



Laboratoire de
Recherche
LR16SP01

Cas clinique N°2

Un patient VHC positif a-t-il droit à l'AMP?

Pr Olfa Bahri

Pr Ag Hanen Elloumi Chaabane

Cas clinique

- Madame L, 29 ans, enseignante, Monsieur N. 30 ans, infirmier consultent en mai 2017 pour une infertilité primaire de 3 ans, vie commune de 3 ans



Cas clinique

- **Bilan féminin**
- ATCD: Cycles réguliers
- Bilan hormonal :normal
- Hystérosalpingographie:
Trompes bouchées
cavité utérine normale
- Echographie pelvienne
(10/08): Absence d'anomalie

- **Bilan masculin**
- ATCD: un oncle infertile
- Tabac:1 paquet/ jour
- Examen clinique: normal
- Spermogramme (février 2017):
4 jours d'abstinence,
Vol: 2 ml
Numération: 8 millions/ml
Vitalité: 60%
Leucospermie: 0,5 Millions/ml
Mobilité progressive : 35%
Formes typiques : 5%
Test de Migration Survie:3,3 M

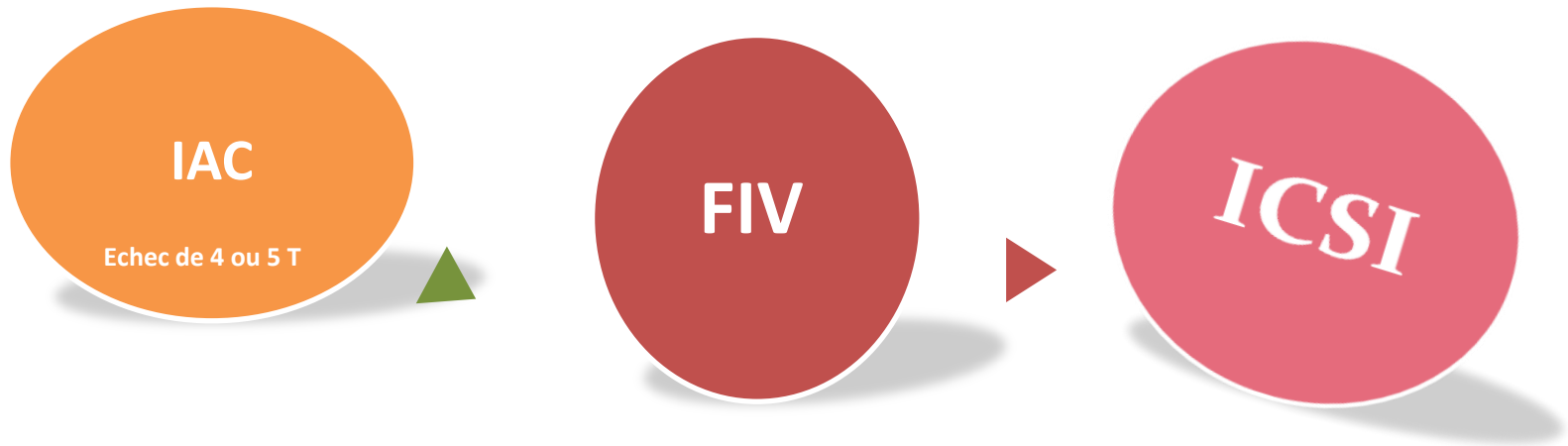
Conduite A Tenir?



Conduite A Tenir?

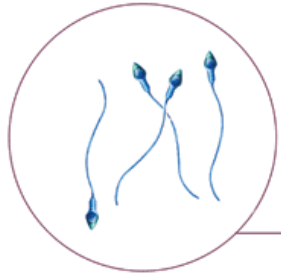
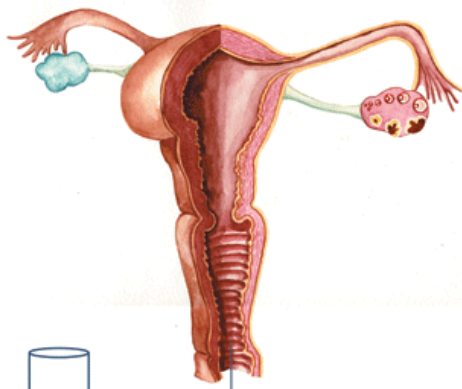
- Infertilité mixte
- Passage en AMP après avoir complété le bilan du couple

Principales techniques d'AMP



+La cryoconservation des gamètes
et des embryons surnuméraires

Isémination artificielle



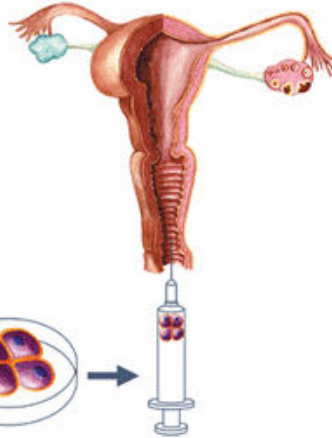
sperme du conjoint ou donneur



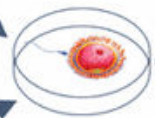
insémination



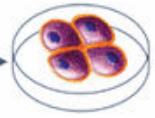
Fécondation in vitro



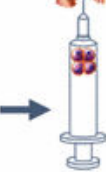
conditionnement des gamètes



fécondation

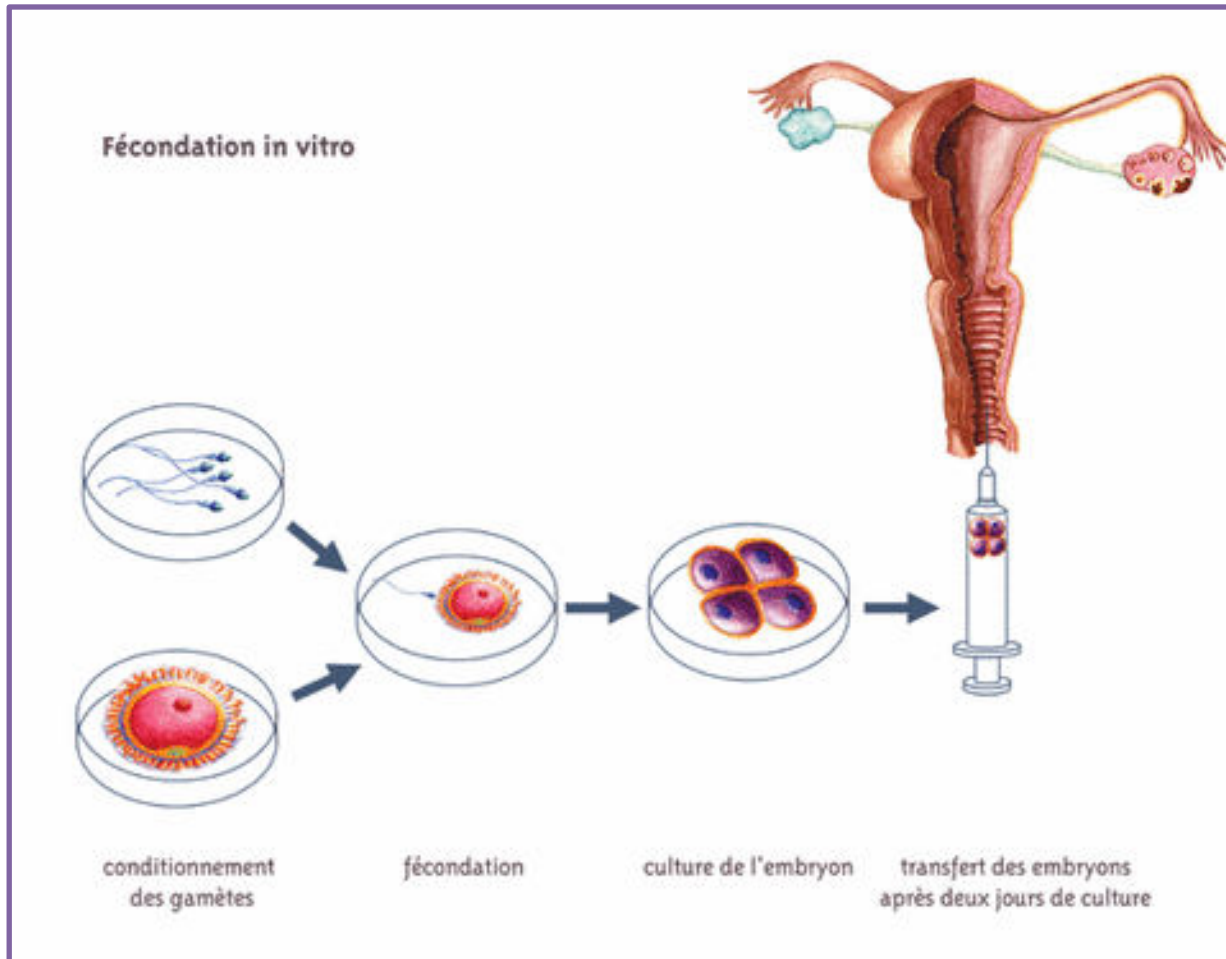


culture de l'embryon



transfert des embryons après deux jours de culture

Quelle technique d'AMP proposez vous?



Quel bilan pré-FIV?



Bilan infectieux pré FIV

- AgHBs
- Sérologie VHC
- Sérologie VIH
- Sérologie Syphilis
- Prélèvement vaginal à la recherche de germes banals, de *Chlamydia trachomatis* et des Mycoplasmes
- Spermoculture à la recherche de germes banals, de *Chlamydia trachomatis* et des Mycoplasmes

**Bilan réalisé au maximum dans les 12 mois
précédant la tentative d'AMP**

Bilan infectieux pré FIV

Chez la femme

- AgHBs négatif
- Anti-VHC négatif
- Anti-VIH négatif
- TPHA négative
- Prélèvement vaginal:
 - Absence de germes pathogènes
 - Absence de *Chlamydia trachomatis*
 - *Ureaplasma urealyticum* positive $< 10^4$

Chez l'homme

- AgHBs négatif
- **Anti-VHC positif**
- Anti-VIH négatif
- TPHA négative
- Spermoculture:
 - Absence de germes banals
 - Absence de *Chlamydia trachomatis*
 - Absence de mycoplasmes

Quelle est votre conduite à tenir?

PEC VHC EN CAS D'INFERTILITE

Chez l'homme

- Anti-VHC positif
 - ⇒ Contrôler sérologie sur un 2^{ème} prélèvement
 - ⇒ Confirmer la sérologie positive par PCR
 - ⇒ Compléter par un bilan virologique et hépatique si PCR VHC (+)
 - ⇒ Charge virale VHC
 - ⇒ Génotypage VHC
 - ⇒ Fibrotest ou fibroscan
 - ⇒ Bilan standard: transaminases, NFS, TSH, TP.....

PEC VHC EN CAS D'INFERTILITE

Chez l'homme

- Sérologie VHC confirmée positive
- PCR VHC positive
- Charge virale VHC = $3 \cdot 10^7$ UI/ml (7.47logUI/ml)
- Génotype 1b
- Score A_2F_2

Quelle est votre conduite à tenir?

PEC VHC EN CAS D'INFERTILITE

- 1- Traiter l'hépatite chronique C puis programmer FIV, 3 mois après l'arrêt du traitement
- 2- Traiter l'hépatite chronique C puis programmer FIV, 6 mois après l'arrêt du traitement
- 3- Rechercher le VHC au niveau spermatique puis programmer FIV si VHC non détectable
- 4- Programmer la FIV sans aucune investigation
- 5- La FIV est contre-indiquée dans ce cas

PEC VHC EN CAS D'INFERTILITE

- 1- Traiter l'hépatite chronique C puis programmer FIV, 3 mois après l'arrêt du traitement**
- 2- Traiter l'hépatite chronique C puis programmer FIV, 6 mois après l'arrêt du traitement
- 3- Rechercher le VHC au niveau spermatique puis programmer FIV si VHC non détectable
- 4- Programmer la FIV sans aucune investigation
- 5- La FIV est contre-indiquée dans ce cas

PARTENAIRE MASCULIN INFECTÉ PAR LE VHC

Traitement par sofobuvir + ledipasvir pendant
3 mois avec contrôle à (S4), S12 et S24

Charge virale à S4

☛ **Observance du
traitement**

Charge virale à S12

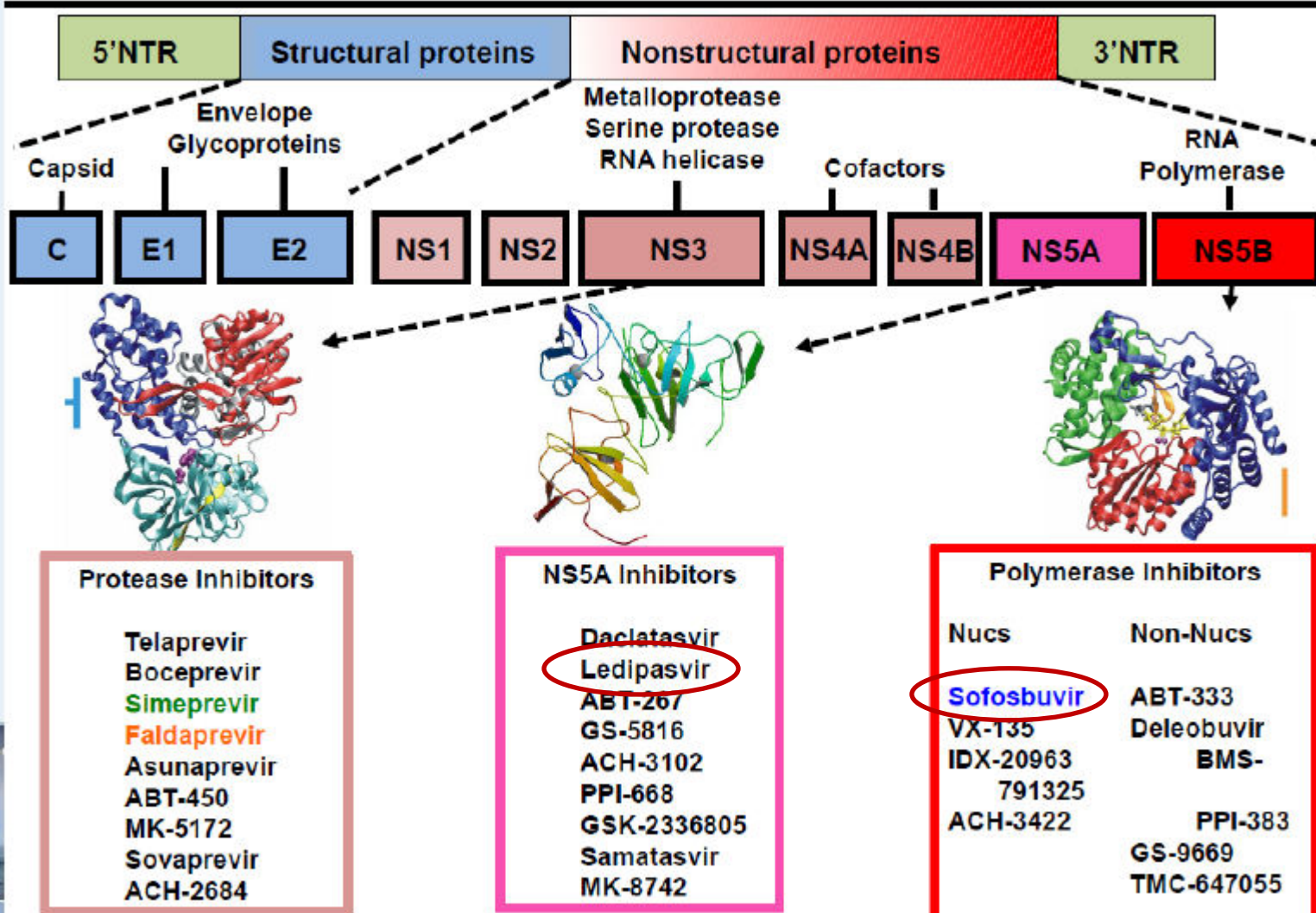
☛ **Réponse virologique à
l'arrêt du traitement**

Charge virale à S24

☛ **Réponse virologique
soutenue**

NOUVEAUX ANTIVIRAUX POUR LE TRAITEMENT DE L'HEPATITE C

Direct-acting antivirals



CONSENSUS TUNISIEN POUR LE TRAITEMENT DE L'HEPATITE C (2016)

Génotype 1/4/5/6 sans cirrhose

Naïf
ou
Prétraités par
bithérapie

Sofosbuvir + Ledipasvir

12 semaines

Génotype 1/4/5/6 avec cirrhose compensée

Naïf
ou
Prétraités par
bithérapie

Sofosbuvir + Ledipasvir
+ Ribavirine

12 semaines
(24sem si plaq < 75000)

Sofosbuvir + Ledipasvir

24 semaines

PARTENAIRE MASCULIN INFECTÉ PAR LE VHC

- CV pré-thérapeutique: $3 \cdot 10^7$ UI/ml (7.47logUI/ml)
- Sofobuvir + ledipasvir pendant 3 mois
- Contrôle à S4: CV = $3 \cdot 10^2$ UI/ml (2.47logUI/ml)
- Contrôle à S12 positive < 15UI/ml
- Contrôle à S24 positive < 15UI/ml

Est-ce que le VHC a un impact sur le sperme?

1- Oui

2- Non

Est-ce que le VHC a un impact sur le sperme?

1- Oui

2- Non

Est-ce que le VHC a un impact sur le sperme?

	HCV RNA in seminal plasma*	
	Negative	Positive
<i>Semen characteristics in men</i>	<i>n</i> = 64	<i>n</i> = 22
Mean [sd] ejaculate volume/ml	3.21 [1.54]	3.37 [1.41]
Mean [sd] spermatozoon number/ml × 10 ⁶	37.91 [62.16]	24.58 [32.61]
Mobility rate (%) of spermatozoa [sd]	46 [14.84]	42.79 [11.91]
Abnormal morphology rate (%) of spermatozoa [sd]	54.78 [19.98]	55.64 [16.86]
Mean [sd] leucocyte number/ml × 10 ⁶	0.53 [1.51]	1.38 [3.01]
<i>ART parameters for IVF and ICSI in women</i>	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 15
Number of aspirations	52	34
Mean [sd] oocyte number per aspiration	10.8 [7]	11.7 [7]
Rate (%) of top-quality embryos	62.4	57.8
Fertilization rate (%)	58.4	63.0
Clinical pregnancy rate (%)/aspiration	25.0	26.5
Take home baby rate (%)/aspiration	21.2	20.6

PARTENAIRE MASCULIN INFECTÉ PAR LE VHC

- CV pré-thérapeutique: $3 \cdot 10^7$ UI/ml (7.47logUI/ml)
- Sofobuvir + ledipasvir pendant 3 mois
- Contrôle à S4: CV = $3 \cdot 10^2$ UI/ml (2.47logUI/ml)
- Contrôle à S12 positive < 15UI/ml
- Contrôle à S24 positive < 15UI/ml

Quelle est votre conduite à tenir pour ce couple?

Est-ce que ce couple a droit à l'AMP?

- 1- L'AMP est contre-indiquée
- 2- Programmer AMP directement
- 3- Vérifier la charge virale au niveau séminal

Est-ce que ce couple a droit à l'AMP?

- 1- L'AMP est contre-indiquée
- 2- Programmer AMP directement
- 3- Vérifier la charge virale au niveau spermatique**

CV VHC AU NIVEAU SPERMATIQUE

- CV au niveau spermatique positive en cas de CV plasmatique élevée ($\approx 6 \log \text{UI/ml}$)
- CV au niveau spermatique plus faible qu'au niveau sanguin ($\approx 3 - 4 \log/\text{ml}$)
- Fluctuation de la CV possible au niveau séminal

RECOMMANDATIONS POUR LA PCR VHC AU NIVEAU SPERMATIQUE

- Extraction + PCR seuil de sensibilité < 50UI/ml
- Technique standardisée avec utilisation de contrôle interne
- Présence d'inhibiteurs de la Taq Polymérase au niveau du plasma séminal
 - ⇒ Risque⁺⁺⁺ de faux négatifs

TABLE 2. Qualitative RT-PCR results obtained by 12 laboratories for detection of HCV RNA in 16 seminal samples according to protocol of RNA extraction

Laboratory	RNA extraction protocol				No. of results			% Correct ^b
	Vol (μ l)	Dilution of sample used	Concn of RNA by centrifugation at 4°C	Assay	Positive (n = 13)	Indeterminate ^a (n = 5)	Negative (n = 2)	
A	200	Undiluted	None	NucliSens	13	3	2	100
B	500	Undiluted	None	NucliSens	11	4	1	80
C	100	Undiluted	None	Nuclisens	9	0	2	73.3
D	250	1:1	21,000 \times g for 1 h	Qiagen RNA	13	1	2	100
E	200	Undiluted	None	Amplicor	7	1	1	53.3
F	140	Undiluted	None	Qiagen RNA	11	1	2	86.7
G	200	Undiluted	23,000 \times g for 1 h	Amplicor	12	1	2	93.3
H	200	Undiluted	None	Amplicor	9	1	0	60
I	200	1:2	28,100 \times g for 1 h	Amplicor	12	3	2	93.3
J	250	1:1	20,000 \times g for 1 h	Qiagen RNA	12	3	2	93.3
K	200	1:2	24,000 \times g for 1 h	Amplicor	12	0	2	93.3
L	200	1:1	None	NucliSens	10	0	2	80

^a Corresponds to the five samples listed in Table 1 with a viral load below the threshold of sensitivity of 50 IU/ml.

^b Taking into consideration the 13 positive and the 2 negative samples.

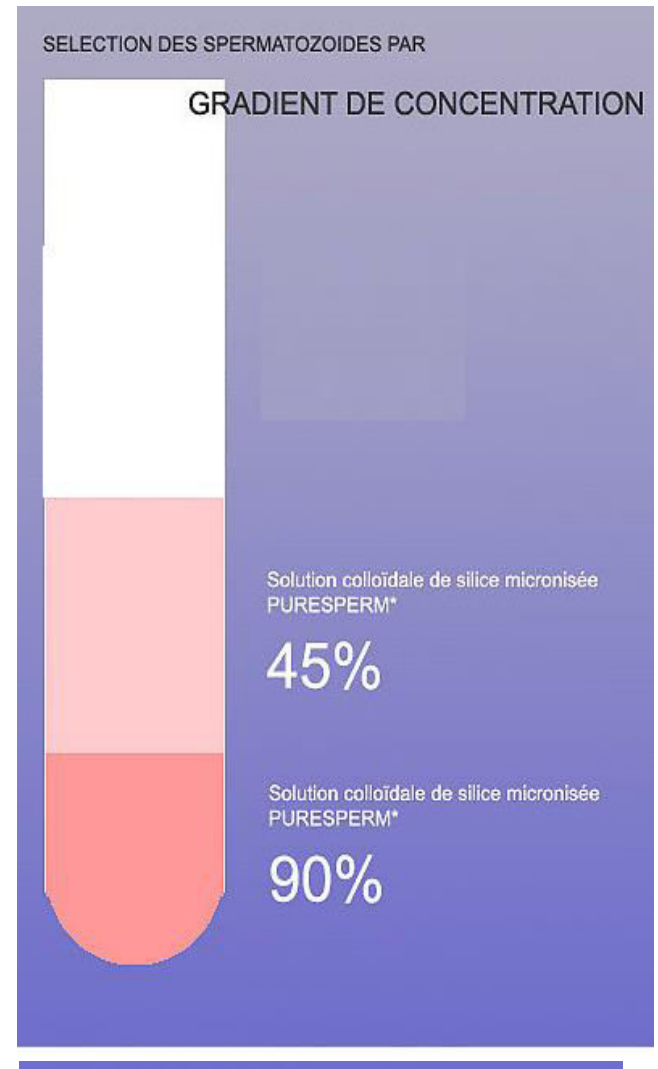
Amélioration du rendement de la PCR par:

- Dilution du prélèvement (au ½)
- Extraction précédée par une étape de centrifugation (20000g/1h)
- Utilisation de procédé d'extraction sur colonne de silice

LA PRÉPARATION DE SPERME EN VUE D'UNE AMP

MODE OPÉRATOIRE

- 1- Préparer des colonnes de migration **stérilement** dans des flacons Falcon
- 2- Coller les étiquettes (traçabilité)
- 3- Avant chaque préparation, déposer stérilement dans un tube conique :
 - 1,5 ml fraction 90% puis
 - 1,5 ml fraction 45% goutte à goutte, sans mélanger les 2 phases

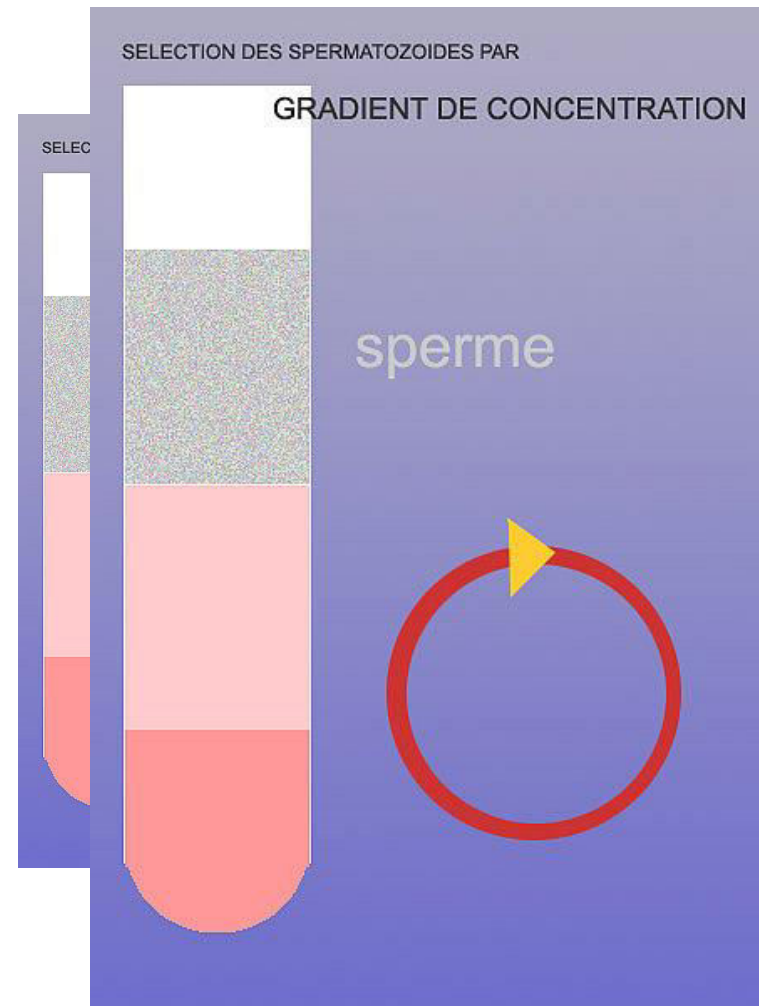


LA PRÉPARATION DE SPERME EN VUE D'UNE AMP

MODE OPÉRATOIRE

Manipuler **OBLIGATOIREMENT** sous hotte

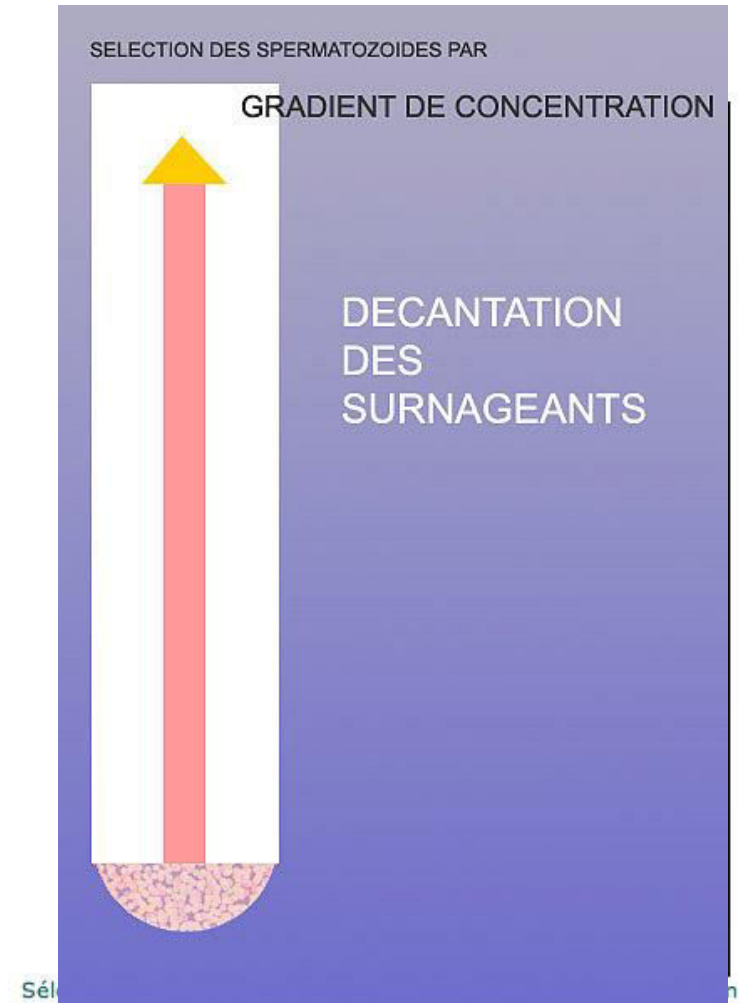
- 1- Identifier la (les) colonne(s)
- 2- Déposer délicatement le sperme à la surface (au maximum 2 ml par colonne)
- 3- Centrifuger 20 min à 1400 rpm à température ambiante



LA PRÉPARATION DE SPERME EN VUE D'UNE AMP

MODE OPÉRATOIRE

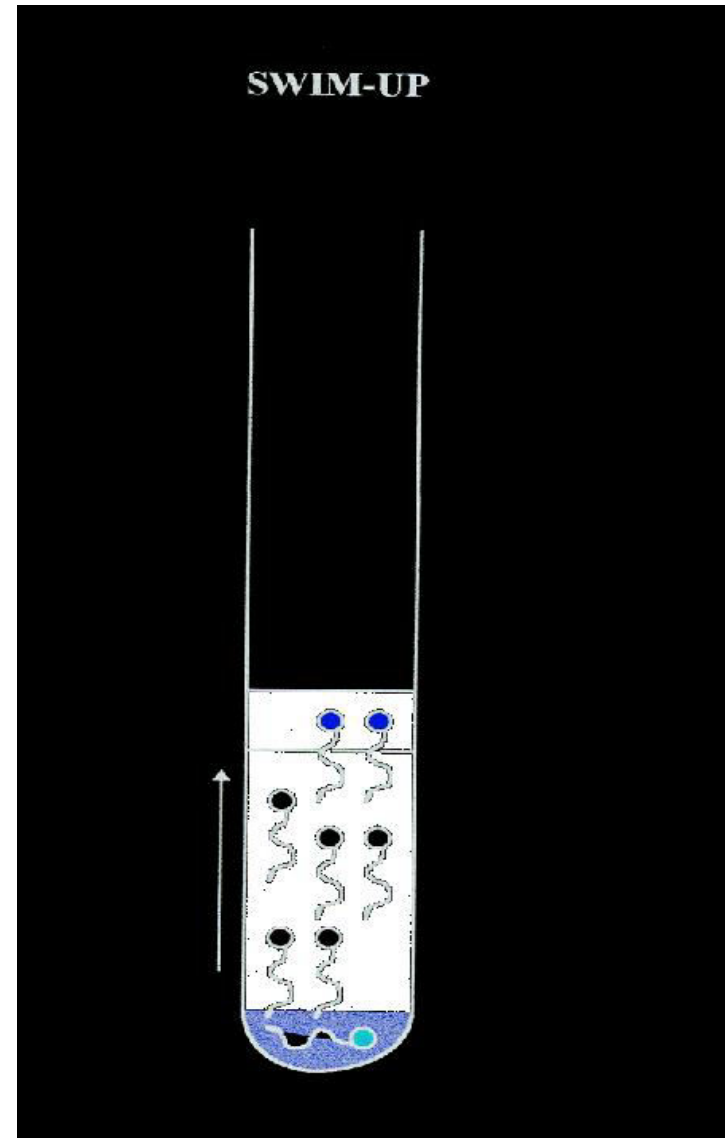
- Eliminer à l'aide d'une pipette les fractions 45% et 90% (il doit rester ~ 0,5 ml de la fraction 90%)
- Ajouter 2 ml de milieu de lavage
- Centrifuger 10 min à 1800 rpm
- Récupérer le culot et le reprendre dans 0,25 ml de milieu de culture.

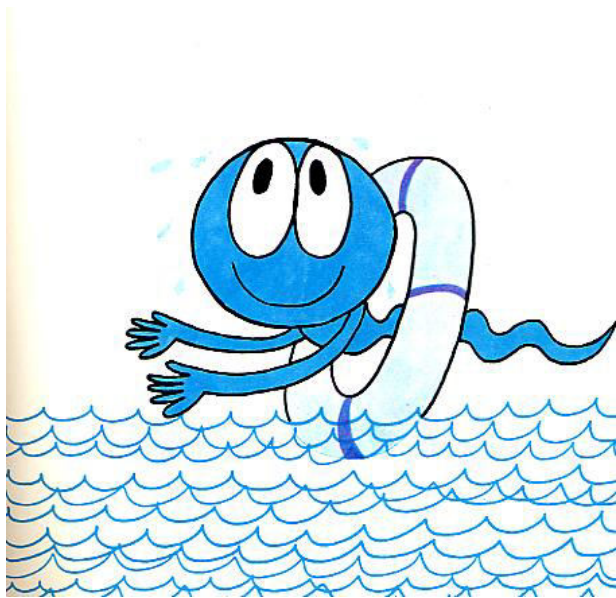


LA PRÉPARATION DE SPERME EN VUE D'UNE AMP

MODE OPÉRATOIRE

- Laisser migrer la préparation pendant 15 minutes à l'étuve
- Analyser les paramètres du sperme migré (numération, mobilité)

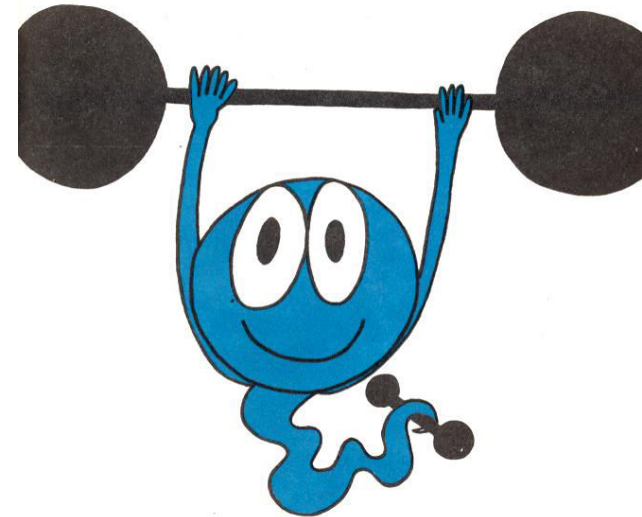




Swim-up

Mobilité flagellaire

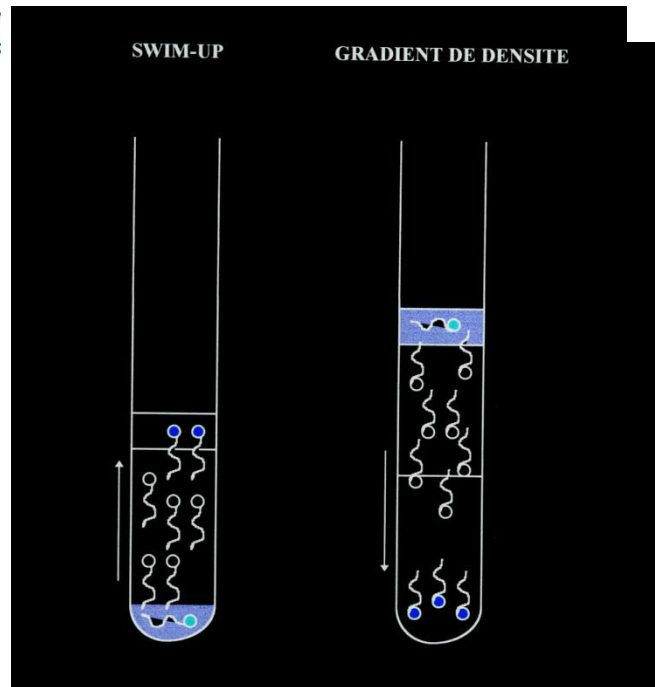
Augmente le % de spz normaux en diminuant le % de spz ayant des anomalies flagellaires



Gradient de densité

Densité du noyau

Augmente le % de spz normaux en diminuant le % de spz ayant des anomalies du noyau



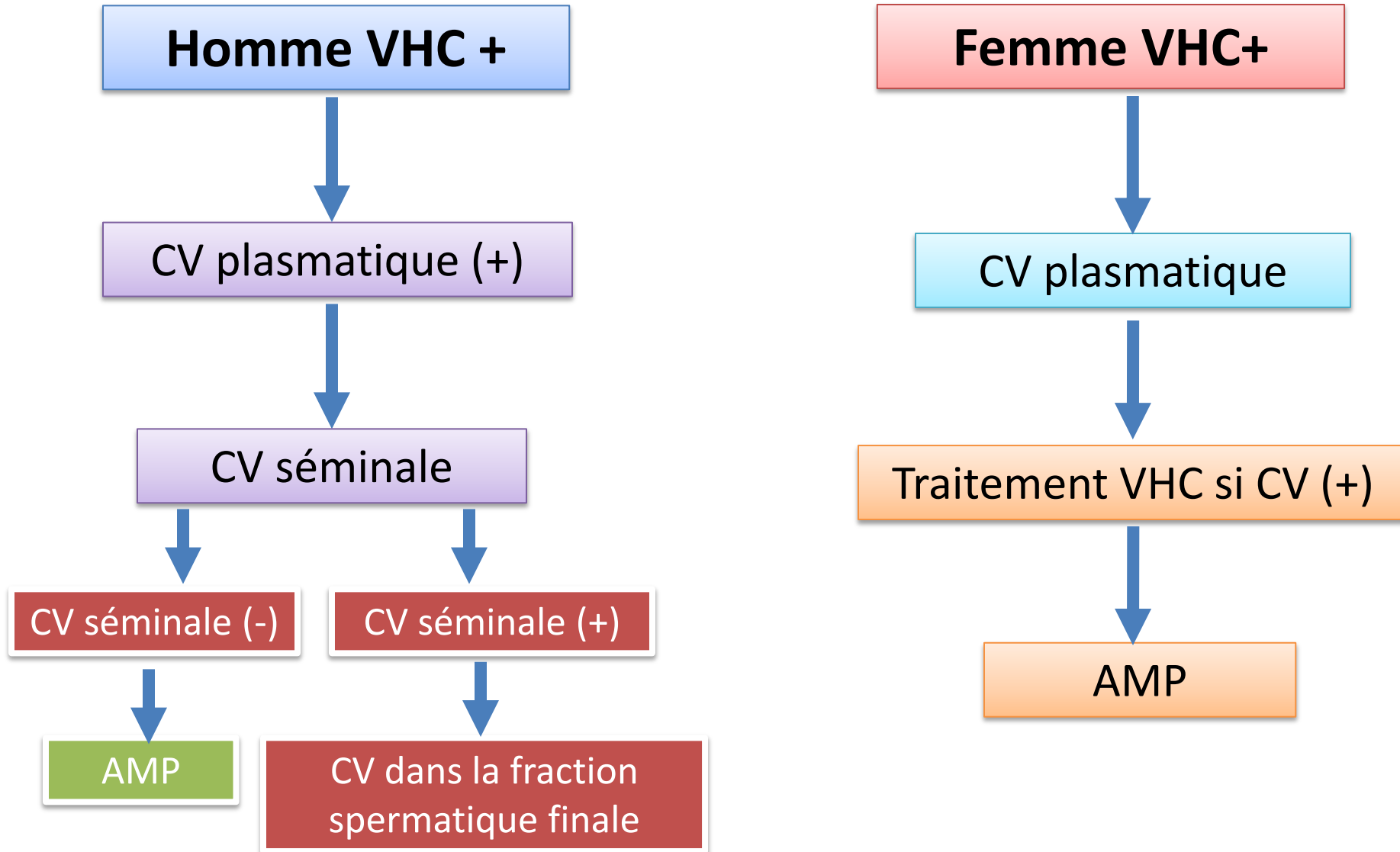
Récapitulatif

- Patient VHC positif
- CV initiale: $3 \cdot 10^7$ UI/ml (7.47logUI/ml)
- Traitement par sofosbuvir + ledipasvir pendant 3 mois avec contrôle à (S4), S12 et S24
- PCR VHC au niveau sanguin
 - Contrôle à S4: CV = $3 \cdot 10^2$ UI/ml (2.47logUI/ml)
 - Contrôle à S12 positive < 15UI/ml
 - Contrôle à S24 positive < 15UI/ml
- Une PCR VHC au niveau séminal est programmée

Sur quelle fraction séminale faut il faire la PCR VHC?

- 1- Au niveau du plasma séminal
- 2- Au niveau de la fraction spermatique finale
- 3- Au niveau du plasma séminal et dans fraction spermatique finale

Algorithme à suivre dans ce cas



Récapitulatif

- Patient VHC positif
- CV initiale: $3 \cdot 10^8$ UI/ml (8.47logUI/ml)
- Traitement par sofosbuvir + ledipasvir pendant 3 mois avec contrôle à (S4), S12 et S24
- PCR VHC au niveau sanguin:
 - Contrôle à S4: CV = $3 \cdot 10^2$ UI/ml (2.47logUI/ml)
 - Contrôle à S12 positive < 15UI/ml
 - Contrôle à S24 positive < 15UI/ml
- **PCR VHC au niveau séminal négative**

Y a-t-il un risque chez le nouveau-né?

- Risque de transmission négligeable:
 - CV en général faible au niveau spermatique
 - Absence de réplication du VHC dans les spermatozoïdes
 - Fixation sans pénétration
 - Elimination du VHC très fort probable grâce à la préparation du sperme

Y a-t-il un risque chez le nouveau-né?

Table III Perinatal outcome and infant characteristics at birth as a function of absence or presence of HCV RNA in the semen and co-infection by HIV of the male partner

	HCV RNA in seminal plasma		Serological status of the male partner		Total
	Positive (n = 22)	Negative (n = 64)	HCV (n = 76)	HIV/HCV (n = 10)	
Pregnancy	12 (54.5)	24 (37.5)	27 (35.5)	9 (90.0) [†]	36
Newborn	8 (36.4)	20 (31.2)	21* (27.6)	7 (70.0) [†]	28*
Singleton	4 (18.2)	16 (25.0)	13 (17.1)	7 (70.0) [‡]	20
Twin	2 (9.1)	2* (3.1)	4* (5.3)	0 (0)	4
Preterm delivery	5 (22.7)	7*(10.9)	7* (9.2)	5 (50.0) [‡]	12

- Pas d'impact sur le taux de grossesse
- Pas d'impact sur l'accouchement
- Pas de risque pour le nouveau né (il est recommandé de réaliser une sérologie VHC à 3 mois de naissance)

Risque nosocomial

- Les activités doivent être dissociées par rapport aux activités concernant les couples sans risque identifié.
- L' équipe clinico- biologique doit faire l'objet d'une formation adaptée au traitement de prélèvements à risque viral.
- Disposer des équipements spécifiques (Hottes, ICSI, Cuves)

Conclusions

- L'AMP n'est mise en œuvre que dans le cadre de l'infertilité
- Identifier les couples à risque viral
- Préparation de sperme avant AMP
- Vérifier la charge virale dans la fraction spermatique finale
- Risque nosocomial+++

