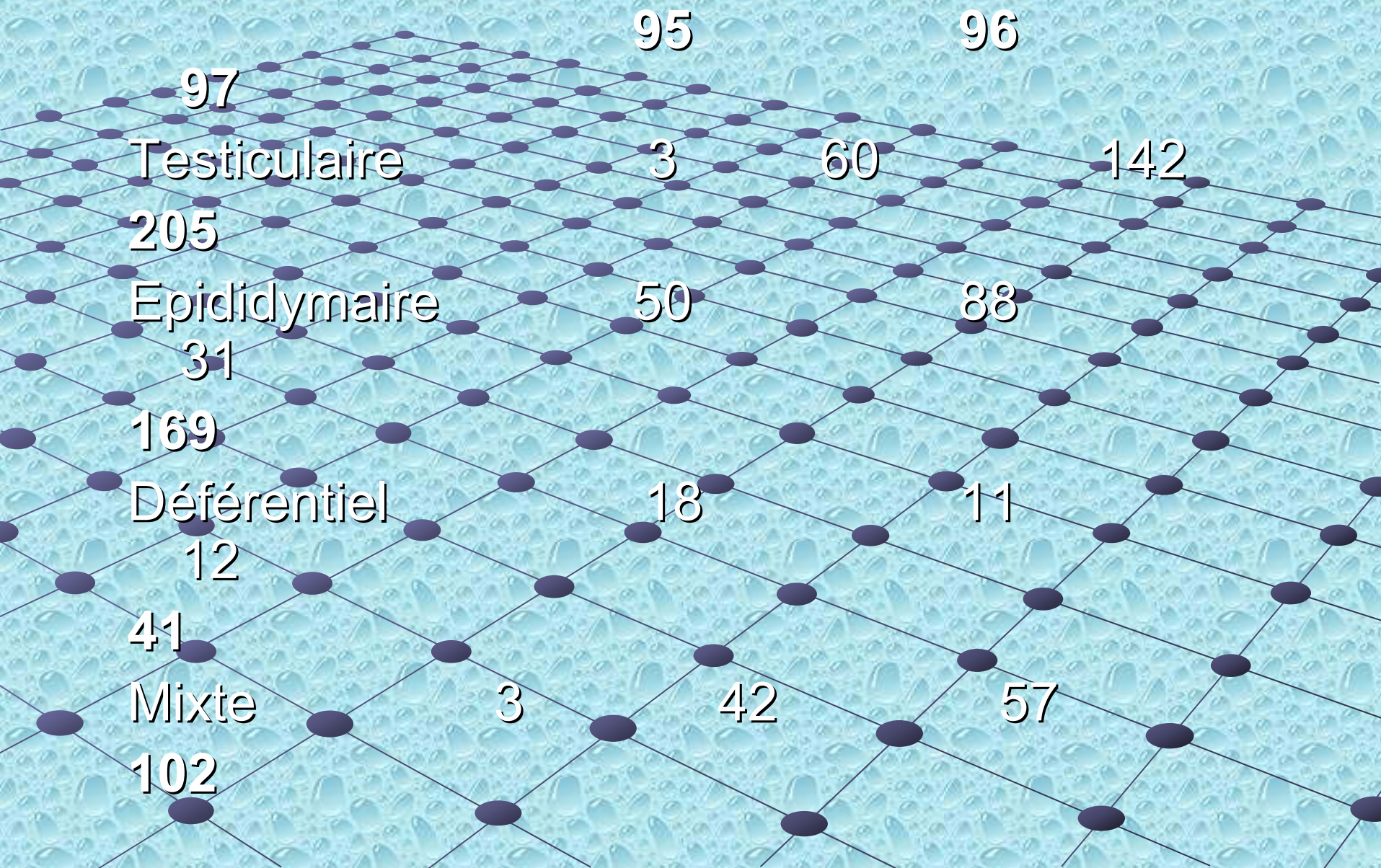
AZOOSPERMIES EXCRETOIRES : 278

	95	96	97
Anéjaculation 27 (10 %)	-	12	15
Post-infectieuses 137 (49 %)	3	62	72
Agénésies 79 (28 %)	8	29	42

AZOOSPERMIES SECRETOIRES : 98

	95	96	97
FSH normale 35 (36 %)	-	15	20
FSH élevée 50 (51 %)	-	20	30
Post-chimio 2 (0,2 %)	-	1	1
Génétique 2 (0,2 %)	-	-	2

TYPE DE PRELEVEMENT



SPERME CONGELE

1996-1997

EPIDIDYME TESTIS

● Couple	137	33
● Ponction	155	39
● Taux fécondation	55 %	53 %
● Grossesse clinique / P	21 %	23 %
● Grossesse évolutive	15 %	18 %

EJACULATION RETROGRADE

➡ **Contrôler le PH et l'osmolarité**

- Problème d'osmolarité des diabétiques.

➡ **Tester le mode spécifique de préparation des spermatozoïde pour décider du type de PMA.**

- Se « battre » pour tenter des IAC.
- ICSI souvent nécessaire.

CONGELATION OVOCYTAIRE

Vitrification des ovocytes matures ou immatures.

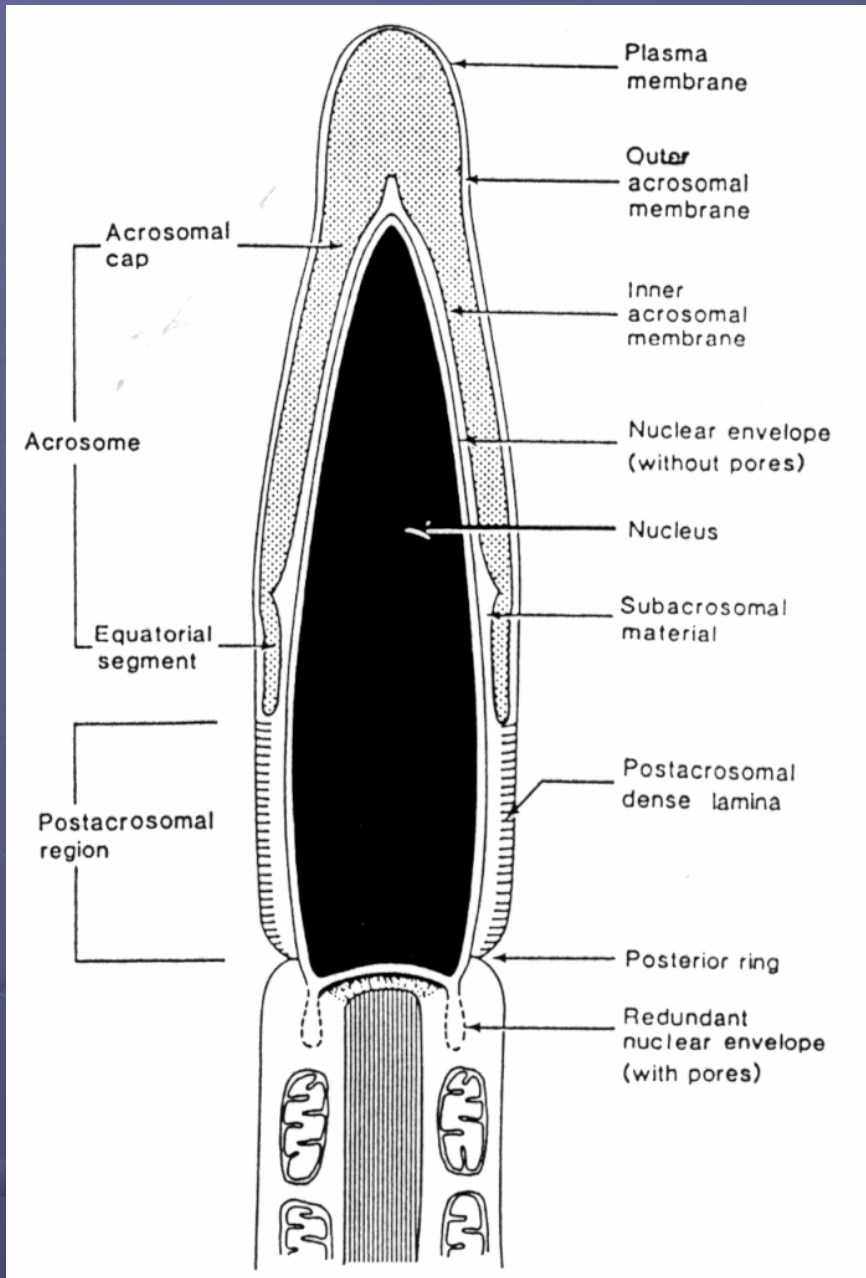
- Technique en progression...il reste encore du travail

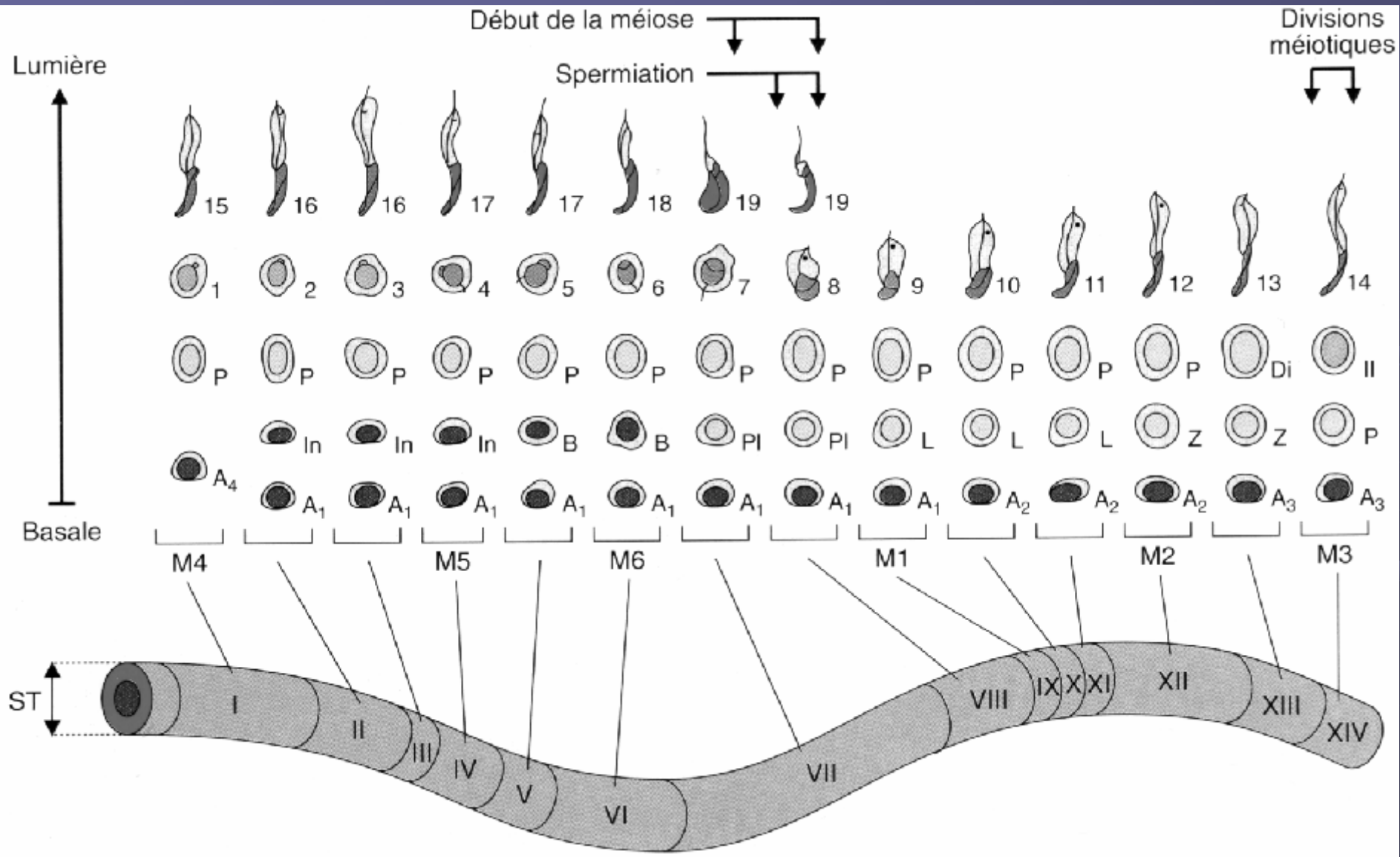
Maturation in vitro des ovocytes immatures.

- Complétion de la méiose facile.
- Fécondation in vitro avec bon succès.
- Développement embryonnaire correct.
- Taux de grossesse catastrophique (2 publications).

Indications.

- Don d'ovocyte, Avant traitement stérilisant.





Assisted Reproductive Technologies (ART)

★ Artificial Insemination (AI)

Origin of sperm : | AIC : AI with conjoined sperm
| AIC : AI with donor sperm

Site of insemination : | ICI : *intra-cervicale* insémination
| IUI : *intra-utérine* insémination

★ In vitro fertilization

IVF : classical IVF

ICSI : **assisted** IVF

SPERM
PREPARATION



AID

AIC

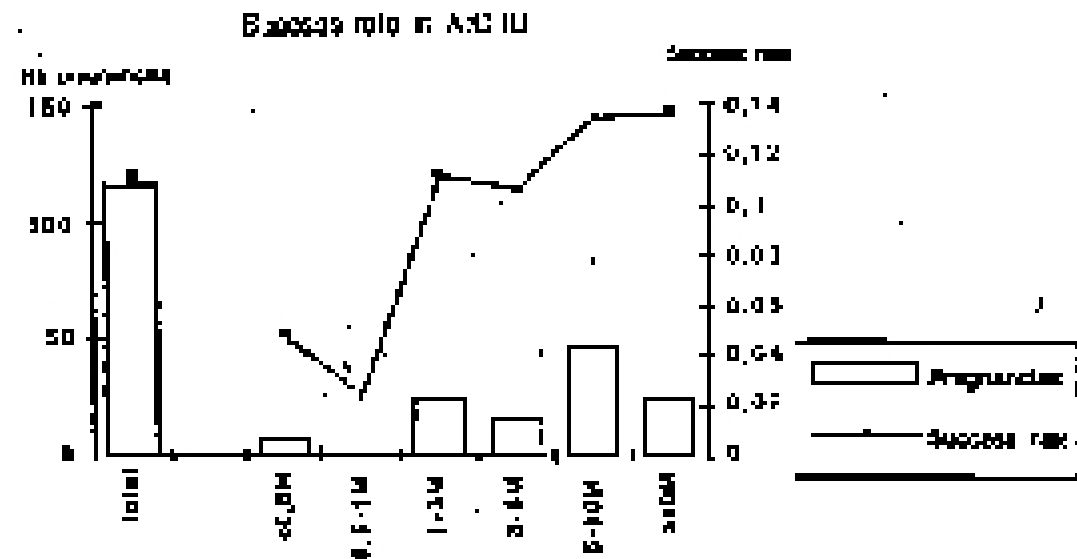
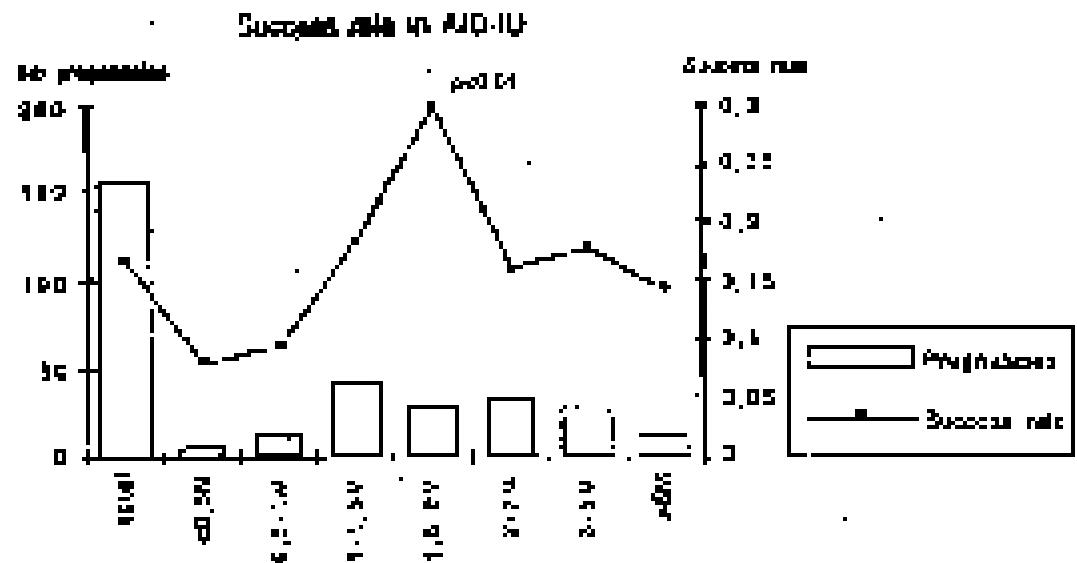
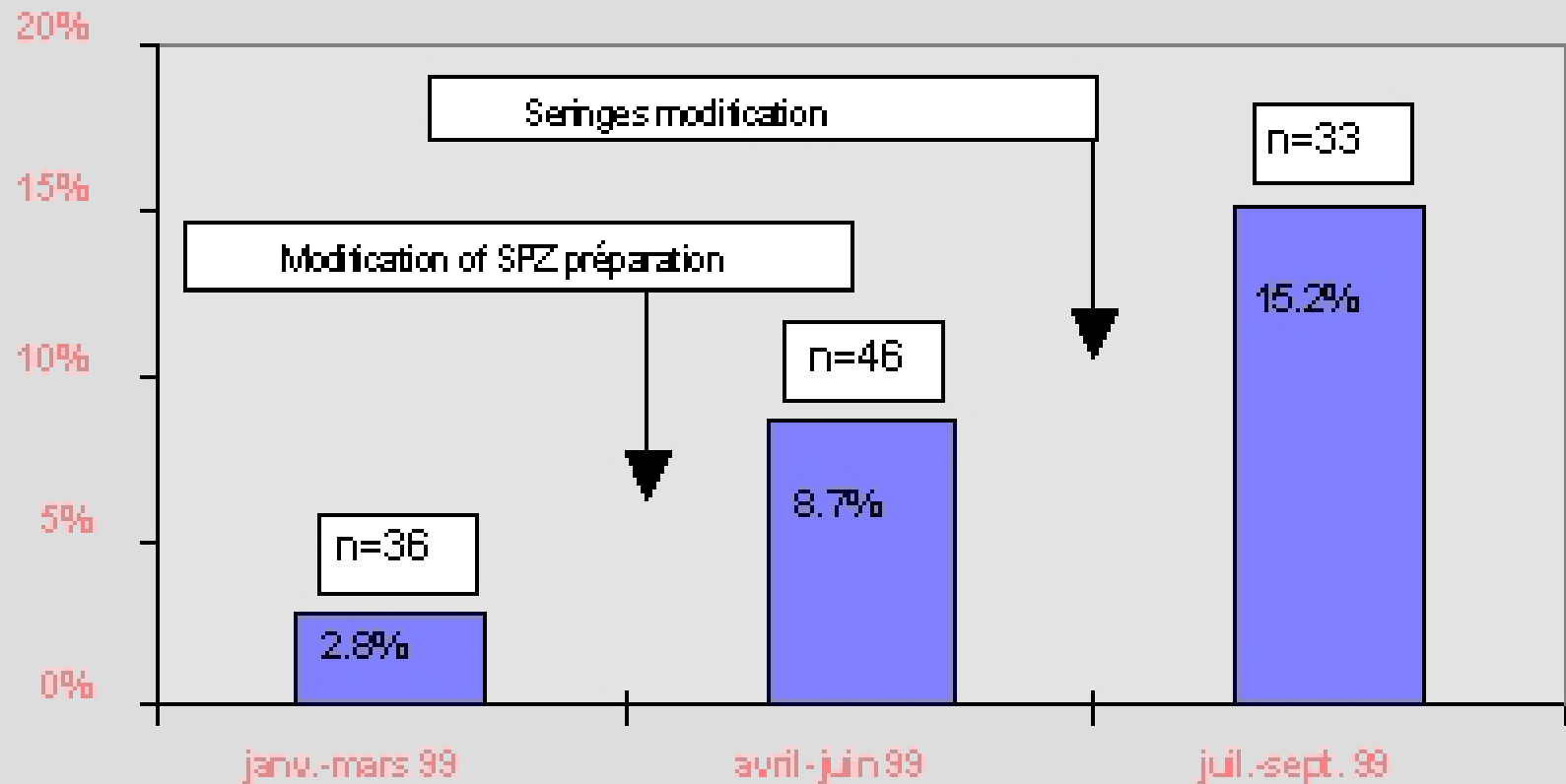


Figura 1 : Taux de succès en gestations intra-utérines avec germes frais de congélation au jour après congélation de documents, en fonction du nombre de spermatozoaires utilisés (millions).

Variation of PR in IUU in 1999

■ Taux de gross. / IAC effectuées



ORIENTATION THERAPEUTIQUE EN A.M.P.

*Critères

- mobilité
- morphologie

*Nombre total de spermatozoïdes mobiles dans la préparation

$\geq 1 \times 10^6$ ----- IAC - IAD
IU

$\geq 0,5 \times 10^6$ ----- FIV classique

$\geq 0,2 \times 10^6$ ----- FIV microgouttes
(10 000 spermatozoïdes/ 20 μ l)

$< 0,2 \times 10^6$ ----- ICST

Different steps of IVF

Section of a mature follicle

JO



Syringes with cumulus-oocyte complexes in follicular fluid

J0

Ovocyte surrounded by the
cumulus-oocyte complex



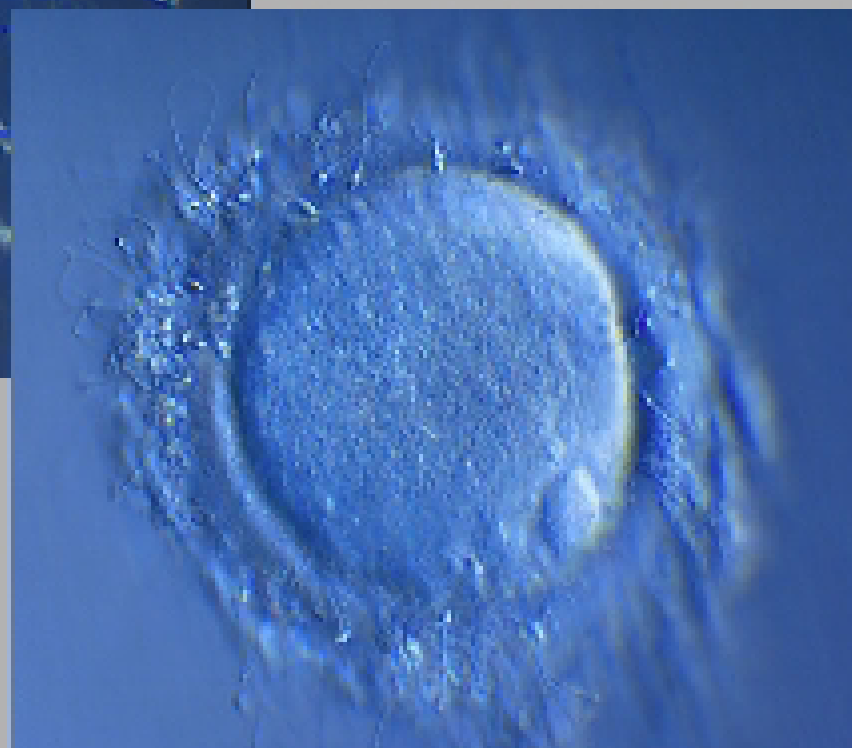
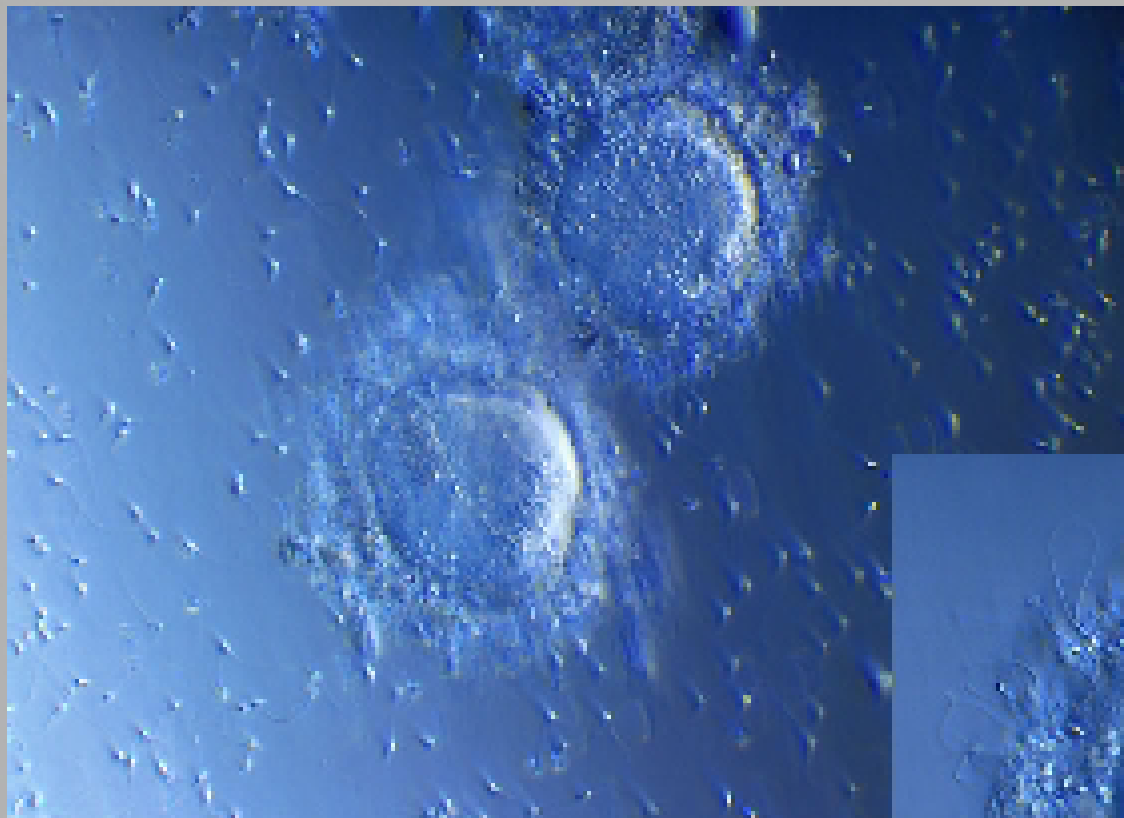
J0

Technician with the sperm preparation



J1

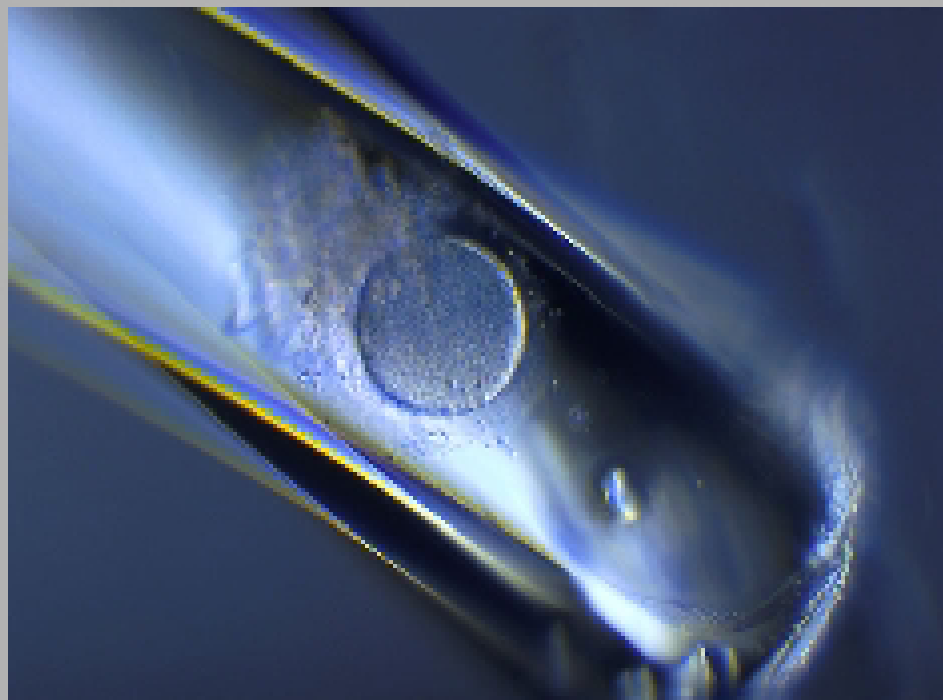
Decoronisation after classical IVF



Unfertilized oocyte

J1

Décoronisation



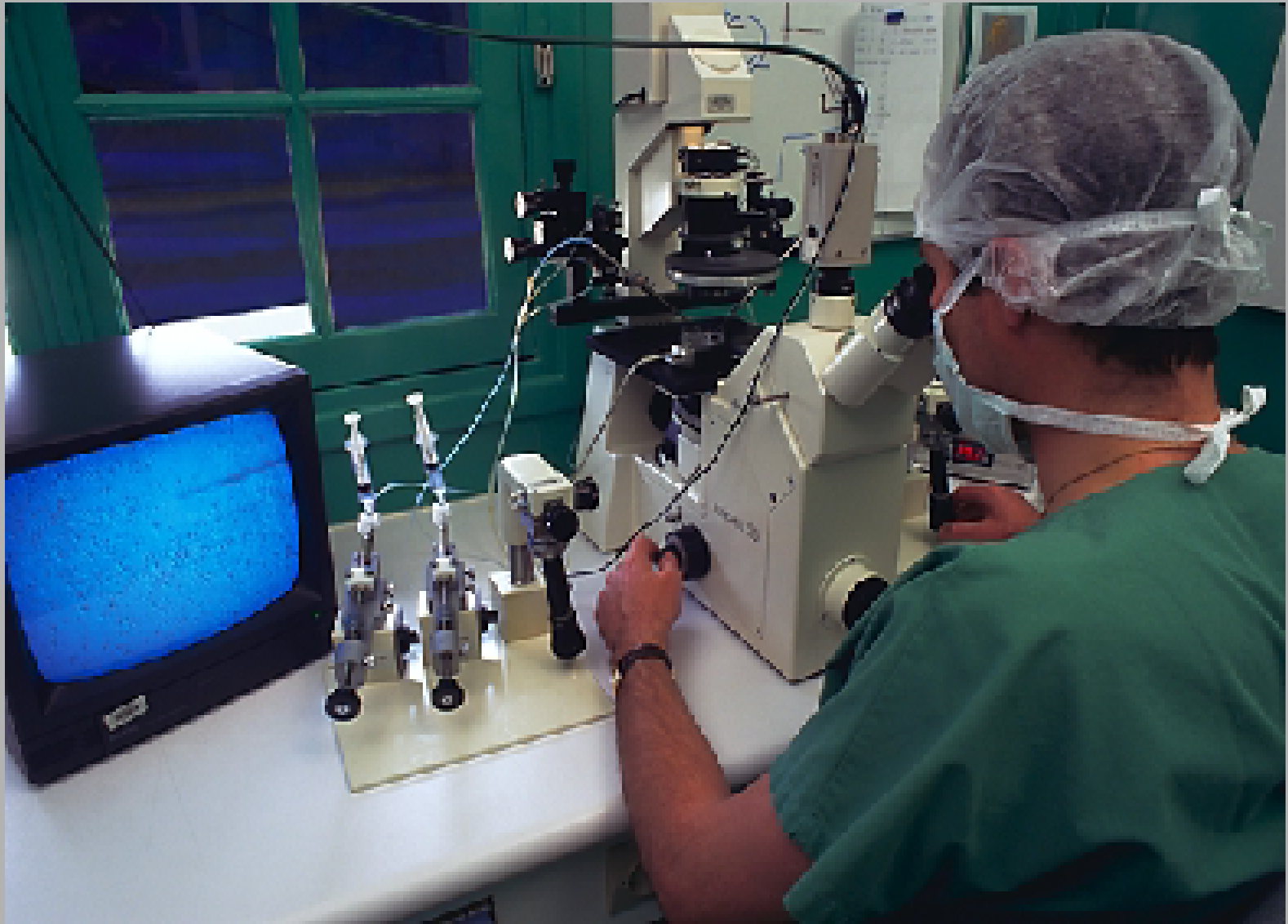


Different steps of ICSI

Decoronisation at J0 before
injection of the mature oocytes
(MII)

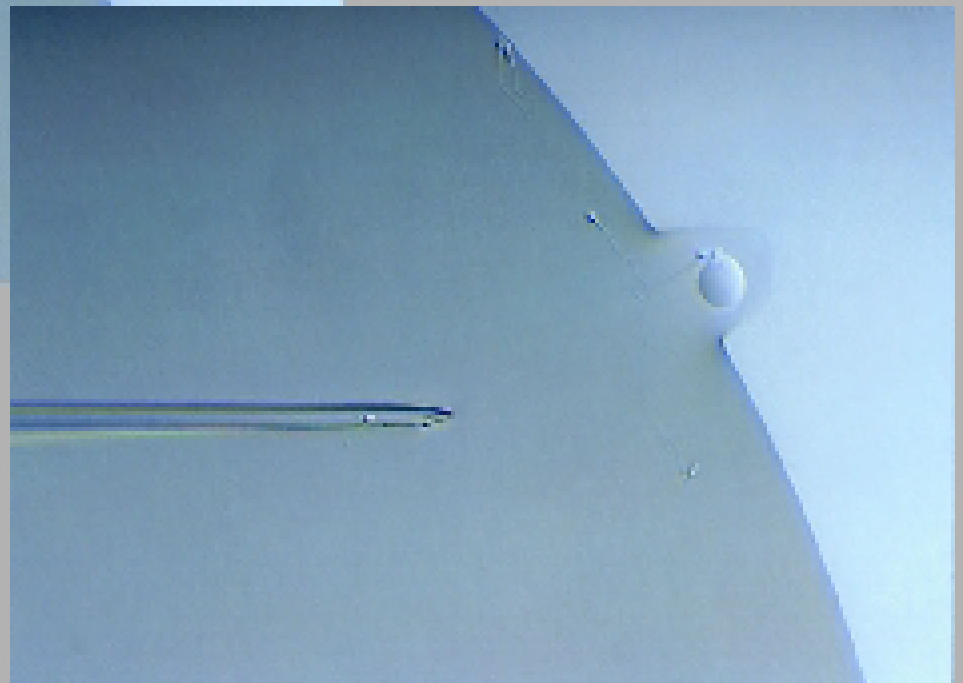
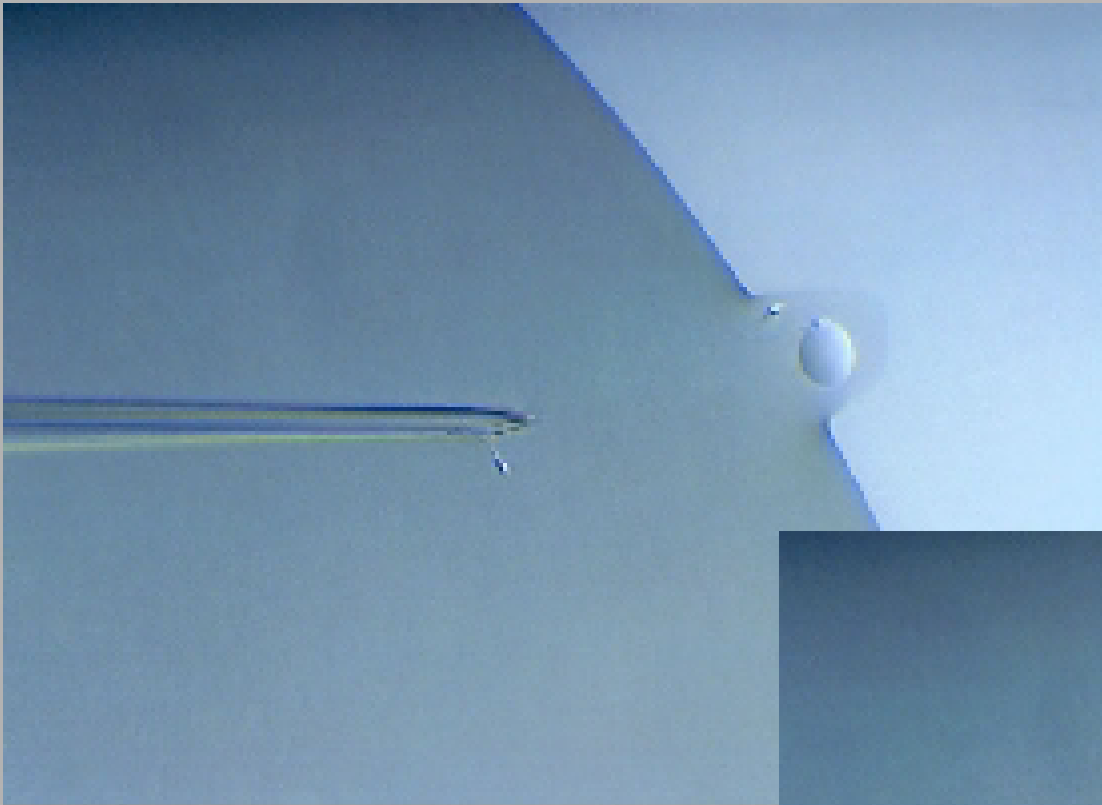
J0

ICSI 1



J0

ICSI 2



J0

ICSI 3



J0

ICSI 4



ICSI et biopsies testiculaires

- Extraction de spermatozoïdes d'un fragment de pulpe testiculaire
 - Causes sécrétoires
 - Causes obstructives
- Spermatozoïdes, Cellules germinales immatures
- Pas de microscope opératoire

ALGER
2003

ICSI / biopsies testiculaires (TESE)

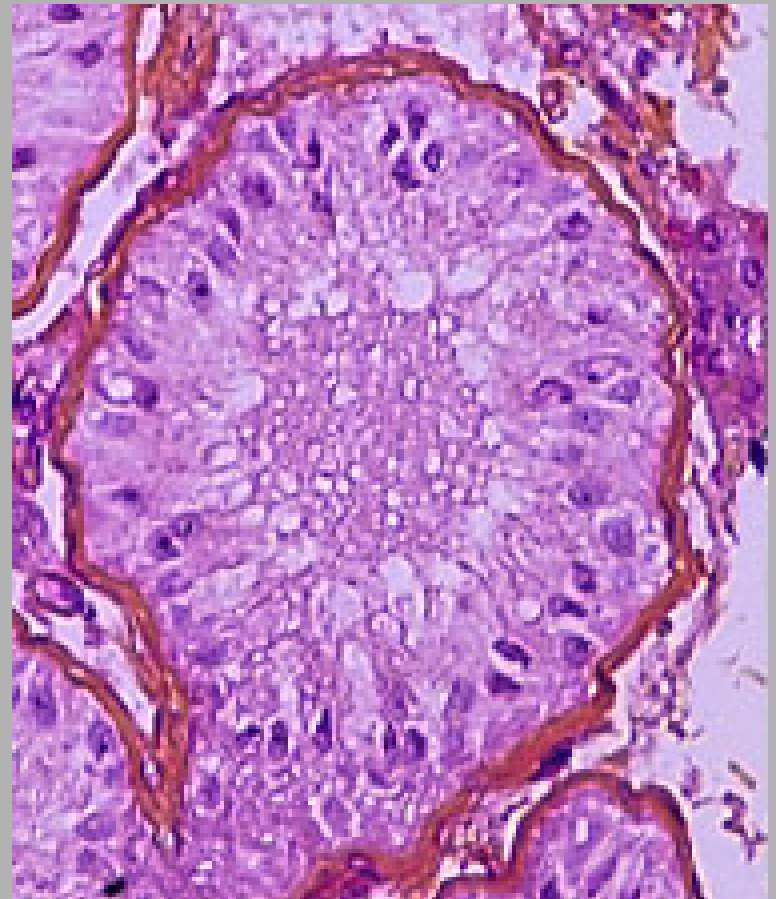


ALGER
2003

ICSI et biopsies testiculaires (TESE)



Normal testicular section



Sertoli cell only
syndrome

Traitement d'une biopsie chirurgicale au laboratoire pour une utilisation optimale en AMP

Prélèvement :

Sans hématies, importance d'une bonne hémostase, Thermo-stabilité du transfert de la biopsie vers labo.

Dilacération :

Qualité de la dilacération, fine sans morceaux, 2 scalpels dans une pétri, petit volume de milieu. **PAS** de centrifugation avant congélation de la suspension de spz.

Congélation des spermatozoïdes :

Protocole identique spermatozoïdes déférent, épидидyme, testiculaires.

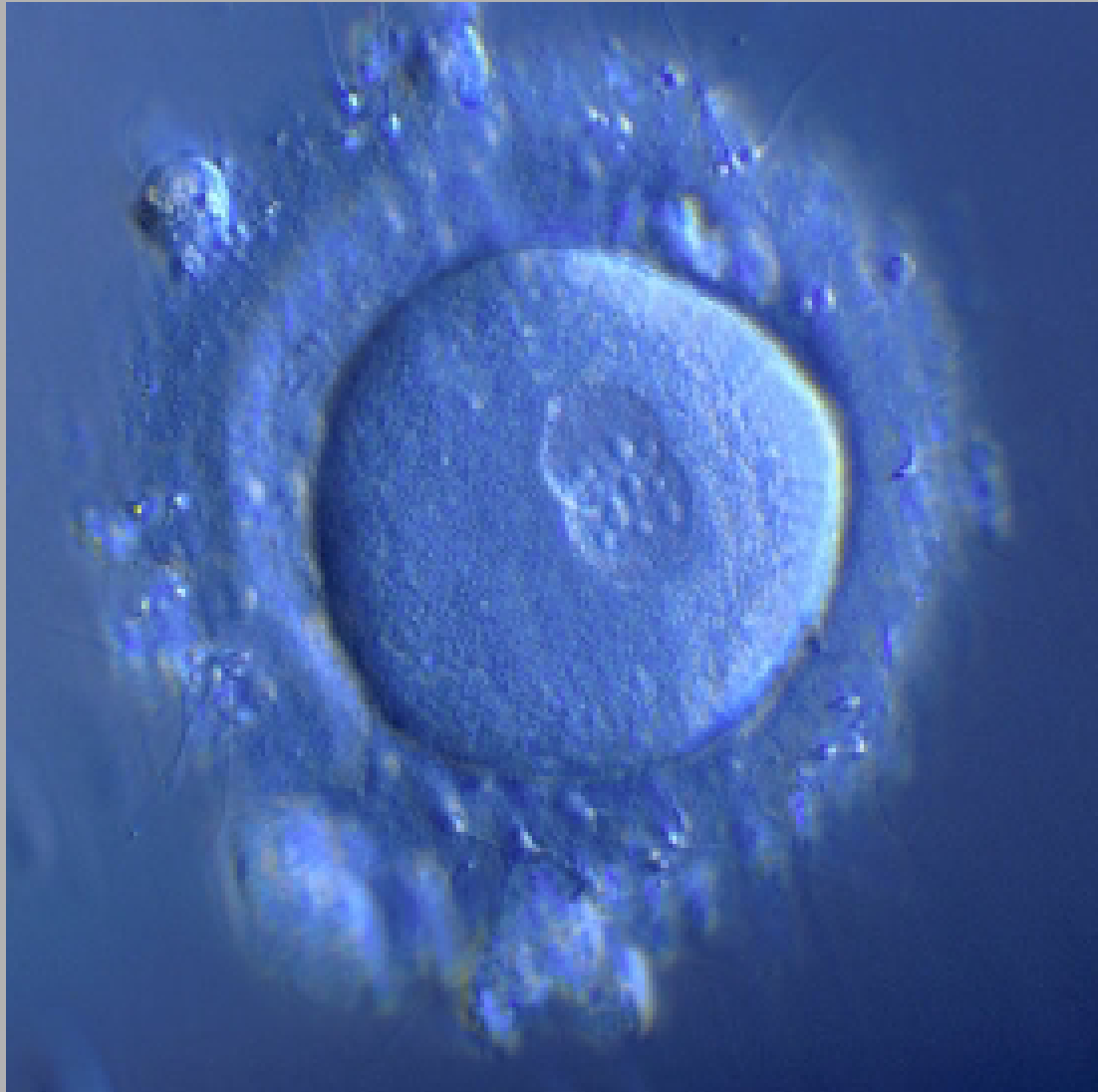
Milieu clair, addition rapide de cryoprotecteur, **TRES** lente élimination à la décongélation, gradient bicouche ou monocouche, lavage simple.



IVF and ICSI

Observation of zygotes 1

J1



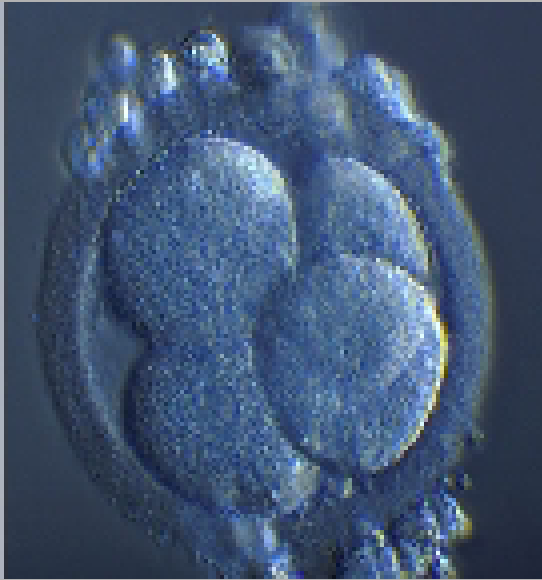
IVF and ICSI

Observation of zygotes 2

J1



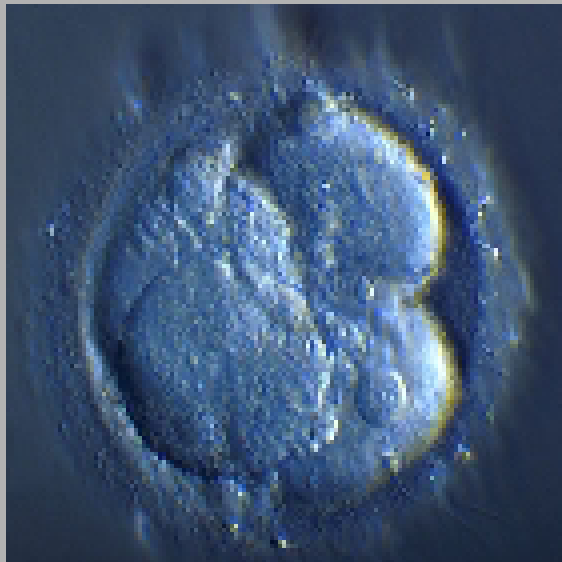
Embryo quality at J2



A



B



C



D

Morula stage J4



Blastocyst stage



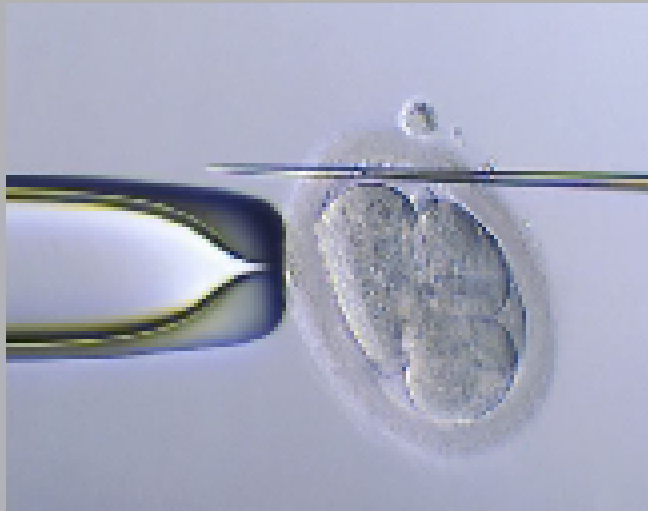
Mechanical Assisted Hatching



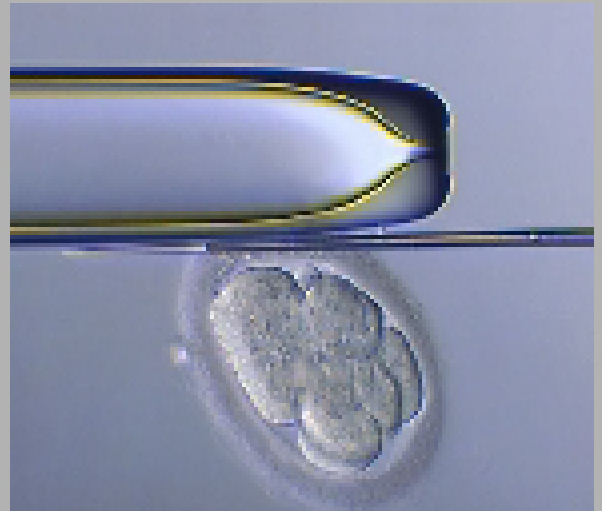
1



2



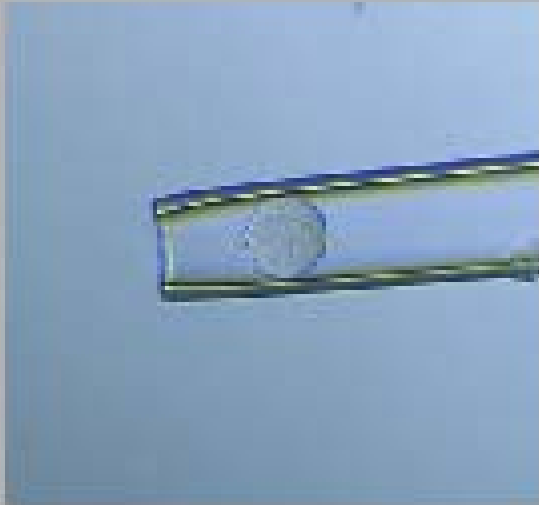
3



4

Preimplantation genetic diagnosis





En CONCLUSION ...

Rien ne doit être négligé dans un travail aussi vaste que celui de permettre à des couples d'avoir de enfants....

La mise en commun de toutes les compétences est nécessaire pour bien évaluer tous les aspects de l'infertilité, du diagnostic au traitement AMP éventuel :

LA GYNECOLOGIE,

LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION,

L'ANDROLOGIE,

L'UROLOGIE,

L'ENDOCRINOLOGIE,

LA GENETIQUE.