



Université Batna 2
Faculté des sciences de la nature et de
la vie
Département de biologie des
organismes



TD Biologie moléculaire de la reproduction
M1 Biologie animale

Les techniques de la PMA

Année universitaire
2022-2023

Table des matières

Introduction :	3
1. Stimulation ovarienne :	3
1.1. Stimulation de l'ovulation hors fécondation in vitro :	3
✓ Inducteurs de l'ovulation :	3
✓ Administration de gonadotrophines exogènes (FSH seule ou combinaison FSH-LH) :	4
✓ Pompe à GnRH :	4
1.2. Stimulation de l'ovulation en FIV :	4
2. L'insémination artificielle ou insémination intra-utérine (IUT).....	4
2.1. Définition :	4
2.3. Technique :	5
3. La fécondation in vitro avec transfert d'embryon (FIVETE).....	6
3.1. Définition :	6
3.2. Indications :	6
3.3. Les étapes de la FIV :	6

Introduction :

Les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont un outil indispensable à la prise en charge de l'infertilité du couple. Elles sont définies par l'ensemble des pratiques cliniques et biologiques permettant, devant la demande d'un couple, la procréation en dehors du processus naturel. Il s'agit d'une simple stimulation ovarienne (ex : trouble du cycle) ou d'une insémination intra utérine (ex : trouble de la glaire cervicale, qualité spermatique limite) ou encore d'une fécondation in vitro (ex : trompes bouchées, mauvaise qualité du sperme, ...). La procréation médicalement assistée permet de palier certaines difficultés à concevoir, sans nécessairement traiter la cause de l'infertilité.

1. Stimulation ovarienne :

Elle est très largement employée dans la thérapeutique de l'infertilité, initialement pour corriger un trouble de l'ovulation, puis afin d'augmenter le nombre d'ovocytes disponibles par cycle et, ainsi, les chances de fécondation. Avec le développement des techniques de monitoring de la réponse ovarienne (dosages hormonaux et échographie), la stimulation s'associe presque systématiquement aux cycles d'AMP.

1.1. Stimulation de l'ovulation hors fécondation in vitro :

L'objectif est d'obtenir un ou deux follicules matures, en mimant la physiologie et en privilégiant l'action de la FSH. D'un point de vue pratique, le principe physiologique de la stimulation ovarienne est d'empêcher le processus de monodominance folliculaire par le maintien des taux circulants de la FSH au-dessus du seuil de sensibilité à la FSH d'un certain nombre de follicules antraux. Elle s'adresse généralement à des patientes présentant une anovulation d'origine non hypothalamique (à gonadotrophines non basses) ou une dysovulation.

Diverses techniques permettent d'obtenir une stimulation paucifolliculaire.

✓ Inducteurs de l'ovulation :

Le traitement le plus simple pour stimuler l'ovaire est d'utiliser un antiœstrogène, essentiellement le citrate de clomifène (Clomid), qui se fixe sur les récepteurs des œstrogènes sur l'hypothalamus et l'hypophyse et les empêchent ainsi de freiner la sécrétion de FSH et de LH. Le citrate de clomifène, pris du 2^e au 6^e jour du cycle, stimule la sécrétion de FSH du fait de ses propriétés anti-œstrogènes exercées au niveau des sites hypothalamiques-hypophysaires (signal de carence en œstrogènes). Lorsque le(s) follicule(s) est(sont) mûr(s), la décharge ovulante de LH survient spontanément. Cet inducteur de l'ovulation nécessite l'intégrité de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Sa simplicité d'utilisation fait qu'il est recommandé en première intention pendant quelques cycles lorsque l'infertilité est liée à une anovulation (absence d'ovulation) ou à une dysovulation (ovulation irrégulière), que les ovaires sécrètent des œstrogènes et que l'hypophyse est capable de fonctionner.

✓ **Administration de gonadotrophines exogènes** (FSH seule ou combinaison FSH-LH) : Elles agissent directement au niveau des follicules antraux qui possèdent des récepteurs spécifiques. Elles peuvent être utilisées dans tous les types de troubles de l'ovulation dès lors qu'il existe des follicules antraux (sensibles aux gonadotrophines).

✓ **Pompe à GnRH :**

Elle nécessite une intégrité organique et fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Sa principale indication à ce jour est représentée par les aménorrhées hypothalamiques (anorexie mentale...).

1.2. Stimulation de l'ovulation en FIV :

L'objectif est de produire un grand nombre d'ovocytes fécondables afin de multiplier les chances d'obtenir des embryons. Elle fait appel à des doses élevées de FSH exogène (de 150 à 300 UI) administrée de façon prolongée, dans le but d'obtenir la croissance et la maturation d'un nombre important de follicules en empêchant leur atrophie (prolongation de la durée de la fenêtre FSH).

2. L'insémination artificielle ou insémination intra-utérine (IUT)

2.1. Définition :

C'est la technique d'assistance médicale à la procréation la plus simple et la plus ancienne. Le plus souvent, un traitement de stimulation préalable est prescrit à la femme afin d'obtenir le développement d'un ou deux follicules (voire trois selon les circonstances). Elle a pour objectif de promouvoir et/ou faciliter la rencontre des gamètes mâles et femelles à l'intérieur de l'appareil génital féminin. Les spermatozoïdes mobiles remontent naturellement vers les trompes à la rencontre de l'ovocyte. La fécondation se fait selon le processus naturel, « in vivo » puisqu'elle se passe à l'intérieur du corps de la femme.

2.2. Indications de l'insémination thérapeutique :

- Les troubles de l'éjaculation ;
- L'infertilité masculine peu sévère (oligo-asthénospermie ou OATS) ;
- Les causes cervicales : insuffisance de production et/ou de qualité de la glaire cervicale ;
- L'infertilité idiopathique ;
- L'endométriome.

2.3. Technique :

L'insémination artificielle fait appel à une stimulation ovarienne mono- ou paucifolliculaire. Trente-six heures après le déclenchement de l'ovulation, le sperme est recueilli au laboratoire, par masturbation. La préparation du sperme a pour but de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal, d'éliminer les débris cellulaires et de concentrer la suspension en spermatozoïdes mobiles et normaux, aptes à féconder l'ovocyte. Le sperme préparé est monté sur un cathéter de transfert qui est introduit au fond de la cavité utérine, où sont déposés les spermatozoïdes. Les inséminations intra vaginales et intra - cervicales sont actuellement très peu utilisées, du fait de la faiblesse de leurs résultats comparativement aux inséminations intra-utérines.

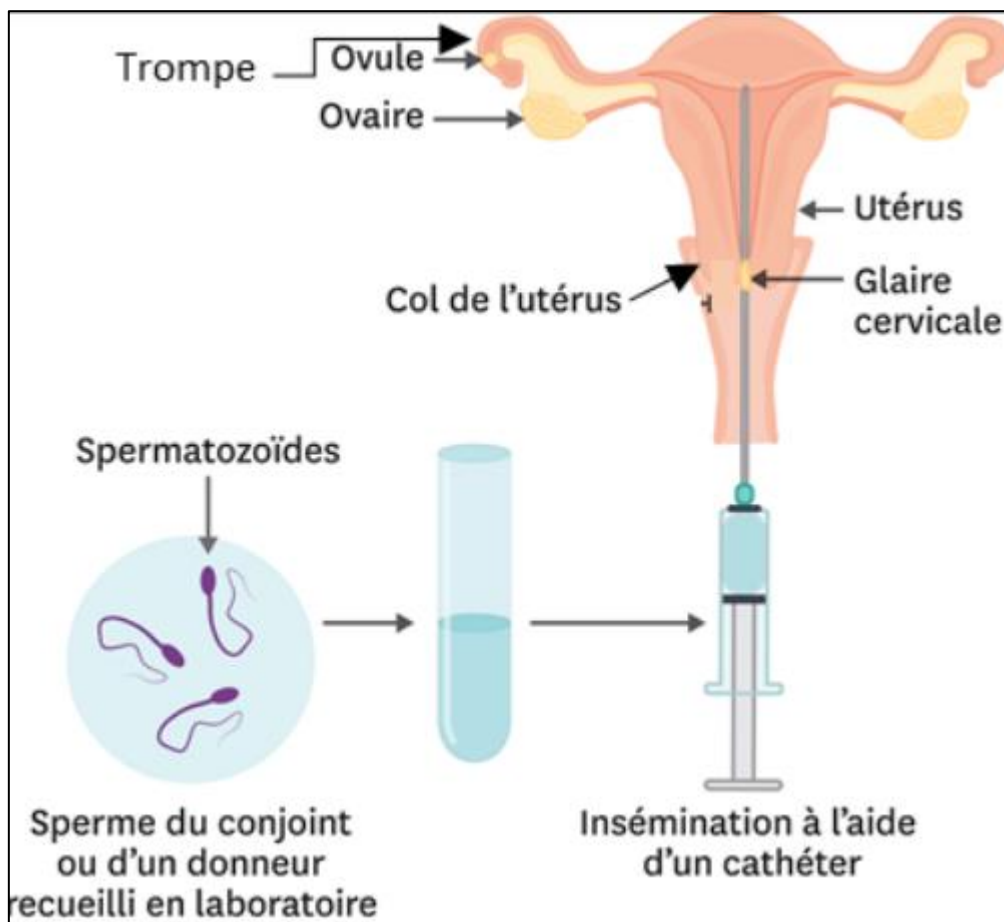


Figure 1 : la technique de l'insémination artificiel

3.La fécondation in vitro avec transfert d'embryon (FIVETE) :

3.1. Définition :

Cette technique est dite « in vitro » puisque la fécondation se passe à l'extérieur du corps de la femme. Cette technique consiste à mettre en contact, dans une boîte de culture, les spermatozoïdes et les ovules mûrs produits par les ovaires. Il s'agit dans ce cas de FIV classique. Après la fécondation, l'œuf va se développer pour former un embryon. Celui-ci sera replacé dans l'utérus afin d'initier éventuellement une grossesse.

Dans certains cas, et notamment lorsque le sperme est de qualité insuffisante, la fécondation spontanée des ovules par les spermatozoïdes, même dans les conditions de culture in vitro, n'est pas possible ou risque de mener à un échec. **Une ICSI (ou injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde) est alors réalisée.** Il s'agit d'une opération technique délicate qui consiste à saisir un spermatozoïde et à l'introduire avec précaution dans un ovule.

3.2. Indications :

Elles peuvent être liées à des problèmes chez la conjointe, chez le conjoint ou chez les deux en même temps.

La patiente : Imperméabilité des trompes : absence, obstruction, altération ou inflammation ; problèmes d'ovulation : dysovulation ou absence d'ovulation (anovulation) ; endométriose.

Le patient : Altération de la qualité du sperme : nombre, viabilité et motilité des spermatozoïdes trop faibles, anomalies morphologiques, présence d'anticorps anti-spermatozoïdes.

Il existe également des cas d'hypofertilité d'origine inexpliquée (ou idiopathique) pour lesquels il n'est pas possible de trouver un diagnostic précis et qui tiennent sans doute à l'accumulation de tout petits problèmes qui passent inaperçus lors de l'exploration clinique.

3.3. Les étapes de la FIV :

A) Stimulation ovarienne : La stimulation des ovaires permettra le développement de plusieurs follicules contenant des ovules, ce qui augmentera les chances de succès. Différents protocoles et médicaments peuvent être utilisés.

B) Le monitoring de l'ovulation : Il permet de contrôler la stimulation des ovaires par le traitement hormonal. Le monitoring associe une prise de sang (permettant de doser l'œstradiol, la LH et la progestérone), à une échographie ovarienne destinée à compter et mesurer les follicules, ainsi qu'à mesurer l'épaisseur de l'endomètre.

C) Prélèvement d'ovules : Après avoir effectué une anesthésie locale de la paroi vaginale, le médecin introduira dans le vagin une sonde endovaginale munie d'un guide afin de pouvoir

visualiser les follicules. Une aiguille fine sera introduite dans le guide et passera à travers la paroi vaginale vers l'ovaire.

D) Fécondation des ovules :

La préparation de l'ovocyte : Après la ponction, le liquide folliculaire est immédiatement examiné au laboratoire. Les ovocytes sont facilement retrouvés dans le liquide folliculaire grâce à une loupe binoculaire et placés en culture à 37°C.

Le sperme : Il est recueilli par masturbation, au laboratoire de FIV, de façon analogue au spermogramme déjà réalisé. Une abstinence sexuelle courte (moins de 4 jours) permet d'obtenir une qualité optimale du sperme. Dans certains cas il peut être réalisé une congélation de sperme préalablement au cycle FIV. Au laboratoire, un processus de filtration permet de sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles et de les rendre féconds.

La fécondation : Dans les 4 à 6 heures qui suivent la mise en contact des spermatozoïdes avec les ovocytes, un spermatozoïde va pénétrer dans l'ovocyte. Une incubation à 37° est alors nécessaire pour obtenir les premières divisions de l'œuf fécondé qui devient un embryon.

La micro-injection (ou ICSI) : Lorsque les examens réalisés sur le sperme mettent en évidence une insuffisance importante des spermatozoïdes en quantité et/ou en qualité, il vous est proposé de recourir à la fécondation par injection d'un spermatozoïde dans chaque ovocyte (ICSI).

L'ICSI est le processus par lequel un spermatozoïde préalablement lavé est injecté, au moyen d'une micro aiguille, directement à l'intérieur d'un ovule mature. Elle est principalement offerte aux patientes qui peuvent produire un ou des follicules dominants par stimulation ovarienne et dont le spermogramme du conjoint est en dessous des valeurs de référence de l'OMS.

E) Culture embryonnaire :

Après la fécondation, les embryons seront mis en culture dans un incubateur reproduisant les conditions retrouvées dans les trompes et dans l'utérus, et ce, pour une période de 3 à 6 jours. Pendant cette période, les embryons seront gardés dans un milieu spécialement conçu pour assurer leur croissance et leur développement.

F) Le transfert des embryons Le ou les embryons obtenus sont transférés dans l'utérus maternel 2- 3 ou 5 jours après le prélèvement des ovocytes.

G) La congélation ou cryopréservation des embryons Si le nombre d'embryons obtenus après une tentative de FIV est supérieur au nombre d'embryons transférés, les embryons non transférés peuvent être congelés, à condition qu'ils soient de très bonne qualité. La conservation des embryons se fait dans l'azote liquide à -196°C ce qui permet de pouvoir les conserver plusieurs années. La congélation des embryons permet de réaliser un autre transfert sur un cycle ultérieur, sans avoir à refaire de traitement de stimulation ni de ponction. La cryopréservation

des embryons en surplus permet aux patientes d'avoir un autre transfert embryonnaire sans toutefois avoir à traverser les étapes de la stimulation ovarienne et de la ponction des ovules. Elle permet également de reporter le transfert embryonnaire lorsque les conditions sont sous-optimales (comme dans le cas du SHO). Seuls les embryons de bonne qualité (selon des critères morphologiques) sont cryopréservés.

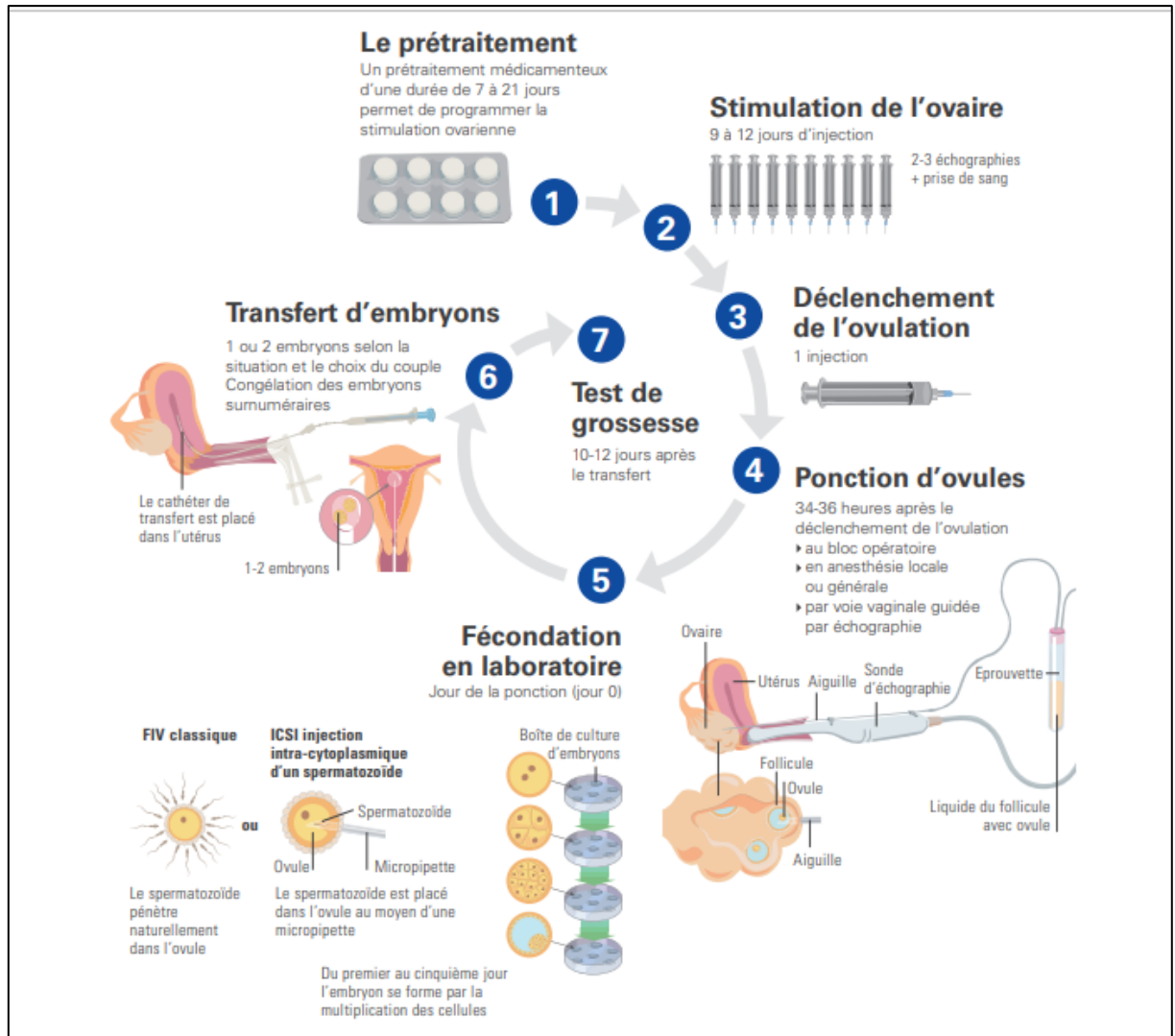


Figure 2 : Les étapes de FIV

4.L'ICSI :

Les indications de l'ICSI sont principalement les oligospermies extrêmes et les azoospermies. Lorsque la concentration et/ou la motilité des spermatozoïdes n'est pas suffisante ou lorsque la FIV classique ne permet pas une fécondation correcte, la technique de l'ICSI (micro-injection d'un spermatozoïde dans l'ovule) est alors appliquée.

La technique de FIV ICSI ne varie de la FIV classique que dans la mise en fécondation des gamètes, en effet le protocole de recueil des gamètes et le suivi embryonnaire sont identiques. Pour la technique d'ICSI, une préparation de spermatozoïdes après, un

grossissement optique de 200x à 400x est utilisé pour examiner l'échantillon. Les meilleurs spermatozoïdes mobiles « d'apparence normale » sont sélectionnés en fonction de leur morphologie majeure, puis injectés dans les ovocytes récupérés après stimulation ovarienne.

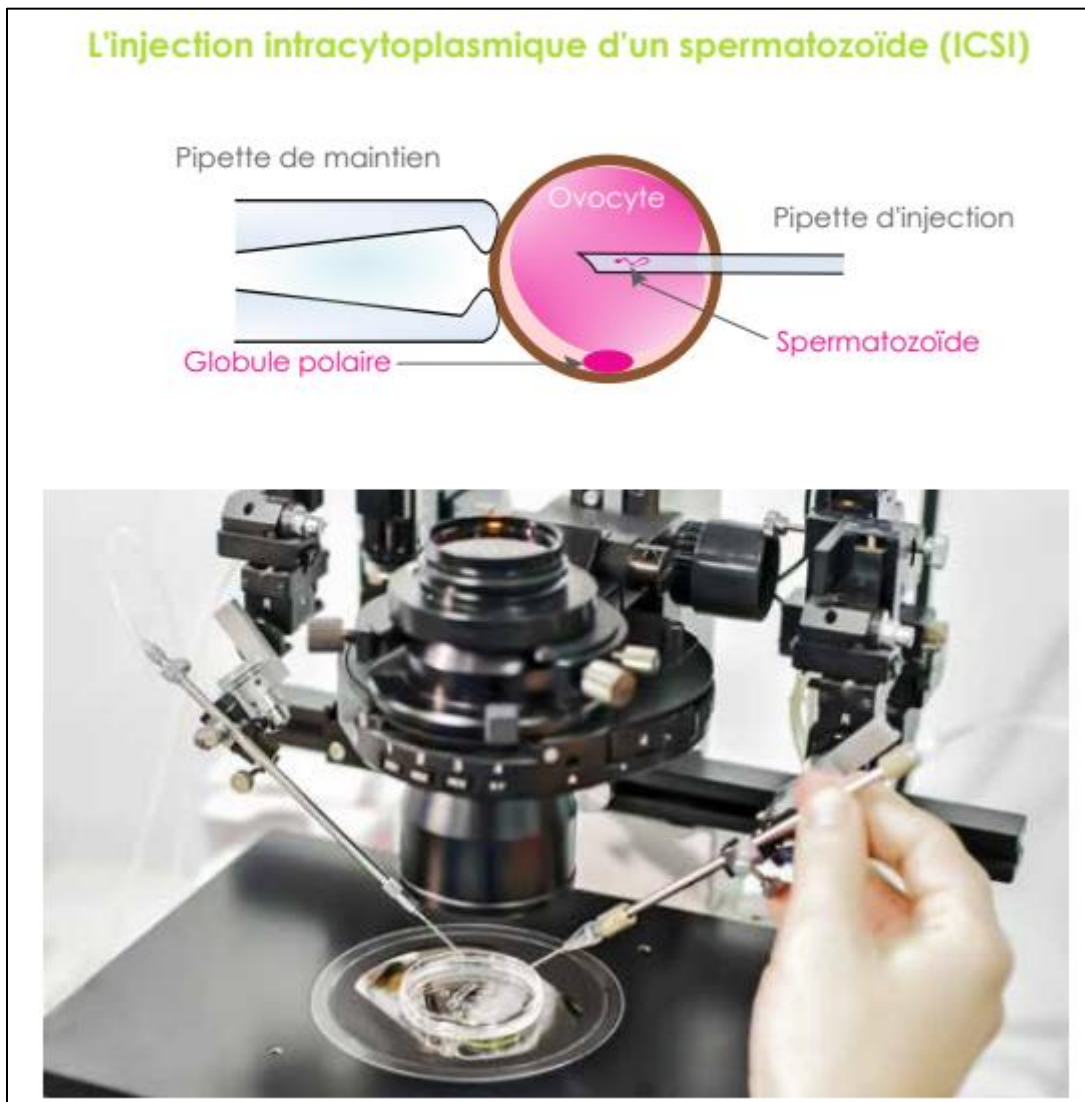


Figure 3 : Les étapes de l'ICSI