Indications à la cryoconservation des gamètes

Hervé LUCAS, Corinne DE VANTERY-ARRIGHI,
Nicole JAQUENOUD, Françoise URNER, Ingrid WAGNER

La LOI Fédérale LPMA du 18 Décembre 1998 entrant en application au 1er Janvier 2001

Chapitre 2, Section 1, Article 3 : ***Bien de l'enfant***

« La PMA est réservée aux couples qui, en considération de leur âge et de leur situation personnelle, paraissent être ***à même d'élever l'enfant jusqu'à sa majorité*** *»*

« Il est interdit d'utiliser les gamètes ou les ovules imprégnées d'une personne après sa mort »

Chapitre 2, Section 3, Article 15 : ***Conservation des gamètes***

« Les gamètes d'une personne ne peuvent être conservées qu'avec son consentement écrit et pendant cinq ans au maximum »

« Un délais plus long peut être convenu avec les personnes qui donnent leurs gamètes à conserver pour assurer leur propre descendance avant un traitement médical ou l'exercice d'une activité qui peut les rendre stériles ou endommager leur patrimoine héréditaire »

« En cas de décès du patient les gamètes devront être immédiatement détruites »

Indications retenues pour la congélation du sperme à la maternité de Genève

Durée de conservation limitée à 5 années.

• Congélation de « confort » pour les patients ayants des ***difficultés à prélever***, ou étant ***absents le jour de l'acte de PMA***.

Durée de conservation supérieure à 5 années.

• Oligospermie < 5 M de spermatozoïdes / éjaculat.

• Ejaculation rétrograde.

• Problème neurologique (paraplégique, neuropathie, diabétique, SEP).

• Prélèvement chirurgical de spermatozoïdes.

• Traitement stérilisant (chimiothérapie, ribavirine...).

• Vasectomie.

Consentement à la congélation de spermatozoïdes

Je soussigné,
Monsieur[1] :
Né le :
N° dossier :
Adresse :

Tél :

Accepte la cryoconservation de mes spermatozoïdes avec l'objectif qu'une procréation médicalement assistée soit pratiquée ultérieurement.

L'indication de la congélation des spermatozoïdes est **sans rapport** avec un traitement ou une activité potentiellement stérilisante. La durée de conservation des spermatozoïdes est limitée à **5 années**[2] .
L'indication de la congélation des spermatozoïdes est **en rapport** avec un traitement ou une activité potentiellement stérilisante. Dans cette situation, la durée de conservation des spermatozoïdes peut être prolongée **au-delà de 5 années**[2] .

Les spermatozoïdes congelés ne pourront être utilisés qu'avec mon accord. J'ai été informé qu'en cas de révocation, par écrit et en tout temps, de mon consentement à la conservation de mes gamètes, d'expiration du délais de conservation, ou de décès, les gamètes verrons leur conservation arrêtée (Art 15.3 et 15.4 de la loi fédérale sur la procréation médicalement assistée du 18 décembre 1998).

Je m'engage également à payer les frais de conservation des mes spermatozoïdes.

Fait à ……, le ……..

Monsieur[3] Signature du médecin

[1] Nom et Prénoms
[2] La loi fédérale sur les procréations médicalement assistées du 18 décembre 1998 prévoit dans son Art. 15.1 « Les gamètes d'une personne ne peuvent être conservés qu'avec son consentement écrit et pendant cinq ans au maximum
[3] Signature du patient précédée de la mention « lu et approuvé »

Demande de décongélation de spermatozoïdes en vue d'une procréation médicalement assistée (PMA)

Je soussigné,
Monsieur[1] :
Né le :
N° dossier :
Adresse :

Tél :

autorise la décongélation de spermatozoïdes[2] :

☐ Ejaculés,

☐ Prélevés chirurgicalement,

afin que soit pratiquée, avec mon accord, une procréation médicalement assistée.

Fait à ……, le ……..

Monsieur[3] signature du médecin

[1] Nom et Prénoms
[2] Cocher la case correspondant à votre cas
[3] Signature précédée de la mention « lu et approuvé »

PROBLEMES POSES PAR LA LOI ET PAR LA GESTION DE LA BANQUE

➲ Rapport d'activité annuel du laboratoire obligatoire transmis à l'office fédéral de la statistique.

- Nombre de spermes congelés, utilisation des gamètes (Art 11, loi LPMA).

➲ Envoie annuel d'une facture au patient pour frais de conservation de ses gamètes (150 F).

- Retour d'information des services cliniques vers le laboratoire pour les patients DCD.

- Echange annuel de listes de patients entre le labo et les services cliniques (en préalable à l 'envoi du courrier au patient)

Dispositions pénales de la loi LPMA

Défaut de consentement (Art. 34).

• Quiconque conserve des gamètes sans avoir obtenu le consentement, sera puni de l ’emprisonnement ou de l’amende (100 000 F).

Utilisation des gamètes post-mortem (Art. 37).

• Quiconque utilise les gamètes d’une personne après son décès, intentionnellement, sera puni de l ’emprisonnement ou de l’amende (100 000 F).

Ordonnance sur le contrôle du sang, des produits sanguins et des transplants

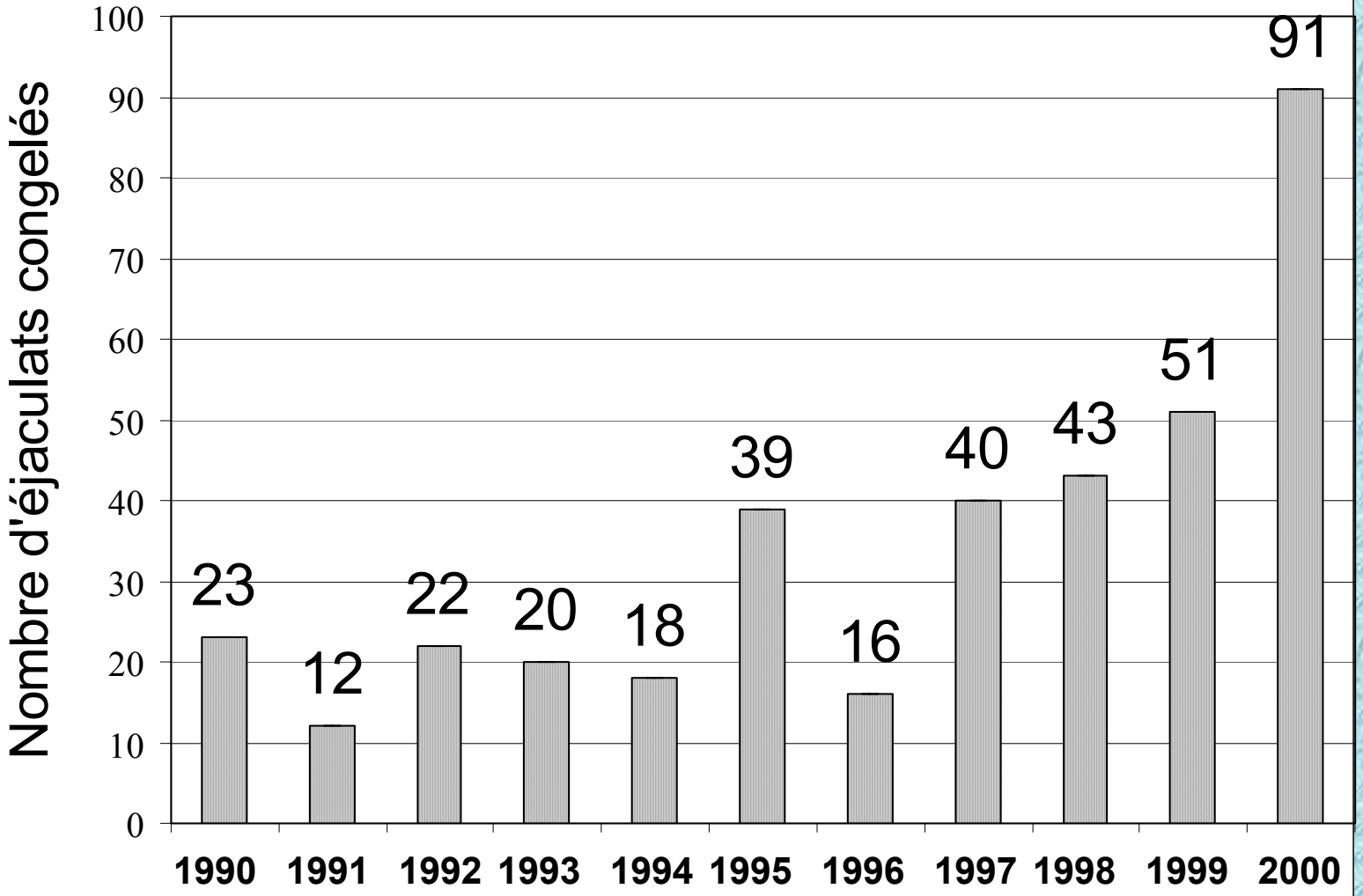
Tests obligatoires (Art. 25).

- *Le transplant doit être testé sur la présence d'agents pathogènes.*

VIH 1+2, HBsAg, HCV

- *Les inséminations artificielles exigent en sus des tests de dépistage des Gonocoques, du Tréponème pâle, de l'Herpes genitalis, du Cytomégalovirus, du Trichomonas vaginalis, du Chlamydia trachomatis, du Mycoplasma hominis, et de l'Ureaplasma urealyticum.*

Cryconservation du sperme aux HUG



METHODES DE CRYOCONSERVATION DU SPERME

➲ Dilution de l'éjaculat avec un milieu cryoprotecteur (glycérol 15 %).

➲ Conditionnement en paillettes scellées de 0,3 ml.

➲ Nombre de recueils en fonction de la qualité du sperme et de la procréation médicalement assistée (PMA) qui sera proposée :

- IIU > 1 M spermatozoïdes
- FIV > 0,5 M spermatozoïdes
- ICSI > quelques spermatozoïdes

➲ Nombre de paillettes suffisant pour assurer les PMA.

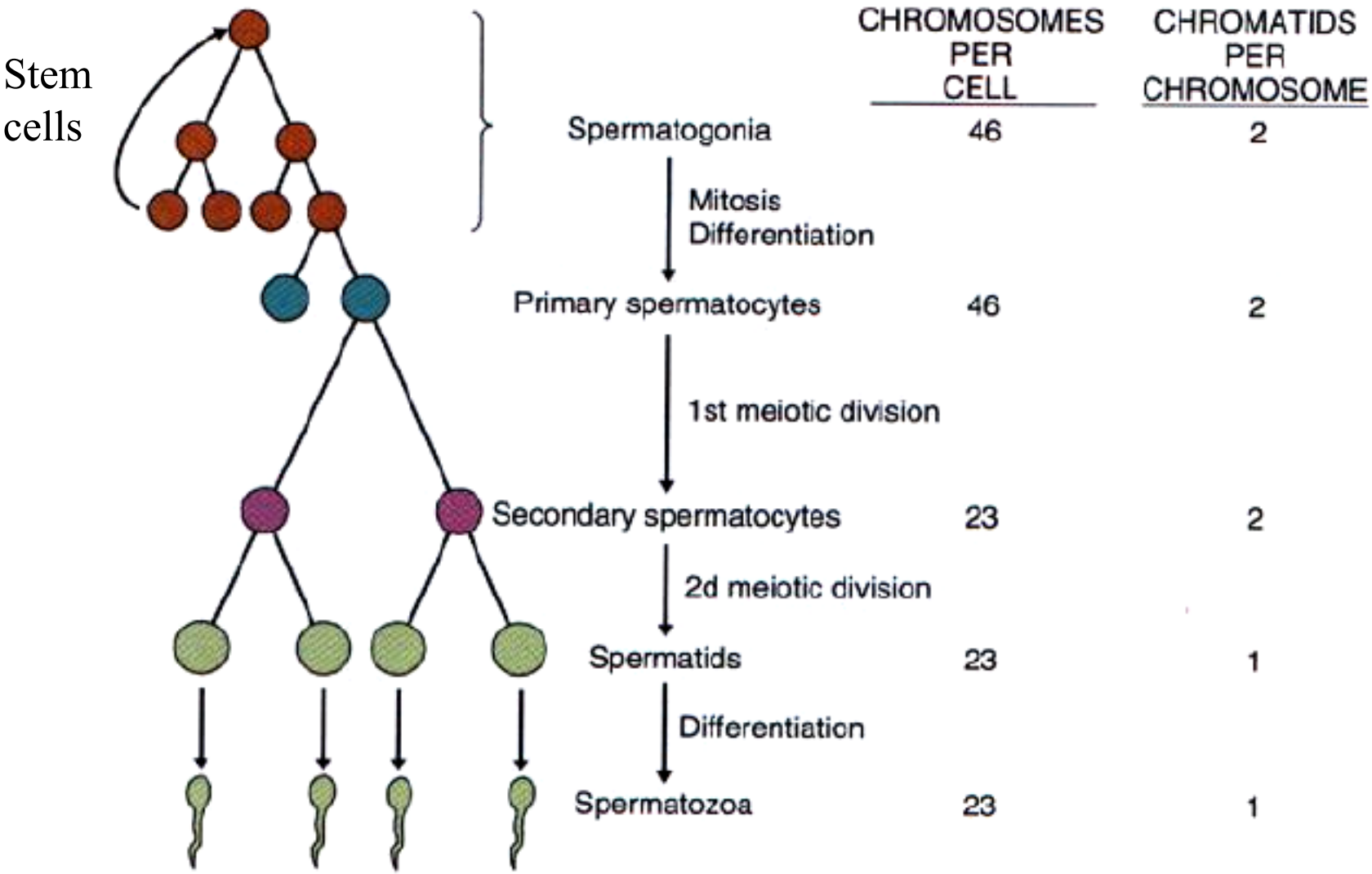
CONGELATION DU SPERME

AVANT CHIMIOTHERAPIE

Durant les 25 dernières années, le diagnostic et le traitement des cancers a beaucoup progressé.

Le taux de survie des jeunes patients approchant 80 % et la plupart d'entre eux ayant reçu des traitements radio-chimiothérapiques, leur fonction reproductive devient très importante à prendre en considération.

Spermatogenesis



developing spermatogonia > stem cells > spermatocytes > spermatides > spermatozoa

L’effet gonadotoxique des radiations

- Effet dose-dépendant sur la gonade

- Inflige des dommages à l’ADN cellulaire qui se traduisent par des cassures chromosomiques des spermatogonies induisant des infertilité ou des azoospermies.

Recovery of spermatogenesis after irradiation

Dose (Gy)	Recovery time
> 0.1	9-18 months
0.15-0.4	10-18 months
0.4-2	2-5 years
2-6	> 5 years

(Yeung et al., 1998)

L’effet gonadotoxique des agents chimiothérapiques est en rapport avec :

- La classe d’agent : agents alkylant - moutardes azotées
  antimétabolites - antibiotiques antitumeur...

- La voie d’administration
- La dose
- La fréquence des cures
- L’association de drogues
- Le délais de reprise de la spermatogénèse dépend des dommages causés aux spermatogonies.

Les dégats génétiques des spermatozoïdes causés par les agents chimio- radiothérapiques

- Augmentation des fragmentations chromosomiques après radio- et chimiotherapie (Es-Slami et al., 1996; Chatterjee et al., 2000)

- Anomalies structurales multiples immédiatement après la radiothérapie pour les spermatides et les spermatozoïdes (Rousseaux et al., 1993)

- Augmentation de la fréquence des aneuploidies (chromosome 1, 6, 11, X and Y) dans les spermatozoïdes après chimiothérapie et radiothérapie (Monteil et al., 1997; Robbins et al., 1997)

ORGANISATION de LA PRISE EN CHARGE

➲ Recueil du sperme effectué entre le moment du diagnostique et le début du traitement chimio/radio.

- Accueil adapté par les infirmières et les techniciens du laboratoire.

➲ Patient vu en consultation après le recueil de sperme :

- Information sur la qualité de son éjaculat.
- Information sur les lois régissant la cryoconservation.
- Eventuelle participation de notre psychiatre à l'entretien.

Suivi de la fertilité des hommes ayant congelé leur sperme avant un traitement pour cancer du Testis

Données CECOS Cochin AP/HP (France)

	1974-1980	1981-1985	1986-1990
Nombre hommes	114	212	329
Perdus de vue	48 (42%)	83 (39%)	70 (21%)
Décédés	11 (9,6%)	11 (5,2%)	14 (4,3%)
Grossesse spontanée	33 (29%)	38 (18%)	56 (17%)
Spermes congelés utilisés	23 (20%)	27 (13%)	16 (5%)
Spermes encore en banque	3 (3%)	28 (13%)	79 (24%)

Raisons pour lesquelles la cryoconservation n'a pu être réalisée chez les hommes ayant un cancer du testis

CECOS Cochin AP/HP

Prélèvement impossible	4,7 %
Azoospermie	6,2 %
Concentration et mobilité très basses	8,2 %
Immobilité lors de la décongélation	3,5 %
TOTAL	**22,6 %**

Mesures de protection gonadique aux effets nocifs des traitements anticancéreux

Mise au repos de la gonade par agonisation/antagonisation de la GnRH.

La spermatogénèse étant interrompue et les synthèses cellulaires réduites au minimum : les traitements anticancéreux seront peut-être moins nocif pour un rétablissement ultérieur de la fertilité.

Hypothèse de travail pour la mise en place d'une étude prospective randomisée.

BILAN CECOS FRANCAIS (1995)

	CECOS
Conservation brèves	**595** (14,4 %)
Avant vasectomie	**277** (6,7 %)
Avant traitement stérilisant	**1372** (33,3 %)
Indication hématologiques	**505** (12,3 %)
Dont Hodgkin	**271** (6,6 %)
Indications urologiques	**584** (14,2 %)
Dont cancer du testis	**515** (12,5 %)
TOTAL	**4119**

Conclusions :

Faut-il utiliser en priorité le sperme cryoconservé avant le traitement stérilisant ou bien laisser le couple librement procréer ?

Pas de démonstration statistiquement significative d'une majoration de la prévalence des malformations congénitale quand la fertilité naturelle est à l'origine de la grossesse….

… Mais la statistique a été réalisée sur des effectifs probablement trop faible.

Les anomalies géniques engendrées par les traitements pourraient ne s'exprimer qu'à la 2ème génération ou plus tard dans la vie du conceptus (expérimentations animales).

CONGELATION DU SPERME

CHEZ LES ADOLESCENTS

Marson et al. 1988. Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. J. Reprod. Fertil. 82: 199-207

Les mécanismes de production du plasma séminal et d'éjaculation sont fonctionnels plus tôt que l'émission des spermatozoïdes.

Muller et al. 2000. Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. *Med. Pediatr. Oncol*. 34: 191-194

41 jeunes garçons de 13-18 ans.

21 (51%) sperme obtenus par masturbation ou vibreur ou électroéjaculation sous anesthésie (n=3). 4 spermes non congelables.

Dans 20 cas (49%), pas d'accord pour cryobanking.

La possibilité de congeler des spermatozoïdes doit être discutée avec le patient et ses parents (consentement).

Rôle des psychologues-psychiatres. Organisation du prélèvement nécessaire. Imaginaire ou imagerie?

Kliesch et al. 1996. Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Med. Pediatr. Oncol*. 26: 20-27

Comparaison des taux hormonaux (LH, FSH, Testo) et de la qualité des spermes de trois groupes de patients cancéreux :

Gpe 1: 12 garçons 14-16 ans

Gpe 2: 17 jeunes de 18-20 ans

Gpe 3: 210 adultes.

LH plus basse chez adolescents que chez adultes

FSH augmente avec l'âge

Testostéronémie et volume testis a la même distribution dans les trois groupes.

Caractéristiques des spermes non différentes d'un groupe à l'autre.

Janczewski et Bablock, 1985. Semen characteristics in pubertal boys. Semen quality after first ejaculation. *Arch. Androl*. 15: 199- 205

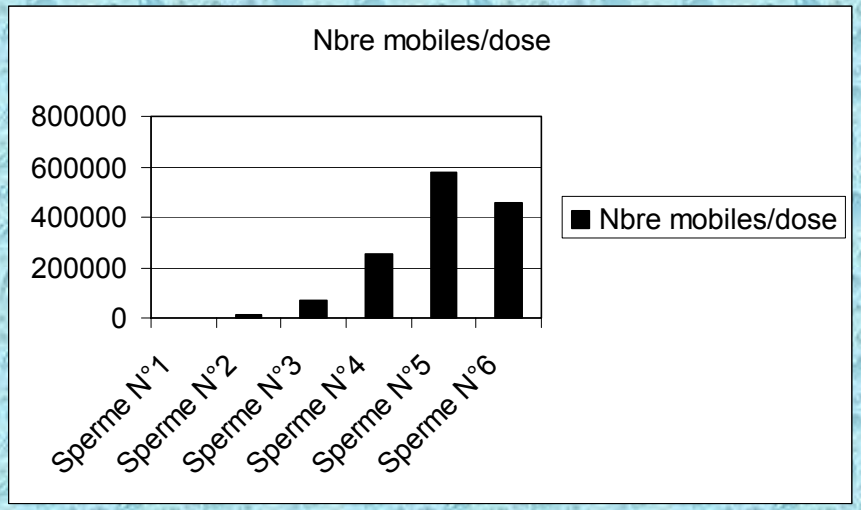
La concentration spermatique et la qualité générale du sperme s'améliore en reproduisant les éjaculations.

Importance du délais d'abstinence.

Le cas de David (14 ans): plusieurs éjaculats obtenus avant TTT.

	Sperme N°1	Sperme N°2	Sperme N°3	Sperme N°4	Sperme N°5	Sperme N°6
Date	30-nov	07-déc	14-déc	21-déc	11-janv	18-janv
Volume (ml)	3,9	2,7	1	1,4	1,5	0,85
Nbre total SPZ (M)	0,39	6	15	42	63	29
% mobiles	5	36	19	27	50	52
Nbre doses	5	10	9	12	11	6
Nbre mobiles/dose	rares	10 000	70 000	256 000	576 000	460 000

Le type de procréation assistée sera décidé en fonction de la qualité des éjaculats congelés (IA ou FIV). Importance du conseil pour le désir d'enfant futur.



Thérapeutiques envisageables pour David : IA avec plusieurs doses ou FIV.

Conclusions:

Cryopréservation du sperme des adolescents envisageable

-Avant chirurgie testiculaire/ urogénitale (Biopsie Testis?).

-Avant traitement potentiellement stérilisant (Biopsie Testis en cas d'azoospermie à discuter).

Méthodologie de la prise en charge multidisciplinaire à adapter pour ces adolescents.

Objectifs de la congélation :

Avoir du sperme en banque avant que des ACAS soient produits suite à la chirurgie urogénitale, ou qu'une stérilité définitive apparaisse après TTT stérilisant. L'objectif étant de pouvoir effectuer dans le futur, la PMA la plus simple possible (IA).

CONGELATION DU SPERME

AVANT VASECTOMIE

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

- PRODUCTION D ’ANTICORPS anti-SPERMATOZOIDES.
- DEGATS IRREVERSIBLES DE L’EPIDIDYME.

RECEPTEURS SPERMATIQUES IMPLIQUES DANS L'INTERACTION GAMETIQUE HUMAINE

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

Localisée sur la portion antérieure de la tête des spermatozoïdes

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

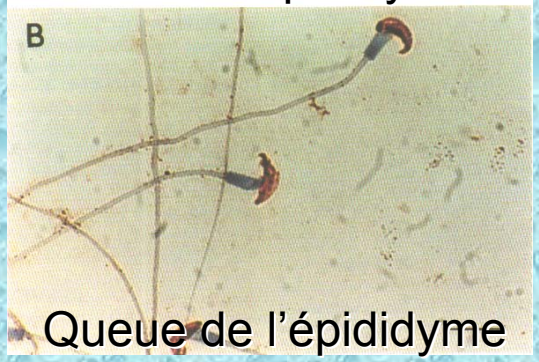
- Inhibe la fixation des spermatozoïdes à la ZP
- Sans action sur la mobilité des spermatozoïdes
- Sans action sur la fusion avec l'ooplasme

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

(Légaré et al., 1999)

P26h

Tête de l'épididyme



Queue de l'épididyme

Transfert de P26h actif par l'intermédiaire de prostasomes

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

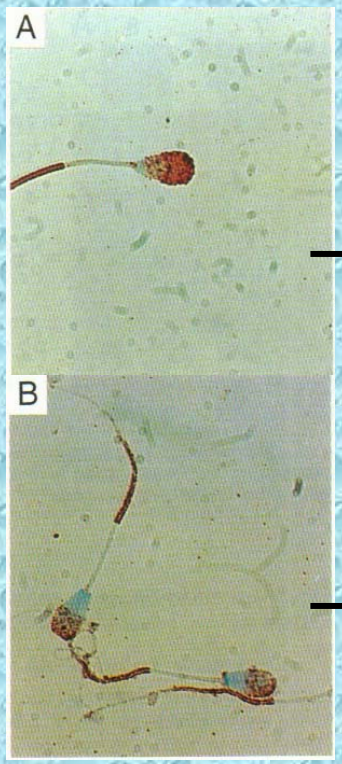
Phospholipase C spécifique a permis de démontrer le rôle des phosphatidylinositol-anchored proteins dans l'ancrage de P26h aux prostasomes et aux spermatozoïdes.

Corrélation entre fertilité et P25b

(Parent et al., 1999)

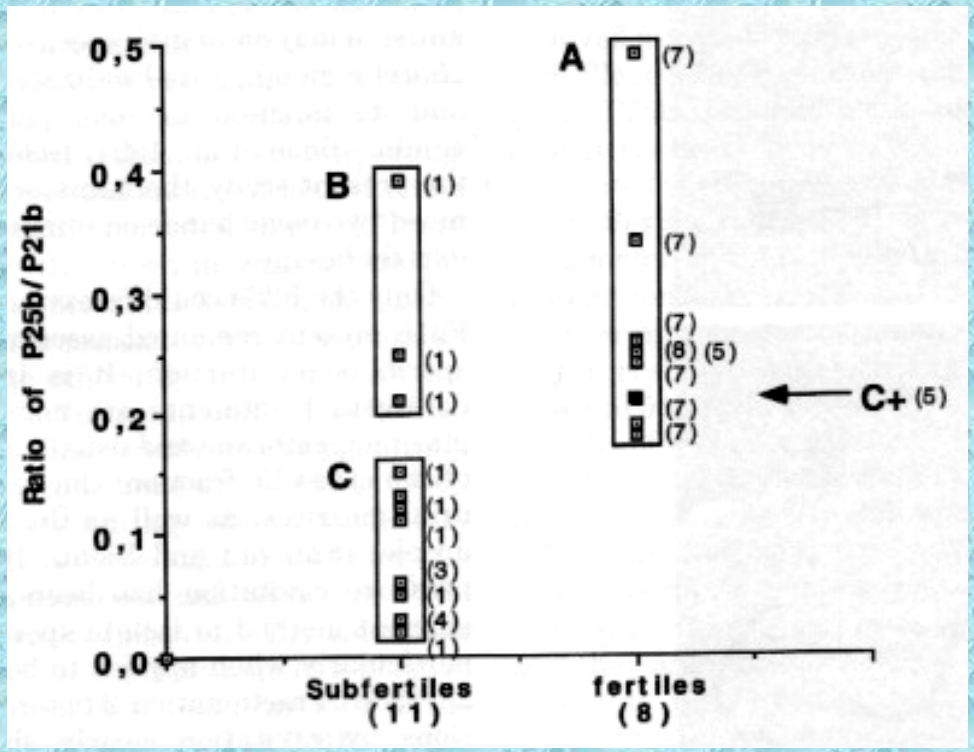
P25b est sur la portion antérieure de la tête et corrélée avec la fécondance.

P25b



Fertile

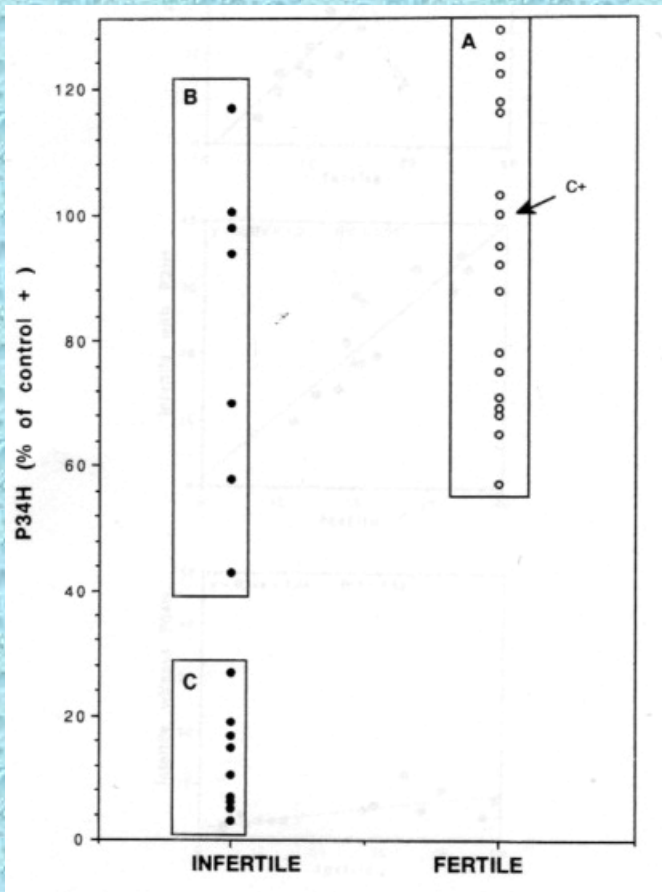
Subfertile



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

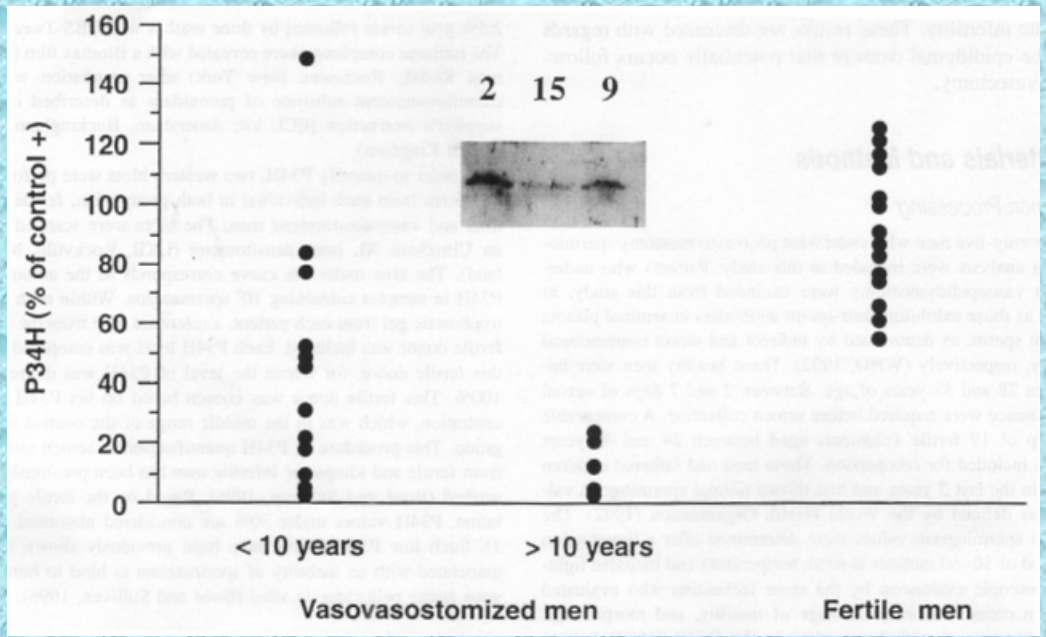
- **+**

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

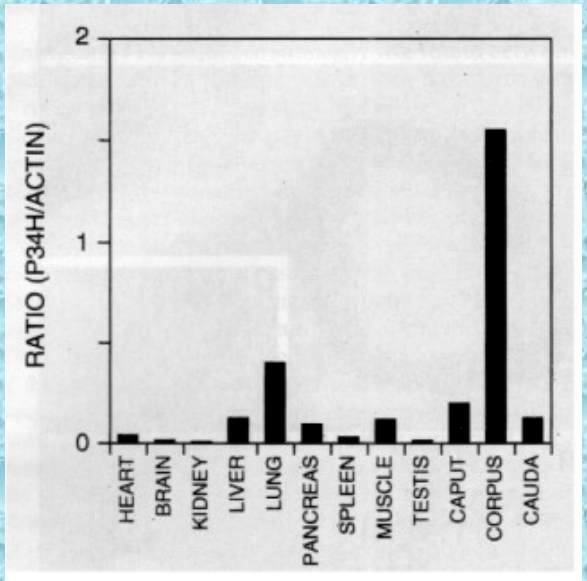
P34H parfois normale chez les vasectomisés < 10 ans

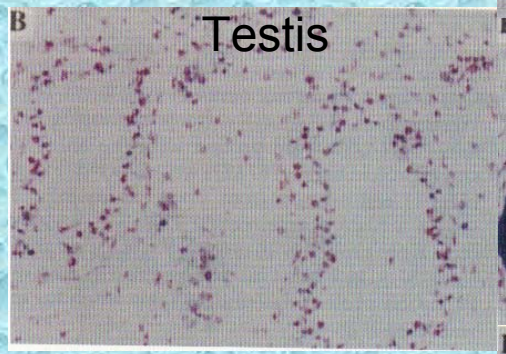
P34H est un marqueur épididymaire qui démontre que la vasectomie cause des altérations de l 'épithélium épididymaire

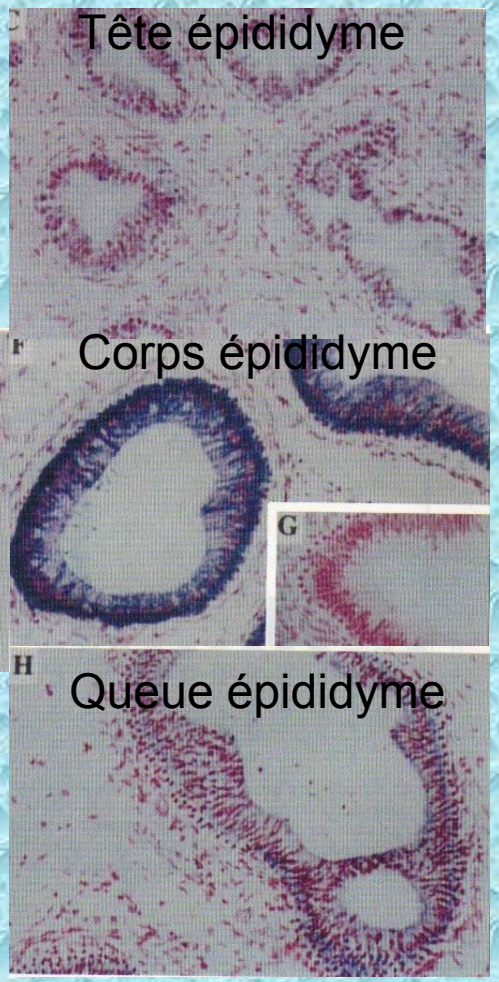
Clonage de la protéine P34H

(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 pourrait être utilisée dans le cadre d'un test diagnostique pour estimer la fécondance d'un sperme ?

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

  ICSI avec SPZ prélevés chirurgicalement ?

CONGELATION DES SPERMATOZOIDES PRELEVES CHIRURGICALEMENT

BILAN 1999-2000 aux HUG :

19 cas opérés

ABCD : 3

Spermatogénèse focale : 2

Aplasie 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,

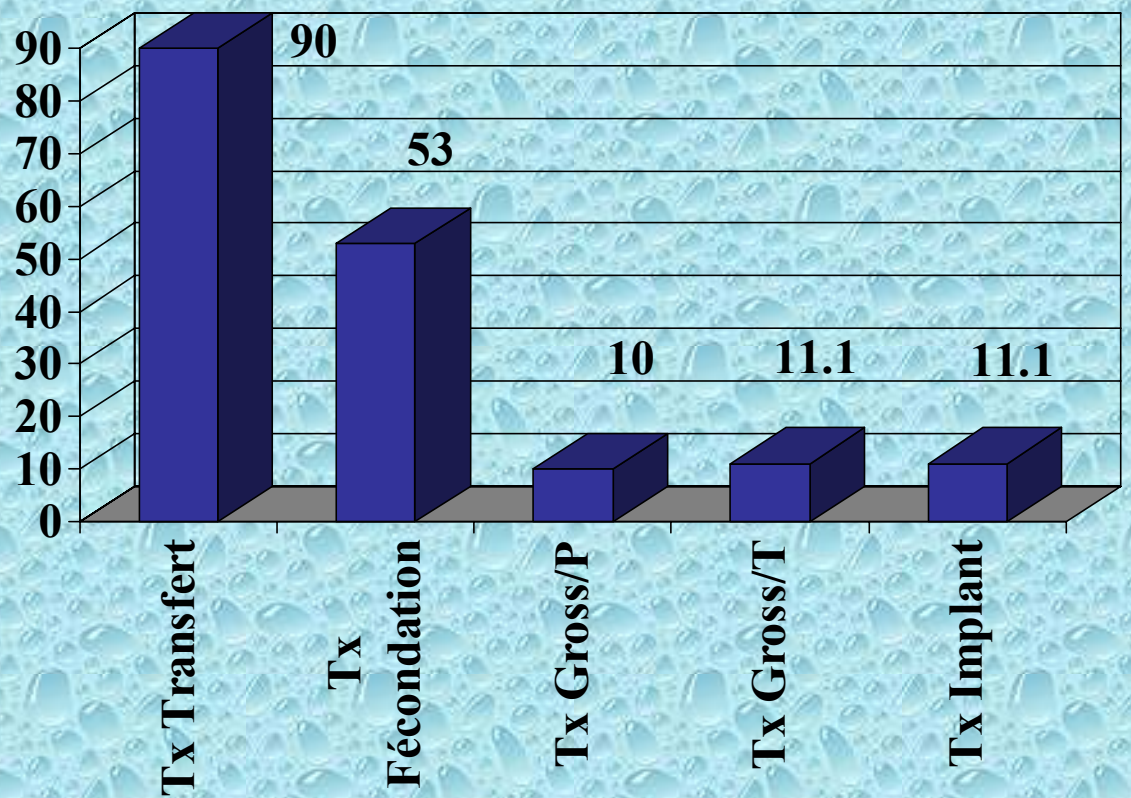
10 ICSI,

40 ovocytes,

21 ovocytes fécondés,

18 embryons transférés,

2 implantations.



NOMBRE DE CONSERVATIONS de SPERME POST-CHIRURGICALES EN FRANCE : 376

Etude Française CECOS

	1995	**1996**	**1997**
Azoospermie Excrétoire **278**	23	117	138
Azoospermie Sécrétoire **98**	**-**	43	55

AZOOSPERMIES EXCRETOIRES : 278

Etude Française CECOS

	1995	1996	1997
Anéjaculation **27** (10 %)	-	12	15
Post-infectieuses **137** (49 %)	3	62	72
Agénésies **79** (28 %)	8	29	42

AZOOSPERMIES SECRETOIRES : 98

Etude Française CECOS

	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

Etude Française CECOS

	95	**96**	**97**
Testiculaire **205**	3	60	142
Epididymaire **169**	50	88	31
Déférentiel **41**	18	11	12
Mixte **102**	3	42	57

SPERMES CONGELES
Résultats en ICSI

AP/HP Cochin **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 chez les 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 méïose facile.
- Fécondation in vitro avec bon succès.
- Développement embryonnaire correct.
- Taux de grossesse catastrophique (2 publications).

Indications.

- Don d'ovocyte, Avant traitement stérilisant.