

*COLLÈGE NATIONAL  
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS  
Président : Professeur B. Blanc*

**Extrait des  
Mises à jour  
en Gynécologie  
et Obstétrique**

—  
**TOME XXVI  
publié le 28.11.2002**



*VINGT-SIXIÈMES JOURNÉES NATIONALES  
Paris, 2002*

# **AMP et identification du risque en cas de patients VIH, hépatite C ou hépatite B positifs.**

## **Qu'apportent les décrets de 2001 ?**

C. SIFER<sup>1</sup>, N.-G. CASSUTO<sup>2</sup>, C. PONCELET<sup>3</sup>, M. NAOURI<sup>3</sup>,  
A. NEURAZ<sup>3</sup>, S. ALVAREZ<sup>3</sup>, D. BOURET<sup>2</sup>, A. DEVAUX<sup>1</sup>,  
P. MADELENAT<sup>3</sup>, G. FELDMANN<sup>1</sup>, J.L. BENIFLA<sup>4</sup>  
(Paris)

### **1. INTRODUCTION**

Les actes cliniques ou biologiques d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont obligatoirement effectués sous la responsabilité d'un ou plusieurs praticiens nommément agréés dans une structure autorisée par le ministère de la santé pour la réalisation de ces actes. En France, ces actes sont réglementés par l'arrêté du 12 janvier 1999 publié au Journal Officiel (JO) du 28 février 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP. Concernant les tests de sécurité sanitaire effectués préalablement à toute AMP intra-conjugale pour éviter le risque de contamination de prélèvements d'autres couples, du personnel et de l'enfant à naître, cet arrêté impose

1. Service d'Histologie  
CHU Bichat-Claude-Bernard – 75877 PARIS CEDEX 18.
2. Laboratoire Drouot – 75009 Paris.
3. Service de Gynécologie-Obstétrique  
CHU Bichat-Claude-Bernard – 75877 PARIS CEDEX 18.
4. Service de Gynécologie-Obstétrique  
Hôpital Rothschild – 75571 PARIS CEDEX 12

: 1) la recherche des marqueurs biologiques d'infection par VIH 1, VIH 2, les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) et la syphilis chez les deux membres du couple ; et 2) la marche à suivre en cas de positivité de ces tests : en cas de séropositivité pour la syphilis, l'AMP doit être précédée d'un traitement spécifique. En ce qui concerne le virus de l'hépatite B, si l'homme est porteur de l'antigène HBs, il conviendra de vacciner la conjointe séronégative préalablement à toute AMP. Si la femme est porteuse de l'antigène HBs, l'AMP est possible mais le couple doit être averti de la nécessité de réaliser la sérovaccination spécifique de l'enfant à la naissance. En ce qui concerne l'infection par le VIH ou la séropositivité avec virémie vis-à-vis de l'hépatite C de l'un ou l'autre ou des deux membres du couple, l'arrêté du 12 janvier 1999 autorise la prise en charge en AMP de tels couples uniquement dans le cadre d'un protocole de recherche clinique pluridisciplinaire relevant des prescriptions de la loi Huriet comprenant l'avis d'un Comité Consultatif pour la Protection des Personnes soumises à la Recherche Biomédicale (CCPPRB) et validé par la Commission Nationale de Médecine et de Biologie de la Reproduction et du Diagnostic Prénatal (CNMBRDP). Cet arrêté a finalement permis à la fois de standardiser la pratique des actes d'AMP au sein des différents centres français par la réglementation qu'il impose mais également d'ouvrir le champ des possibilités de prise en charge des couples infertiles dans un contexte d'infection virale. Ainsi deux protocoles de recherche clinique, promus par l'Agence Nationale de Recherche contre le SIDA (ANRS), dans ce contexte d'AMP à risque viral, ont débuté après sa publication. Le premier, bicentrique, réunissait les centres d'AMP des CHU Cochin (protocole NECO) et Toulouse et a inclus une centaine de couples fertiles dont l'homme était VIH 1 positif afin d'éviter le risque de contamination de la conjointe lors de la procréation. En effet seules les tentatives d'AMP avec recherche négative des acides nucléiques du VIH 1 dans la fraction de spermatozoïdes (spz) purifiés utilisés ont été effectuées. Le deuxième, multicentrique, a prévu d'étudier 500 grossesses obtenues par AMP dans 33 centres signataires du protocole, chez les couples dont l'un ou l'autre ou les deux membres sont porteurs chroniques du VHC, et de comparer le risque de transmission de ce virus à l'enfant à naître dans ce groupe à un groupe de grossesses obtenues spontanément chez des femmes VHC+ (projet HEPACAMP).

Même si l'arrêté du 12 janvier 1999 a permis la mise en place de ces protocoles, il ne précise pas quelles sont les conditions particulières de prise en charge de couples à risque viral, tant sur le plan des critères de sélection des couples que celui des conditions d'organisation de

l'équipe médicale clinico-biologique et du laboratoire d'AMP. L'ensemble de ces critères est détaillé dans l'arrêté du 10 mai 2001 publié au JO du 15 mai 2001 concernant la prise en charge en AMP des patients à risque viral et modifiant l'arrêté du 12 janvier 1999.

Le but de cet article est donc d'identifier les risques intra-conjugaux et nosocomiaux liés à la réalisation d'une AMP dans un contexte d'infection aux virus VIH, VHB et VHC et les réponses apportées par l'arrêté du 10 mai 2001 pour contrer ces risques.

## 2. L'ARRÊTÉ DU 10 MAI 2001 (dans le texte)

« Prise en charge en assistance médicale à la procréation des patients à risque viral

« Suivant les recommandations universelles de sécurité sanitaire, tout prélèvement biologique doit être considéré à risque. Cependant, la présence de marqueurs biologiques de l'infection par le VIH, par les virus des hépatites B et C chez l'un ou les deux membres du couple (patients virémiques) sollicitant une assistance médicale à la procréation impose une prise en charge particulière des patients, des conditions renforcées d'organisation de l'équipe médicale clinico-biologique et une organisation du laboratoire adaptée au risque viral. Ces procédures permettent de réduire les risques de contamination du conjoint, de l'enfant à naître, des gamètes et des embryons appartenant à d'autres couples et, enfin, des personnels ; elles permettent aussi d'assurer un environnement médical et psychologique optimal de ces couples souvent vulnérables. Les établissements autorisés aux activités cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation souhaitant réaliser ce type de prise en charge doivent impérativement remplir les exigences figurant dans ce chapitre. Dans ce cas, chaque établissement devra déclarer cette activité au ministre chargé de la santé.

« Organisation du laboratoire d'assistance médicale à la procréation prenant en charge des patients à risque viral

« Il est impératif pour les personnels de respecter dans le laboratoire l'ensemble des dispositions du présent guide et les précautions universelles lors de la manipulation d'échantillons biologiques d'origine humaine. Le laboratoire doit mettre en place une organisation particu-

lière en créant un circuit à risque viral bien identifié : les activités chez les patients à risque doivent être dissociées par rapport aux activités concernant les couples sans risque identifié. Soit il s'agira d'une dissociation dans le temps sur une période donnée, soit d'une dissociation dans l'espace du laboratoire, avec utilisation d'un poste de travail complet séparé avec personnel dédié ; cette dernière solution, permettant de ne pas désorganiser le fonctionnement du centre d'assistance médicale à la procréation, doit être mise en place dans les établissements ayant un fort recrutement. Dans tous les cas, le laboratoire doit bénéficier des matériels nécessaires pour assurer une sécurité sanitaire maximale. Les procédures d'organisation et de sécurité doivent être écrites, révisées régulièrement et validées par le CLIN, si la structure en dispose. Elles doivent être connues par l'ensemble de l'équipe. Le personnel des équipes clinique et biologique du centre d'assistance médicale à la procréation doit faire l'objet d'une formation spécifique adaptée à la prise en charge de patients et au traitement de prélèvements à risque viral. Le poste de travail utilisé en situation de risque viral doit être équipé d'une hotte à flux laminaire à flux vertical. Pour la préparation des spz, il doit être équipé d'une centrifugeuse à nacelle étanche, d'un incubateur à CO<sub>2</sub> et d'un microscope ; pour l'utilisation en ICSI, le poste doit posséder le matériel nécessaire, il est recommandé dans ce cas que la hotte soit équipée d'une loupe binoculaire. La congélation des spz sera effectuée dans des paillettes dites de « haute sécurité », avec utilisation d'appareil de soudure adapté. Les cuves de stockage doivent être spécifiques et séparées pour les paillettes de patients VIH, pour les paillettes de patients VHC et pour les paillettes de patients VHB ; les paillettes de patients co-infectés par le VIH et les hépatites seront déposées dans la cuve VIH. Les embryons congelés sont stockés également dans une cuve spécifique. Il est nécessaire de disposer d'une cuve de secours. Des équipements spécifiques ne sont pas nécessaires dans le laboratoire de virologie, mais le personnel doit être particulièrement formé à ces techniques spécifiques.

« Cas des couples sérodifférents dont l'homme est VIH+

« La mise en œuvre de techniques d'assistance médicale à la procréation permet de réduire au sein du couple les risques de contamination grâce à une préparation et un lavage du sperme, suivis d'une évaluation de la CV dans la fraction finale de spz avant utilisation. Il convient de rappeler qu'il s'agit d'une des indications légales de l'assistance médicale à la procréation à côté de la lutte contre l'infertilité.

« A. Nécessité d'une équipe pluridisciplinaire structurée et d'une organisation particulière

« La prise en charge de ces couples représente une charge de travail importante ; elle nécessite la présence d'une équipe clinico-biologique structurée au sein du centre d'assistance médicale à la procréation ; par ailleurs doit s'installer une collaboration étroite entre l'équipe clinico-biologique d'assistance médicale à la procréation et un laboratoire de virologie spécialisé et reconnu, ayant une expérience particulière de ce type d'analyse. L'équipe doit comporter au minimum un clinicien et un biologiste de la reproduction, un clinicien spécialiste du sida ou un hépatologue selon les cas, un virologue et un psychiatre ou un psychologue, et se réunir régulièrement sur ces dossiers particuliers. Son rôle est :

– d'assurer les entretiens préalables à l'assistance médicale à la procréation prévus à l'article L. 2141-10 en tenant compte de la situation particulière liée à la séropositivité ; les couples devront recevoir toute l'information nécessaire sur les procédures d'adoption et sur le don de sperme de donneur, garantissant un risque nul de contamination et sur les techniques de réduction du risque de contamination, qui ne peuvent être assimilées à une procréation sans risque ;

– d'évaluer les critères de prise en charge des patients sur le plan médical, psychologique et virologique et de valider les demandes. Certains couples pourront ne pas être retenus ; il convient de rappeler qu'en application de l'article L. 2141-10, un praticien peut toujours différer une assistance médicale à la procréation dans l'intérêt de l'enfant à naître ;

– de recueillir les consentements des deux membres du couple à l'assistance médicale à la procréation et à la mise en œuvre des méthodes spécifiques de réduction des risques ;

– d'assurer le suivi médical et psychologique du couple tout au long de la prise en charge en assistance médicale à la procréation et pendant la grossesse.

« B. Critères de sélection des couples

« S'agissant de la mise en œuvre d'une assistance médicale à la procréation, le couple doit remplir l'ensemble des conditions légales d'accès prévues à l'article L. 2141-2. Il doit s'engager à avoir une vie sexuelle protégée, y compris pendant la grossesse et l'allaitement. Le couple doit être averti de la nécessité d'avoir plusieurs entretiens avec l'équipe pluridisciplinaire clinico-biologique, incluant obligatoirement un entretien psy-

chologique. L'homme doit être VIH+-1, porteur d'une souche quantifiable ; il peut être traité ou non, selon les recommandations habituelles dans ce domaine. Il doit attester d'un suivi régulier de son infection. Le patient ne doit pas être porteur de pathologies évolutives, et son taux de CD4 doit être supérieur à 200/mm<sup>3</sup> à deux reprises dans les quatre mois précédant la demande et au moment de l'inclusion. Chez un sujet traité, le taux d'ARN plasmatique du VIH doit être stable, sans augmentation de plus de 0,5 log dans les quatre mois précédant la demande et au moment de l'inclusion.

« La femme doit être séronégative dans les deux mois précédant la demande et lors de l'inclusion.

« La validation définitive de la demande du couple sera effectuée par l'équipe pluridisciplinaire au vu de sa situation médicale, psychologique et virologique, notamment après traitement du sperme.

« C. Mise en œuvre de l'assistance médicale à la procréation et procédures cliniques de suivi

« Le centre d'assistance médicale à la procréation doit pouvoir mettre en œuvre l'ensemble des activités, recueil et traitement du sperme, FIV, ICSI, dans le but de s'adapter à toutes les situations présentées par les couples. Les actes d'assistance médicale à la procréation seront effectués dans l'établissement lui-même, notamment le geste clinique d'insémination, le recueil d'ovocytes ou le transfert d'embryons.

« L'évaluation de la santé de l'homme sera trimestrielle tout au long du programme d'AMP en veillant au respect des conditions initiales d'inclusion, notamment sur la stabilité de son infection.

« La femme devra bénéficier d'une surveillance virologique avec la pratique d'une sérologie VIH et d'une recherche de l'ARN du VIH :

- dans les quinze jours précédant chaque tentative d'AMP ;
- deux à trois semaines, puis trois et six mois après cette tentative, qu'il y ait grossesse ou non ;
- à l'accouchement.

« Aucun suivi de l'enfant n'est nécessaire si la femme est séronégative à l'accouchement.

« D. Procédures biologiques et virologiques

« Une évaluation de la CV sera effectuée dans le plasma séminal avant traitement du sperme : si le nombre de copies par ml est supérieur à 10 000, le couple ne pourra être pris en charge tant que cette situation persiste.

## *AMP EN CAS DE VIH, HÉPATITE C OU HÉPATITE B POSITIFS*

« Dans le cas inverse, un traitement du sperme est effectué en privilégiant l'emploi de deux techniques successives, gradient de densité puis migration ascendante avec lavage intermédiaire ; la détection d'ADN proviral ou d'ARN est réalisée dans la fraction finale. On doit exiger qu'elle soit négative pour une utilisation en assistance médicale à la procréation :

- si la CV initiale dans le plasma séminal était inférieure à 1000 copies par ml, toutes les techniques d'assistance médicale à la procréation peuvent être utilisées ;

- si la CV initiale était supérieure à ce seuil, il est recommandé de recourir à une ICSI.

« Cas des couples où la femme est séropositive au VIH

« L'assistance médicale à la procréation est envisagée soit pour réduire le risque de contamination du conjoint par la pratique d'inséminations, soit pour prendre en charge une infertilité du couple.

« La sélection et le suivi des couples et des patientes s'effectuera sur les mêmes critères médicaux et virologiques décrits sous chapitre 1.3.2 concernant notamment la stabilité de l'infection par le VIH au moment de l'inclusion et pendant la prise en charge en AMP. La décision de prise en charge devra en outre prendre en compte le risque de contamination de l'enfant à naître et les conséquences éventuelles liées aux thérapeutiques pendant la grossesse. L'évaluation et le suivi psychologiques du couple joue un rôle particulier tout au long de la prise en charge en assistance médicale à la procréation et pendant la grossesse. Le sperme étant issu d'un patient non infecté, il n'est pas nécessaire d'en effectuer la préparation en vue d'insémination, de FIV ou d'ICSI dans un secteur particulier du laboratoire ; par contre, le liquide de ponction folliculaire sera traité au laboratoire comme un prélèvement à risque viral.

« Les prises en charge de la grossesse et de l'enfant à la naissance devront être effectuées en liaison avec les équipes obstétricales et pédiatriques spécialisées.

« Cas des couples dont l'un ou les deux membres sont porteurs du virus de l'hépatite C

« Les critères médicaux de prise en charge sont laissés à l'appréciation de l'équipe pluridisciplinaire.

« Lorsqu'il s'agit d'un couple dont l'homme est séropositif au VHC, le sperme sera traité et préparé au laboratoire en circuit de risque viral



selon les modalités décrites plus haut. L'évaluation de la CV sur le plasma séminal conditionne la procédure ultérieure :

- si la recherche est négative aucune nouvelle analyse virologique ne sera pratiquée ;

- si la recherche est positive, une nouvelle analyse sera effectuée sur la fraction intermédiaire ou finale de spz congelés (si la fraction intermédiaire est positive, l'étude de la fraction finale est systématique). Dans le cas où la fraction finale obtenue après préparation s'avère positive, le couple ne pourra être pris en charge en assistance médicale à la procréation.

« Lorsqu'il s'agit d'un couple dont la femme est séropositive au VHC, le liquide folliculaire sera traité avec les précautions de sécurité sanitaire décrites plus haut. Les modalités du suivi de l'enfant à la naissance seront à déterminer par les équipes pédiatriques.

« Cas de couples porteurs du virus de l'hépatite B

« Si l'homme est porteur du virus, sa conjointe devra être vaccinée préalablement à la mise en œuvre de l'assistance médicale à la procréation, avec évaluation de la protection vaccinale ; le sperme devra être traité dans un circuit spécifique de risque viral. Si la femme est porteuse du virus, des précautions particulières devront être respectées pour la manipulation du liquide oocytaire ; le couple devra être averti de la nécessité de réaliser une sérovaccination de l'enfant dans les 72 heures suivant la naissance.

« Évaluation des soins

« Les centres d'assistance médicale à la procréation assurant la prise en charge de patients à risque viral doivent conserver des informations médicales permettant d'assurer une évaluation de ces activités encore nouvelles. Un registre des tentatives d'assistance médicale à la procréation en contexte de risque viral devrait être tenu par les praticiens agréés.

« En dehors des données concernant l'assistance médicale à la procréation elle-même, dont le recueil et la conservation sont prescrites par le code de la santé publique et par le présent guide, les équipes devront conserver dans le respect de la confidentialité des informations :

- sur les éléments médicaux concernant le couple tout au long de la prise en charge : âge, stade et suivi de l'infection virale, contrôles biologiques, traitements, paramètres de fertilité, suivi psychologique... ;

- sur les résultats des différentes analyses virologiques pratiquées sur le patient à risque viral, sur son conjoint et éventuellement sur l'enfant ;
  - sur les effets indésirables constatés ;
  - sur les abandons en cours de prise en charge.
- « Il est important de conserver également des informations concernant les couples n'ayant pu être pris en charge par l'équipe pluridisciplinaire, notamment sur les motifs de refus.
- « Les équipes devront fournir un bilan spécifique d'activité annuel au ministre chargé de la santé. »

### 3. VHC ET AMP

#### 3.1 Généralités

Le VHC est un virus enveloppé à ARN positif monocaténaire appartenant à la famille des *Flaviviridae* ayant un tropisme démontré pour les hépatocytes et les cellules mononucléées du sang périphérique, notamment pour les lymphocytes B. Son génome ne s'intègre pas dans le génome de la cellule humaine et reste en position épisomale. La séroprévalence de l'hépatite C en France est estimée à 1,15 % (Dubois et al., 1997). Le mode de contamination est essentiellement sanguin par transfusion ou majoritairement par injection intraveineuse de drogue après utilisation de seringues souillées. La contamination sexuelle n'est pas démontrée. Difficilement cultivable *in vitro*, le diagnostic d'infection à VHC est indirect et repose sur la caractérisation des anticorps anti-VHC sériques. Le passage à la chronicité a lieu pour 70 % des patients infectés, avec un tableau clinique variable selon le génotype du virus. Cette hépatite chronique nécessite un suivi médical comprenant une biopsie hépatique avec analyse histologique pour grader les lésions observées. Celle-ci est généralement effectuée en fonction de l'évolution du taux sérique des transaminases, reflet de la cytolyse hépatique. L'hépatite chronique est caractérisée par la persistance du virus au niveau sanguin qui pourra être affirmé par la détection par RT-PCR des ARN du VHC dans le plasma. Le traitement de l'hépatite chronique à VHC utilise fréquemment la ribavirine et l'interféron-alpha en bi-thérapie dont l'efficacité est fonction du génotype viral.

### 3.2 VHC et gamètes

#### 3.2.1 VHC et sperme

La présence des ARN du VHC dans le sperme des hommes VHC+ est encore sujet à controverse. En effet, la fréquence de détection des acides nucléiques du VHC varie de 0 % (Hsu et al., 1991; Fried et al., 1992; Terada et al., 1992; Caldwell et al., 1996; Semprini et al., 1998a; Debono et al., 2000), à 5 % (2/39) (Levy et al., 2000), 24 % (4/17) (Liou et al., 1992), 33 % (2/6) (Leruez-Ville et al., 2000), 57 % (4/7) (Tang et al., 1996) et jusqu'à 100 % (3/3) (Liu et al., 1994). Dans une étude très récente, notre équipe a testé 50 spermes issus de 35 hommes VHC+ inclus dans le centre d'AMP de l'hôpital Bichat-Claude Bernard et nous avons détecté les ARN du VHC dans 14 % (7/50) des échantillons testés (Cassuto et al., accepté pour publication). Nos résultats, associés à ceux de certains auteurs (Liou et al., 1992; Liu et al., 1994; Tang et al., 1996; Leruez-Ville et al., 2000; Levy et al., 2000), montrent que la présence du VHC dans les spermes d'hommes infectés est variable et que même si aucun cas de transmission sexuelle du virus de l'homme à la femme n'a été à ce jour documenté, la possibilité de contamination par le sperme VHC+ ne peut être exclue. Dans cette étude, nous avons également quantifié les ARN du VHC de 7 spermes VHC+ et avons observé que les charges virales (CV) dans ces spermes étaient toutes en dessous du seuil de détection de 600 UI/ml. Ce dernier résultat confirme ceux de Leruez-Ville et al. qui ont montré que les CV dans les spermes VHC+ étaient basses, ce qui suggère un risque de contamination sexuelle probablement très faible, ce qui est en accord avec les données épidémiologiques connues (Dienstag, 1997). Différents problèmes liés aux techniques de biologie moléculaire pourraient expliquer pourquoi certains auteurs caractérisent les ARN du VHC dans le sperme des hommes VHC+ alors que d'autres ne les retrouvent pas, notamment le manque de sensibilité de certains tests utilisés et la présence d'inhibiteurs d'amplification dans le liquide séminal (Semprini et al., 1998a; Debono et al., 2000; Levy et al., 2000). Ainsi, le sperme de tout homme atteint d'une hépatite C chronique doit être considéré comme un liquide biologique à risque de contamination virale.

Cependant, la recherche des ARN du VHC dans la fraction de spz sélectionnés pour l'AMP par la succession usuelle d'une centrifugation du sperme après dépôt sur un gradient de densité et d'un lavage suivi (Pasquier et al., 2000) ou non (McKee et al., 1996; Levy et al., 2000) par une migration ascendante (*swim-up*) a toujours été négative, ce que nous avons confirmé dans notre étude.

Il paraît donc clair que le risque concernant l'AMP dans le contexte où l'homme est VHC+ est purement nosocomial et est strictement ciblé au niveau de la manipulation du sperme jusqu'à sa préparation finale, exempte de virus, sécurisant ainsi les étapes ultérieures d'une FIV.

### 3.2.2 VHC et ovocyte

Une seule étude est actuellement disponible concernant le VHC et l'ovocyte. Dans le cadre de la prise en charge en AMP des couples infertiles inclus dans le protocole HEPACAMP, notre équipe a tenté de détecter les ARN du VHC dans les liquides folliculaires (LF) poolés de 6 femmes VHC+, obtenus le jour de la ponction ovarienne (J0) pour fécondation in vitro (FIV) ainsi que dans les milieux d'incubation des embryons transférés ou congelés 2 jours plus tard (J2). À J0, 100% des LF étaient positifs pour la détection des acides nucléiques du VHC alors qu'à J2, aucun milieu de culture embryonnaire n'a permis de détecter les ARN du VHC (Sifer et al., 2002). Nous avons également quantifié le VHC dans les 6 plasmas et LF et avons obtenu une moyenne de CV respectivement égale à  $3,58 + 4,25 \times 10^6$  et  $0,14 + 0,10 \times 10^6$  UI/ml. Nous avons depuis analysé les LF issus de 20 femmes VHC+ étudiés en fonction de leur aspect macroscopique : très sanglant, légèrement sanglant ou citrin. Nos résultats préliminaires montrent que : 1) 80 % des LF tous aspects confondus, 13 % des milieux de fécondation des ovocytes à J1 et 0 % des milieux d'incubation des embryons transférés ou congelés sont VHC+ ; 2) les CV des LF sont proportionnelles à la forte présence de sang ; et 3) la détection positive des ARN du VHC dans les milieux de fécondation des ovocytes à J1 est statistiquement liée à l'aspect sanglant des LF dont ces ovocytes sont issus (article en préparation). Ces résultats sont en faveur d'une contamination sanguine des LF, source du VHC, ce qui implique que le LF issu d'une femme VHC+ ; ainsi que les milieux d'incubation des ovocytes, sont à considérer comme un liquide biologique à risque potentiel de contamination virale dans des proportions probablement plus importantes que le sperme issu d'un homme VHC+.

Le risque concernant l'AMP dans le contexte où la femme est VHC+ semble là aussi purement nosocomial puisque les milieux de culture embryonnaire semblent être tous VHC-. Cependant, le protocole HEPACAMP, visant à comparer le taux de transmission materno-fœtale de 500 grossesses obtenues par AMP à un groupe équivalent de 500 grossesses obtenues spontanément, permettra à

terme d'affirmer qu'il n'existe pas un risque majoré de contamination de l'enfant à naître par une mère VHC+ après AMP, contamination verticale estimée en cas de grossesse spontanée à 5,8 % (3,2 % si VHC+ VIH-, 22,5 % si VHC+ VIH+) (Zanetti et al., 1999).

### 3.3 VHC et FIV

Peu de données sont disponibles sur les tentatives de FIV réalisées dans le cas où l'un des membres du couple ou les deux sont VHC+. Les résultats intermédiaires du protocole HEPACAMP permettent un début d'évaluation. Ce protocole, débuté avant la publication de l'arrêté du 10 mai 2001, n'en suivait donc pas les recommandations et n'imposait donc aucune démarche particulière en termes d'organisation du laboratoire d'AMP ni en termes de procédures techniques de la FIV, qui restaient celles classiquement utilisées en routine, permettant de mesurer à quel titre cette activité représente un danger certain ou hypothétique. De mars 2000 à ce jour, 576 tentatives d'AMP ont été analysées : 1) 317 avec l'homme VHC+ avec 45 grossesses évolutives dont 22 enfants déjà nés, tous VHC- (RT-PCR négative) à 3 mois et aucune séroconversion des femmes VHC- ; 2) 140 avec la femme VHC+ avec 25 grossesses évolutives dont 10 enfants déjà nés avec 1 nouveau-né VHC+ (RT-PCR positive) à 3 mois ; et 3) 19 avec les 2 membres du couples VHC+, sans naissance actuellement.

### 3.4 Risques identifiés et réponses de l'arrêté du 10 mai 2001

Dans toute infection virale connue lors d'une prise en charge pour AMP, 3 risques existent potentiellement : le risque pour le couple si les deux membres sont sérodiscordants et l'enfant à naître, le risque pour le personnel soignant et le risque pour les gamètes des autres couples non infectés, suivis en même temps dans le centre d'AMP pour un problème d'infertilité nécessitant une FIV. Ces deux derniers risques sont de type nosocomial. L'arrêté du 10 mai 2001 impose la mise en place d'un circuit à risque viral identifié, c'est-à-dire une séparation des activités d'AMP à risque viral identifié de celles sans risque viral identifié dans le temps ou dans l'espace, afin de mieux répondre au risque nosocomial inter-conjugal. Afin de réduire le risque pour le personnel soignant, il prévoit une formation soutenue de ce personnel à la manipulation des liquides biologiques à risque infectieux, ainsi que la validation des procédures biologiques et opératoires dans ce

contexte par un Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN). Cela s'applique aussi bien au VHC qu'au VIH. La vaccination contre le VHB est une obligation pour tout personnel soignant et son efficacité doit être contrôlée.

Dans le cas où l'homme est VHC+, le risque de contamination virale, de par l'analyse des études détaillées plus haut, semble se situer au niveau de la manipulation du sperme. En effet aucune étude n'a pu démontrer la présence des acides nucléiques du VHC dans la fraction des spz utilisée pour l'AMP, et ce en utilisant des techniques de détection moléculaire très sensibles (de l'ordre de 20 à 50 copies/ml). Ceci montre que les étapes ultérieures de l'AMP, allant de l'insémination des spz in vivo dans les voies génitales ou in vitro au contact des ovocytes récupérés par ponction ovarienne jusqu'au transfert embryonnaire semblent ne représenter aucun risque de contamination nosocomiale ou intra-conjugale, appuyé par le fait qu'aucune transmission verticale ou horizontale n'a été documentée par l'analyse des résultats préliminaires du protocole HEPACAMP. L'arrêté du 10 mai 2001 impose que le sperme éjaculé issu d'homme VHC+ soit : 1) préparé en suivant les recommandations universelles de sécurité sanitaire devant tout prélèvement biologique à risque ; et 2) testé pour la détection des ARN du VHC dans le liquide séminal (LS) et, si le LS est positif, dans la fraction finale de spz utilisée pour l'AMP. L'utilisation d'un poste de sécurité microbiologique (PSM) (hotte à flux laminaire verticale homologuée) pour la préparation des spermés VHC+, prévue par l'arrêté du 10 mai 2001, permet d'obtenir un niveau maximal de sécurité pour le personnel manipulant ces gamètes et soumis à un risque de contamination virale. Ne disposant pas de test de détection rapide, l'arrêté impose de congeler la fraction finale de spz dans des paillettes haute sécurité et de différer la tentative jusqu'à l'obtention du résultat du test de détection du LS, qui, si négatif, aboutit à une tentative d'AMP effectuée avec du sperme congelé. La question posée par la gestion du risque viral par l'arrêté du 10 mai 2001 dans le contexte où l'homme est VHC+, outre le surcoût occasionné par le circuit de risque viral (test onéreux et non remboursé par la Sécurité sociale, équipements spécifiques...), est de savoir si la congélation/décongélation du sperme n'est pas inutile, voire délétère pour l'issue de la tentative d'AMP, compte tenu du risque hypothétique qu'une fraction purifiée de spz soit infectante sachant qu'aucune étude n'a jamais observé qu'elle puisse être VHC+. Il est en effet connu que la cryopréservation du sperme conduit à une diminution des paramètres de numération, mobilité et vitalité des spz (Donnelly et al., 2001) avec, comme éventuelle conséquence, un faible taux de fécondation des

ovocytes et de grossesse en AMP, ainsi qu'une augmentation significative des tentatives de FIV avec micromanipulation (ICSI) injustifiées sur le plan clinique. D'autre part, les techniques de virologie moléculaire exigent un minimum de 500 000 spz issus de la fraction finale pour détecter le génome du VHC, ce qui exclut de fait les patients oligozoospermiques sévères ainsi que les ICSI avec prélèvement testiculaire de toute prise en charge en AMP dans le contexte où l'homme est VHC+. Le débat est en cours et de nombreux spécialistes de l'AMP tentent actuellement d'amender ce texte afin de supprimer de l'arrêté cette nécessité de congeler le sperme avant la tentative, qui semble réellement peser défavorablement sur le rapport entre coût-bénéfice et risque réel de contamination virale, et qui prive injustement une partie de la population concernée de toute possibilité de projet parental sur le territoire français. Ainsi, les informations disponibles à la fois dans la littérature et par les données partielles du protocole HEPACAMP démontrent que cet arrêté est trop restrictif et justifient une nouvelle évaluation des procédures à appliquer en cas d'AMP pour les hommes VHC+.

Concernant les cas où la femme est VHC+, les résultats préliminaires du protocole HEPACAMP ainsi que ceux de notre étude démontrent le pouvoir potentiellement contaminant des LF et des milieux de fécondation des ovocytes, démontrant un risque viral identifié. Concernant le risque intra-conjugal, il est nul pour l'homme VHC- et l'éventuelle majoration du risque de transmission verticale par l'AMP trouvera prochainement sa réponse à la fin du protocole HEPACAMP, bien que l'on puisse penser, sachant que les milieux de culture embryonnaire ont toujours été négatifs quant à la détection des ARN du VHC, que celui-ci sera équivalent à celui du risque de transmission mère-enfant au cours d'une grossesse spontanée. Les exigences de l'arrêté du 10 mai 2001 et de celui du 12 janvier 1999 semblent adaptées en matière de prise en charge en AMP de couples dont la femme est VHC+. Ainsi la notion de circuit viral et de procédures d'AMP séparées dans le temps ou dans l'espace trouve ici toute sa valeur et permet d'éliminer le risque nosocomial entre les couples infectés et non infectés. Le respect des précautions de sécurité sanitaire lors du déroulement de la FIV, validé par le CLIN, comprenant entre autres, le port du masque de protection, une surblouse, un bouchage hermétique des seringues de transport, des seringues de ponction contenant le LF, une élimination de tout matériel coupant, tranchant ou piquant permet de gérer au mieux le risque pour le personnel soignant. Cependant, l'arrêté du 10 mai 2001 ne prévoit rien quant à la gestion des activités d'AMP dans le contexte : homme

VHC+, femme VHC- et homme VHC-, femme VHC+. En effet, les niveaux de risque étant situés à des niveaux différents, n'y a-t-il pas un risque majoré de contamination virale pour les embryons issus d'une femme VHC- par les LF ou les milieux de fécondation issus d'une femme VHC+ qui, bien que clairement séparés de l'activité d'AMP des couples non infectés et donc en conformité avec la loi, pourraient créer un risque de contamination par le VHC inter-conjugal. Même si les milieux d'incubation des embryons au terme de la FIV semblent exempts de virus, il convient de mettre en place une procédure particulière pour gérer ce risque qui n'est pas prévu par l'arrêté.

## 4. VIH ET AMP

### 4.1 Généralités

Le VIH est un virus enveloppé à ARN négatif monocaténaire appartenant à la famille des *Retroviridae*. Les cellules CD4+ sont permissives à ce virus (macrophages et dérivés, lymphocytes T4). Son génome s'intègre dans le génome de la cellule hôte après rétrotranscription virale de l'ARN en ADN complémentaire, transformant le VIH en provirus. Le mode de contamination est essentiellement sexuel ou par voie sanguine. Le diagnostic d'infection à VIH est indirect et repose sur la caractérisation des anticorps anti-VIH sériques.

### 4.2 VIH et gamètes

#### 4.2.1 VIH et sperme

##### 4.2.1.1 Localisation dans les cellules rondes (leucocytes) et le LS

La localisation du VIH dans le sperme a été étudiée par de nombreuses équipes depuis qu'a été prouvée et confirmée en culture cellulaire l'infectivité des cellules de sperme issues de sujets séropositifs pour ce virus (Zagury et al., 1984, Brechard et al., 1997a). Différentes études ont montré que l'infection de cultures lymphocytaires par les cellules de sperme était positive chez 9 % (Anderson et al., 1992) à 55 % (Vernazza et al., 1996) des patients VIH+. La positivité de ces cultures était étroitement associée : 1) au taux de lymphocytes CD4+ dans le sang ; 2) au stade de la maladie ; 3) au nombre de leucocytes



dans le sperme, avec ou sans signe clinique d'infection uro-génitale ; et 4) à l'existence d'un traitement par zidovudine (Anderson et al., 1992, Xu et al., 1997). Il est à noter que le LS est responsable d'une nécrose cellulaire massive lorsqu'il est mis en contact avec les cellules *in vitro* et qu'il ne doit pas être étudié de ce fait dans ces conditions (Vallely et al., 1988, Vernazza et al., 1996).

Une autre étude a montré que l'ADN proviral du VIH était retrouvé dans 50 % des fractions de cellules rondes, obtenues après Percoll®, de spermatozoïdes infectés par le VIH contre 88 % des échantillons de cellules mononucléées du sang périphérique (Quayle et al., 1997). Ces résultats sont à rapprocher de ceux rapportés par plusieurs auteurs (Mermin et al., 1991, Liuzzi et al., 1996, Brechard et al., 1997a, Dulioust et al., 1998). Une étude récente a montré que l'ARN et l'ADN du VIH-1 étaient détectés dans respectivement 30 % et 18 % des LS provenant de spermatozoïdes issus d'hommes VIH+ (Pasquier et al., 2000).

Les études concernant la CV du VIH dans le LS comparée à la CV plasmatique suscitent une première controverse. En effet, différentes équipes (Vernazza et al., 1997a, Dulioust et al., 1998, Tachet et al., 1999) rapportent une étroite corrélation entre ces deux charges avec, plus fréquemment, une CV dans le LS inférieure à la CV plasmatique. Par contre d'autres équipes (Luizzi et al., 1996, Coombs et al., 1998, Pasquier et al., 2000) ne trouvent aucune corrélation entre la présence du VIH dans le plasma et le LS et émettent l'hypothèse d'une compartimentalisation du virus dans le sperme avec production locale du virus par les cellules hôtes au niveau du tractus uro-génital. L'ensemble de ces équipes s'accorde toutefois pour dire que les acides nucléiques viraux sont présents aussi bien dans le LS que dans la fraction cellulaire non spermatozoïdaire des spermatozoïdes de patients VIH+, avec une fréquence de détection plus élevée dans le LS que dans les cellules rondes. Les charges virales du LS semblent par ailleurs nettement diminuées (de 5 à 100 log) par une trithérapie antirétrovirale (Vernazza et al., 1997b). Cette dernière équipe a mesuré la CV séminale chez des patients VIH+ sous trithérapie avec une CV plasmatique indétectable (Vernazza et al., 1998) et rapporte que 2 % des patients avaient une CV séminale détectable mais faible. Ces résultats ont été confirmés par des travaux analogues (Zhang et al., 1998), mais qui toutefois rapportent une fréquence plus élevée (57 %) de détection des ARN du VIH dans le LS chez des sujets à CV plasmatique indétectable, reprenant ainsi l'hypothèse d'une compartimentalisation du virus dans le sperme des sujets infectés par le VIH. Cette compartimentalisation pourrait être la conséquence d'une médiocre diffusion des médicaments antiviraux dans le tractus génital. Taylor et al., (1998) ont

en effet montré que la concentration en antiprotéases dans le LS de sujets VIH+ traités était toujours inférieure à 5 % de la concentration plasmatique (Taylor et al., 1998). Une autre hypothèse pouvant expliquer cette compartimentalisation est basée sur la mise en évidence de quasi-espèces du VIH dans le LS et le plasma de patients VIH+ sous traitement antirétroviral (Liuzzi et al., 1998, Eron et al., 1998), avec coexistence de génotypes différents se traduisant phénotypiquement par une résistance virale variable aux différents traitements.

#### *4.2.1.2 Localisation dans les cellules de la lignée germinale et les spermatozoïdes*

La localisation du VIH dans les spz et dans les cellules germinales fait l'objet d'une deuxième controverse. En effet, différents travaux ont montré en microscopie électronique (ME) une adsorption à la surface membranaire et/ou une pénétration du VIH dans des spz éjaculés de malades atteints du SIDA ou dans des spz de donneurs sains incubés avec de fortes concentrations de virus (Borzy et al. 1988, Baccetti et al. 1991, Dussaix et al. 1993), Dussaix et al. 1993) ont rapporté la contamination de cultures cellulaires infectées par des spz de donneurs sains préalablement incubés avec du VIH mais n'ont pas observé que le virus se multipliait dans les spz. La pénétration du virus dans le spz ou dans les cellules de la lignée germinale a été confirmée par l'hybridation in situ et la PCR in situ (Bagasra et al., 1994, Baccetti et al., 1994, Nuovo et al., 1994, Scofield et al., 1994, Muciaccia et al., 1998). De plus, une équipe a montré qu'il était possible de contaminer un ovocyte lors d'une fécondation in vitro (FIV) avec des spz issus d'un sujet VIH+ en mettant en évidence, par ME, des particules virales au stade 8 blastomères d'un embryon, démontrant de plus la conservation du pouvoir fécondant de tels spz (Baccetti et al., 1994). À l'inverse, une étude récente, basée sur la ME et la PCR in situ et confrontant ses résultats à des témoins positifs et négatifs, a mis en évidence le virus ou l'ADN proviral uniquement dans les cellules non spermatozoïdaires (Pudney et al., 1998). Le VIH et/ou ses acides nucléiques n'ont jamais été retrouvés dans les cellules germinales, quel que soit le stade de différenciation de la spermatogenèse, et aucun attachement du VIH aux spz n'a été observé dans cette étude (Pudney et al., 1998). Les auteurs soulignent la difficulté qu'il y a à reconnaître en ME particules virales et vésiculation acrosomique et rappellent que la technique de PCR in situ génère de nombreux faux positifs.

D'autres équipes se sont intéressées à l'aspect moléculaire de l'adsorption et/ou de la pénétration du VIH dans les spz. Une étude de cytométrie en flux a démontré que les cellules CD45- (cellules ger-

minales et spz) ne portent pas le récepteur CD4 sur leur membrane plasmique (Gil et al., 1995). De plus, la co-incubation de spz sains avec un anticorps anti-CD4 n'inhibe pas la contamination de ces spz par le VIH (Dussaix et al., 1993). Une seule étude à notre connaissance affirme que le CD4 est présent sur les spz (Gobert et al., 1990), mais n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. Une étude récente a mis en évidence l'absence dans la membrane plasmique du spz du récepteur CD4 mais aussi des co-récepteurs CXCR-4 et CCR-5 (Kim et al., 1999). Ces derniers appartiennent à la famille des bêta-chemokines et sont décrits comme nécessaires à l'entrée du VIH dans les cellules permissives à ce virus. L'hypothèse d'une éventuelle autre voie de pénétration du VIH dans les spz est donc posée par la probable absence du récepteur CD4. Un récepteur de l'antigène HLA-DR du complexe majeur d'histocompatibilité, présent sur la membrane plasmique des spz, a été proposé comme potentialisateur de l'infection de cellules permissives HLA-DR+ par le VIH (Scofield, 1998, pour revue). Brièvement, la liaison de spz avec des lymphocytes et des macrophages *in vitro*, par interaction moléculaire de type récepteur-ligand : 1) modifie la sécrétion de cytokines par les lymphocytes et les macrophages et les rend plus sensibles, par coopération cellulaire, à l'infection par du VIH libre ; et 2) facilite une infection cellulaire directe par internalisation du spz éventuellement porteur du virus.

Quant à la compréhension du phénomène d'adsorption du VIH sur le spz, une équipe a observé une agglutination des têtes de spz entre elles en présence de la boucle peptidique V3, ligand du CD4+ au niveau de la glycoprotéine 120 (gp 120) (Brogi et al., 1995). Cette agglutination n'était pas inhibée par un anticorps anti-CD4. D'autres auteurs ont mis en évidence, par immunohistochimie et biochimie, une molécule de type galactosyl-céramide (galactosylalkylacylglycérol sulfaté ou non), présente sur la membrane cytoplasmique des spermatogonies et des spz, capable d'interagir avec la gp 120 et ont proposé cette molécule comme responsable de l'adsorption du VIH (Gadella et al., 1993, Baccetti et al., 1994, Brogi et al., 1995).

Après séparation par immunobilles magnétiques des sous-fractions cellulaires constituant les cellules rondes de spermés infectés par le VIH, l'ADN proviral, recherché par PCR, n'a été retrouvé que dans les lymphocytes T (75 % des patients) et les macrophages (38 %) mais jamais dans les cellules germinales ni dans les spz (Quayle et al., 1997). Ces résultats sont à relier à d'autres travaux qui rapportent également l'absence d'acides nucléiques viraux dans la lignée germinale (Mermin et al., 1991, Semprini et al., 1992, Kim et al., 1999). Cependant la litté-

rature signale la possibilité d'observer avec une fréquence rare : 1) une faible détection d'ADN (5 %) dans les spz sélectionnés après Percoll® (Dulioust et al., 1998) ou Percoll®/*swim-up* (Marina et al., 1998a) ; et 2) une détection d'ARN (14,6 % à 17 %) dans ces spz (Dulioust et al., 1998, Tachet et al., 1999). La présence d'ARN dans la fraction des spz était reliée à un taux faible de cellules CD4+ ainsi qu'à une CV séminale supérieure à la CV plasmatique (Dulioust et al., 1998, Tachet et al., 1999). Ces résultats soulignent la nécessité de mettre en œuvre d'autres études pour savoir si la charge du LS est un marqueur d'inféctivité des fractions de spz purifiés, utilisés dans les techniques d'AMP.

#### 4.2.1.3 Modifications des paramètres spermatiques lors de l'infection à VIH

Les effets de l'infection à VIH sur les différents paramètres spermatiques ont également été étudiés. Il a été montré que l'infection à VIH non traitée diminue significativement : 1) la mobilité ; 2) la concentration ; 3) le pourcentage de formes typiques et augmente significativement le nombre de cellules rondes et de leucocytes dans l'éjaculat (Crittenden et al., 1992, Gresenguet et al., 1992, Politch et al., 1994, Dondero et al., 1996, Muller et al., 1998, Dulioust et al., 2002). Toutes ces études ont rapporté une étroite corrélation entre : 1) le taux de lymphocytes CD4+ dans le sang ; 2) le stade clinique de la maladie avec ou sans thérapie antirétrovirale, et les modifications pathologiques des paramètres spermatiques qui sont observées uniquement dans la population des patients en phase d'état du SIDA. Deux études montrent qu'il existe une augmentation significative du nombre de leucocytes dans les spermatozoïdes des patients entrés dans la maladie, comparés aux patients VIH+, ainsi que pour les spermatozoïdes des patients VIH+ comparés à la population témoin séronégative (Xu et al., 1997, Quayle et al., 1997). Un travail récent a démontré que la CV séminale des sujets infectés par le VIH et atteints d'une maladie sexuellement transmissible était 10 fois plus élevée que celle de patients VIH+ sans uréthrite, et ceci sans que la charge plasmatique du VIH soit significativement différente entre les deux groupes (Cohen et al., 1997).

L'étude des relations du VIH avec les différentes fractions du sperme présente plusieurs intérêts. D'un point de vue fondamental, il a été formellement démontré que le VIH est présent dans le LS à l'état libre et dans les leucocytes du sperme, sa présence dans le spz étant encore sujet à controverse. D'un point de vue pratique, l'étude des localisations de ce virus dans les différentes fractions du sperme a permis de démontrer : 1) que les techniques de préparation du sperme

pouvaient considérablement diminuer, voire annuler, le pourcentage de patients ayant encore du VIH dans la fraction des spz ; et 2) que la positivité des spermatozoïdes infectés vis-à-vis du VIH était étroitement associée à des paramètres biologiques et cliniques tels que le stade de la maladie, le taux de CD4+ dans le sang, le nombre de leucocytes séminaux, la présence d'une infection uro-génitale et la CV plasmatique. Ainsi, l'augmentation des connaissances scientifiques et médicales a eu pour conséquence de pouvoir répondre à une demande d'AMP intraconjugale chez des couples sérodifférents dont l'inclusion dépendra notamment des différents paramètres rappelés plus haut, repris en totalité par l'arrêté du 10 mai 2001.

#### 4.2.2 VIH et ovocytes

Il n'y a pas de données disponibles sur le statut virologique du LF et de l'ovocyte des femmes VIH+. La ponction folliculaire, par son caractère invasif, est source d'un contact des ovocytes avec le sang infecté, éventuellement contaminant. Un lavage virologiquement contrôlé des ovocytes pourrait être une solution pour garantir l'absence de VIH au contact des gamètes mâles et femelles lors d'une FIV. Une étude récente a démontré : 1) l'absence d'infectivité de l'ovocyte par le VIH après cocubation ovocyte/VIH ; 2) l'absence d'ARN messagers par RT-PCR du récepteur CD4 et des co-récepteurs CCR-5 et CXCR-4 ; et 3) l'absence de structure galactosyl céramide sur l'ovocyte (Baccetti et al., 1998). Ces travaux rendent donc improbable la contamination virale de l'ovocyte, puisque aucune porte d'entrée connue du virus n'a été mise en évidence. Par contre, les risques nosocomiaux et professionnels engendrés par la manipulation de produits biologiques sanglants prennent ici toute leur importance, de par la spécificité des laboratoires d'AMP, et notamment du fait de l'absence de hottes à flux vertical homologuées dans leur utilisation en AMP, bien que recommandées dans l'arrêté du 10 mai 2001.

#### 4.3 VIH et FIV

Certaines équipes européennes ont pris en charge par AMP le désir de grossesse chez les couples sérodifférents pour le VIH où seul l'homme est séropositif (Semprini et al., 1992, Brécard et al., 1997a, Marina et al., 1998a, Tur et al., 1999). Un seul cas de séroconversion féminine, survenue après insémination intra-utérine (IIU), est rapporté par le CDC d'Atlanta (*Center for Diseases Control*, 1990) et fait état d'un traitement inadéquat du sperme, effectué par simple lavage. Le proto-

cole de préparation des spermés VIH+ doit donc être préalablement évalué quant à sa capacité à débarrasser du VIH la fraction de spz à inséminer.

Les travaux de Semprini et al. rapportent la réalisation de 1461 cycles d'IU chez 443 couples fertiles avec obtention de 216 naissances, soit un taux de grossesses par cycle d'IU de 14,8 % (Semprini et al., 1998b). Initialement, Semprini et al. ont utilisé une technique d'immunofluorescence pour mettre en évidence une protéine du VIH : 1) dans 10,2 % des fractions cellulaires non traitées ; 2) pour 4,2 % des culots de spz lavés après gradient (Semprini et al., 1992). La recherche du VIH était toujours négative dans les spz récupérés après *swim-up* (Semprini et al., 1992). Secondairement, l'utilisation de la RT-PCR pour tester la fraction purifiée des spz n'a jamais détecté d'ARNm du VIH (Semprini et al., 1998b). Aucune séroconversion, à 3 mois et plus, de la femme et des enfants nés n'a été rapportée sur l'ensemble de ces tentatives.

Les travaux de Marina et al. rapportent les résultats concernant 181 IU chez 105 couples sérodifférents dont 74 % recevaient un traitement anti-rétroviral (Marina et al., 1999). Sur 107 spermés préparés, 5,6 % des fractions de spz obtenues après *swim-up* présentaient une détection positive pour l'ADN proviral (Marina et al., 1998a). Les couples concernés ont alors été exclus de la tentative d'IU jusqu'à négativation de la détection VIH sur les éjaculats suivants. En effet d'autres auteurs avaient déjà démontré la possibilité de ne plus détecter de virus dans des prélèvements successifs de sperme d'un même patient VIH+ (Brechard et al., 1997b, Krieger et al., 1995). Marina et al. (1999) rapportent un taux de grossesses cliniques de 32,6 % par cycle d'IU avec 59 grossesses cliniques aboutissant à 57 enfants nés sans aucune séroconversion des femmes et des enfants nés, après suivi virologique approprié.

Brechard et al., (1997) rapportent une petite série de 11 tentatives d'IU chez des couples VIH sérodifférents avec obtention de 5 grossesses sans contamination des mères et des enfants nés. L'étude préalable de 63 spermés issus de patients VIH+ leur avait permis d'établir que : 1) par les méthodes cellulaires de détection du VIH, 19 % des fractions de cellules rondes testées et 4 % des LS avaient infecté une culture de lymphocytes de sang de cordon ; et 2) par les méthodes moléculaires, 40 % des fractions de cellules rondes présentaient une détection positive d'ADN. Aucune des deux méthodes n'a permis d'isoler le VIH ou ses acides nucléiques dans les fractions de spz.

Les travaux de Tur et al. rapportent les résultats de 190 cycles de stimulation chez 79 couples sérodifférents pour le VIH avec réalisa-

tion de 155 IIU. Dans les conditions méthodologiques choisies, 7,9 % des cycles de stimulation n'ont pas donné lieu à une IIU en raison de la positivité du VIH après amplification moléculaire dans la fraction de spz à inséminer. Les auteurs rapportent un taux de grossesses cliniques de 20,6 % par cycle d'IIU équivalent à un taux de grossesses de 50 % par couple pour une moyenne de 2,3 cycles d'IIU par couple. Il est à noter que 2,1 % des cycles n'ont pas été suivis d'IIU en raison des faibles quantités de spz récupérés après sélection par gradient.

Les premiers cas de grossesses obtenues après ICSI chez des couples VIH sérodifférents ont été récemment publiés (Marina et al., 1998b, Marina et al., 1999). Le sperme a été purifié selon le protocole de préparation des spz pour IIU décrit par la même équipe avec une étape supplémentaire de congélation de la fraction des spz purifiés. À 3 mois du transfert embryonnaire, la séronégativité des femmes a été démontrée par les tests sérologiques appropriés. Les auteurs proposent l'ICSI chez les couples VIH sérodifférents lors de stérilité tubaire, lors d'échecs répétés de cycles d'IIU ou lorsque les paramètres spermatiques après préparation du sperme ne permettent pas d'effectuer une IIU avec les meilleures chances de succès (Marina et al., 1999). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Semprini qui, au congrès international de biologie de la reproduction à Sydney en 1999, faisait état de l'obtention de 13 grossesses cliniques pour 60 transferts embryonnaires après FIV d'indication tubaire pure, soit un taux de grossesses par transfert de 22 % (Semprini et al., 1999).

Récemment, les résultats préliminaires du protocole NECO ont été publiés. Sur 68 couples fertiles inclus, dont l'homme était VIH+, 97 cycles d'ICSI ont été effectués donnant 34 grossesses évolutives (35,1 %) dont 17 enfants sont nés. Aucune séroconversion n'a été observée ni chez les femmes VIH-, ni chez les enfants nés (Guibert et al., 2001).

Mis à part l'adoption, en ce qui concerne le cas où la femme est séropositive pour le VIH, seules les auto-inséminations pouvaient, avant l'arrêt du 10 mai 2001, représenter une attitude sans risque pour le partenaire, tout en déresponsabilisant le clinicien d'une éventuelle transmission du VIH de la mère à l'enfant. Cette position n'est pas satisfaisante car elle ne fait pas état de l'obligation de moyens de tout médecin. Une étude française récente a démontré que la pratique d'une césarienne programmée avant rupture des membranes, chez 902 femmes sous zidovudine, permettait de réduire le taux de transmissions verticales à 0,8 % contre : 1) 6,6 % après accouchement par voie basse ; et 2) 11,4 % après césarienne post-rupture (Mandelbrot et al. 1998). Ces résultats sont en voie d'être confirmés par des essais

thérapeutiques pilotés par l'ANRS qui semblent d'ailleurs montrer que chez les femmes à CV indétectable, représentant plus de 95 % de la population des femmes VIH+ en France, le risque de transmission verticale ne serait statistiquement pas différent, que ce soit par césarienne programmée ou par accouchement par voie basse. Aucune étude n'est disponible dans la littérature concernant la prise en charge en AMP de femmes VIH+. Cependant, l'arrêté du 10 mai 2001 autorise à présent cette prise en charge dans les conditions citées au chapitre 2, retenant des critères d'inclusion semblables à ceux d'un homme VIH+.

#### 4.4 Risques identifiés et réponses de l'arrêté du 10 mai 2001

Depuis la découverte du VIH, sa présence dans le sperme éjaculé des sujets séropositifs pour ce virus (Zagury et al., 1984) et l'implication du sperme comme vecteur de transmission du VIH lors d'une insémination artificielle avec sperme de donneur (Stewart et al., 1985), certaines études ont rapporté la possibilité que les différentes techniques usuelles de préparation des spz en vue d'utilisation pour l'AMP pouvaient ne pas suffire à en éliminer le virus (Marina et al., 1998a, Dulioust et al., 1998, Tachet et al., 1999). Ainsi, le risque théorique de contamination par le VIH lors de l'AMP s'établit à deux niveaux : d'une part, la contamination probable par le sang des ovocytes au décours d'une ponction sanglante des follicules chez une femme à super-ovulation induite, et, d'autre part, la contamination par le sperme. Beaucoup de résultats sont disponibles concernant l'étude virologique du sperme, ce qui n'est pas le cas concernant l'ovocyte et le liquide folliculaire. C'est donc seulement chez l'homme que l'on peut évaluer actuellement le risque infectieux lors d'une AMP. Concernant le risque de contamination inter-conjugale des gamètes d'un couple non infecté par le LF ou le sperme d'un couple dont l'un des membres est VIH+, la séparation des 2 activités dans le temps ou dans l'espace, prévue par l'arrêté du 10 mai 2001, l'élimine totalement.

Dans le cas où l'homme est VIH+, le risque théorique de contamination virale, de par l'analyse des études détaillées plus haut, semble se situer au niveau de la manipulation du sperme, ainsi que celle de la fraction des spz utilisée pour l'AMP. Ceci montre que les étapes ultérieures de l'AMP, allant de l'insémination des spz in vivo dans les voies génitales ou in vitro au contact des ovocytes récupérés par ponction ovarienne jusqu'au transfert embryonnaire, pourraient représenter un risque de contamination nosocomiale ou intra-conjugale. Ainsi, la



congélation de la préparation des spz, utilisable pour la tentative d'AMP que si la CV et la détection des acides nucléiques (ARN et ADN) du VIH-1 dans le LS et dans la fraction finale est respectivement inférieure à 10 000 copies/ml et négative, imposée par l'arrêté du 10 mai 2001, s'avère totalement justifiée et permet à la fois : 1) d'éliminer le risque de transmission horizontale de l'homme vers la femme lors de l'AMP puisque, dans ces conditions, l'ensemble des données disponibles dans la littérature démontre l'absence de séroconversion féminine dans ce contexte ; et 2) d'éliminer le risque nosocomial de contamination par le VIH-1 du personnel soignant pour toutes les étapes ultérieures à la manipulation du sperme VIH+, c'est-à-dire la procédure biologique de FIV proprement dite. Comme pour le VHC, l'utilisation d'un PSM pour la manipulation des spermatozoaires VIH+, prévue par l'arrêté du 10 mai 2001, permet de garantir un risque minimum de contamination virale pour le personnel traitant ces gamètes. Comme pour le VHC, un minimum de 500 000 spz issus de la fraction finale est nécessaire pour détecter le génome du VIH-1, ce qui exclut de fait les patients oligozoospermiques majeurs ainsi que les ICSI avec prélèvement testiculaire de toute prise en charge en AMP dans le contexte où l'homme est VIH+.

Dans le cas où la femme est VIH+, aucune étude n'est disponible concernant le pouvoir potentiellement contaminant des LF, des milieux de fécondation des ovocytes ou de culture embryonnaire. Toutefois, même si la CV plasmatique des femmes incluses est basse, ce risque est retenu comme potentiel par l'arrêté du 10 mai 2001. Concernant le risque intra-conjugal, il est nul pour le conjoint VIH- et l'éventuelle majoration du risque de transmission verticale par l'AMP, ainsi que l'efficacité des protocoles de traitements anti-rétroviraux visant à prévenir ce risque reste à évaluer, en fonction du statut viral des LF et des différents milieux de culture embryonnaire. Le risque nosocomial pour le personnel soignant est rendu minimal, tout comme pour le VHC, par le respect des règles universelles de sécurité sanitaire lors du déroulement de la FIV, rédigées par l'équipe du laboratoire et celle du bloc opératoire puis validées par le CLIN, comprenant entre autres, le port du masque de protection, une surblouse, un bouchage hermétique des seringues de transport, des seringues de ponction contenant le LF, une élimination de tout matériel coupant, tranchant ou piquant. De plus, l'homologation des hottes à flux laminaire vertical adaptées pour utilisation en AMP et requises par l'arrêté est en cours.

Tout comme pour le VHC, l'arrêté du 10 mai 2001 ne prévoit rien quant à la gestion des activités d'AMP dans le contexte : homme

VIH+, femme VIH- et homme VIH-, femme VIH+, qui pourrait créer un risque inter-conjugal de contamination par le VIH. Là aussi, il convient de mettre en place une procédure particulière pour gérer ce risque théorique, non prévu par l'arrêté.

Enfin, concernant l'enfant à naître, le risque que celui-ci soit rapidement orphelin de son père ou de sa mère, du fait d'une évolution péjorative de l'infection VIH, est minimisé par les critères d'inclusion retenus par l'arrêté, à savoir une excellente stabilité immunologique, infectieuse et psychologique, rigoureusement contrôlée par l'équipe pluridisciplinaire structurée.

## 5. VHB ET AMP

### 5.1 Généralités

Le VHB est un virus enveloppé à ADN bicaténaire appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* ayant un tropisme démontré pour les hépatocytes et les cellules hématopoïétiques immatures de la moelle osseuse du sang périphérique. Doté d'une rétrotranscriptase virale, son génome a la capacité de s'intégrer dans celui de l'hépatocyte. Le mode de contamination est multiple et notamment par voie sexuelle. Difficilement cultivable *in vitro*, le diagnostic d'infection à VHB repose sur la caractérisation des antigènes sériques HBs (Ag HBs) et par les anticorps anti-VHB sériques (Ac anti-HBc et Ac anti-HBs). L'hépatite chronique est caractérisée par la persistance du virus au niveau sanguin d'une durée supérieure à 6 mois, qui pourra être affirmée à la fois par la détection après ce délai de l'ADN du VHB dans le plasma par PCR et par la positivité de l'Ag HBs. L'hépatite chronique à VHB sera dite persistante ou active selon le profil sérique de certains marqueurs biologiques tels que l'Ag et l'Ac anti-HBe. Cette hépatite chronique nécessite le même suivi médical que celui de l'hépatite chronique due au VHC. Plus de 300 millions de sujets dans le monde répondant au profil Ag HBs+, ADN- sont dits porteurs chroniques sains et ne développent pas de lésions cytolitiques hépatiques. Un vaccin recombinant, utilisant la production d'Ag HBs par clonage de différentes séquences géniques de cette protéine et transfection dans une levure ou dans une bactérie, a largement démontré son efficacité et représente un excellent moyen de prévention de cette maladie.

## 5.2 VHB et gamètes

### 5.2.1 VHB et sperme

Très peu d'études sont disponibles dans la littérature sur ce sujet. Une équipe a recherché l'ADN du VHB dans le sperme de 14 sujets répondant au profil sérique : Ag HBs+, ADN+ et l'a détecté chez 100 % (14/14) d'entre eux (Davison et al., 1987). Une autre étude a montré que l'ADN du VHB pouvait s'intégrer dans le génome du spz durant la phase aiguë de l'hépatite B (Hadchouel et al., 1985). Ce résultat, s'il était confirmé par d'autres études, pose la question de savoir s'il pourrait exister un risque de transmission verticale du VHB du père vers l'enfant via les spz. Cependant, il n'a jamais été publié de contamination par le VHB d'un enfant issu d'un père VHB+ et d'une mère VHB-.

### 5.2.2 VHB et ovocyte

Il n'y a pas de données disponibles sur le statut virologique du LF et de l'ovocyte des femmes VHB+. Il est là aussi probable que la ponction ovarienne induise une contamination des LF par le VHB, d'origine sanguine, ce qui implique que les LF et tout milieu de culture embryonnaire doivent être considérés comme à risque viral potentiel.

## 5.3 VHB et AMP

L'arrêté du 12 janvier 1999 autorisait la prise en charge en AMP des couples VHB+ à la condition que le praticien respecte les recommandations vaccinales émises par le conseil supérieur d'hygiène publique de France en matière d'hépatite B. Cependant, aucune étude ne fait état dans la littérature de cette prise en charge.

## 5.4 Risques identifiés et réponses de l'arrêté du 10 mai 2001

Les risques viraux liés à la prise en charge des couples VHB+ en AMP sont de nature nosocomiale et intraconjugale. Le risque intraconjugal est différent selon que le membre porteur du VHB est l'homme ou la femme. S'il s'agit de l'homme, le risque de transmission horizontale est théoriquement nul du fait de la possibilité de vac-

ciner la conjointe et de vérifier la protection vaccinale par la présence d'Ac anti-HBs. S'il s'agit de la femme, le risque est nul en AMP pour le conjoint et seul le risque de transmission verticale est à considérer. Ce risque est identifié dans la littérature lors de grossesses spontanées (Botta-Fridlund et al., 1994 ; Michielsen et al. 1999). Ces études rapportent que le risque pour la mère Ag HBs+ de transmettre le VHB à l'enfant est respectivement de 2 à 15 % si la femme est ADN VHB- et de 80-90% si elle est ADN VHB+ en absence de sérovaccination de l'enfant. De plus, la sérovaccination (vaccination et immunothérapie passive), effectuée dans les 72 heures après la naissance, permet de réduire ce risque de plus de 90 %. Les tests de biologie moléculaire visant à quantifier le génome du VHB avaient encore récemment un seuil de détection de 700 000 copies/ml jusqu'à que des tests dits de 3<sup>e</sup> génération arrivent sur le marché, ramenant ce seuil à 1000 copies/ml. Il est donc probable que le risque de transmission verticale chez une femme Ag HBs+, ADN VHB- soit sûrement surestimé dans ces études. Ainsi, le risque de transmission intraconjugale en AMP semble extrêmement faible, quel que soit le membre porteur du VHB, lorsque l'on s'adresse à une population de porteurs chroniques sains de ce virus, du fait : 1) de la CV plasmatique indétectable à un seuil très acceptable de sensibilité des techniques de quantification ; et 2) de l'existence d'un traitement préventif d'excellente efficacité. Ce risque est probablement plus élevé lorsque l'on s'adresse aux femmes Ag HBs+, ADN VHB+ et reste à évaluer en AMP. Le risque nosocomial s'adresse à 2 catégories de population : le personnel soignant et les couples VHB- inclus en AMP dont la tentative serait réalisée en même temps que celle d'un couple VHB+. Le risque de contamination professionnelle est théoriquement nul puisque tout personnel médical et paramédical est vacciné contre le VHB. Cependant la protection vaccinale doit être vérifiée car une faible partie de la population générale échappe, sans que l'on sache l'expliquer, à l'efficacité des schémas vaccinaux classiques. L'arrêté du 12 janvier 1999 et celui du 10 mai 2001 sont ainsi tout à fait adaptés à la gestion du risque intraconjugal et professionnel, exigeant que les recommandations vaccinales émises par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France en matière d'hépatite B soient respectées. Le risque nosocomial de contamination interconjugale par le VHB, lorsque le membre infecté du couple est Ag HBs+, ADN VHB+, est un risque potentiel ayant certainement une probabilité de survenue plus forte que celui par le VHC ou le VIH, du fait de la forte contagiosité de ce virus et sa probable présence dans le sperme ou le LF. L'arrêté du 10 mai 2001 concernant la prise en charge des couples VHB+ n'impose pas la

recherche de l'ADN du VHB, que ce soit dans le sperme ou dans le LF. Il impose par contre que le sperme soit traité dans un circuit spécifique de risque viral. Ainsi, la séparation dans le temps ou dans l'espace des activités d'AMP concernant les couples VHB+ de celles concernant les couples VHB-, nécessitée par l'arrêté, permet, comme pour les autres virus, d'éliminer le risque de contamination des gamètes entre ces couples et est totalement justifiée. La forte homologie génique des souches de VHB infectant les patients, toutes accessibles à une protection des partenaires VHB- par le vaccin, implique qu'il n'y a probablement pas de risque surajouté de contamination entre les couples : 1) dont l'un des membres est Ag HBs+, ADN VHB+ et ceux dont l'un des membres est Ag HBs+, ADN VHB-, pris en charge simultanément ; et 2) selon que le membre porteur du VHB est l'homme ou la femme, et ce, contrairement au VIH et au VHC.

## 6. CONCLUSIONS

L'arrêté du 10 mai 2001 a permis la prise en charge en AMP des patients infectés par le VHC, le VIH et le VHB par tous les centres de stérilité désireux d'effectuer ces activités. Avant lui, l'arrêté du 12 janvier 1999 avait ouvert cette possibilité, cependant restreinte à seulement quelques centres du fait de la nécessité de prendre en charge en AMP les couples à risque viral sous la forme d'un protocole de recherche clinique, alourdissant ainsi nettement les formalités administratives. Deux types de risque sont à prendre en considération dans cette activité, le risque intraconjugal et le risque nosocomial (interconjugal et professionnel). Cet arrêté prône le respect des recommandations universelles de sécurité sanitaire devant tout prélèvement biologique considéré à risque viral et édicte des règles de précaution de manipulation des échantillons par le personnel soignant afin de réduire au maximum le risque de contamination professionnelle. De plus, afin de protéger les couples non infectés contre la possibilité d'une contamination par les gamètes issus de couples infectés, cet arrêté prône la notion de circuit à risque viral bien identifié avec séparation dans le temps ou dans l'espace des activités d'AMP soumises à ce risque. Même si les différentes recommandations de l'arrêté du 10 mai 2001 sont justifiées au regard du risque viral, leur application suggère une organisation spécifique des centres d'AMP et de l'équipe plu-

ridisciplinaire renforcée, ce qui, en contrepartie, alourdit nettement les procédures de prise en charge et leur coût, souvent au détriment du couple lui-même. En effet, ce couple devra non seulement situer les rares centres désireux de réaliser ces activités à risque viral, fréquemment éloignés de leur domicile, mais aussi s'y déplacer régulièrement, parfois après un long délai d'attente pouvant mettre en jeu l'issue de l'AMP, afin de construire leur dossier médical. La gestion du risque intraconjugal par l'arrêté du 10 mai 2001 nécessite de congeler les spermés VIH+ et VHC+ afin de disposer d'un délai suffisant pour vérifier l'absence d'acides nucléiques de ces virus par biologie moléculaire, condition sine qua non pour effectuer la tentative d'AMP. Ayant un effet délétère sur la qualité des spz après décongélation, la congélation de sperme modifie ainsi souvent l'indication clinique de l'AMP en faveur de l'ICSI, technique récente qui, bien que révolutionnant les possibilités de prise en charge en infertilité, n'est toujours pas évaluée à long terme. Enfin, la consommation d'un nombre non négligeable de spz pour pouvoir effectuer les tests de détection virale exclut une partie de la population infertile candidate à l'AMP d'indication masculine et n'ayant pas la possibilité que la détection virale dans leur sperme soit effectuée, comme l'impose cet arrêté. Ainsi la question se pose, virus par virus, de la nécessité de congeler les spermés issus d'hommes infectés en fonction des connaissances actuelles. Concernant le VIH, la possibilité largement démontrée de présence d'acides nucléiques du VIH dans les fractions de spz utilisés pour la tentative d'AMP semble donner raison à l'arrêté et rend légitime que les tests de détection du VIH y soient effectués, donc que le sperme soit congelé jusqu'à obtention des résultats. Concernant le VHB, l'arrêté du 10 mai 2001 ne demande pas à ce que l'ADN soit testé et n'impose donc pas de congélation des spermés VHB+. Là encore, même si cette recherche enrichirait l'état des connaissances sur les interactions du sperme avec le VHB, l'existence d'un vaccin efficace protégeant le personnel et la partenaire d'une contamination donne raison à l'arrêté. Par contre, les données disponibles dans la littérature démontrent qu'il n'y a plus d'acides nucléiques du VHC après traitement des spermés VHC+ par les techniques de routine utilisées en AMP. Par ailleurs, ces études démontrent que la CV séminale des spermés VHC+ est toujours très basse, voire en dessous du seuil de quantification, ce qui est en accord avec un risque de contamination par voie sexuelle connu comme très faible. Ce dernier résultat corrobore l'attitude des hépatologues, qui, dans ce contexte, conseillent depuis longtemps à ces couples d'avoir des rapports sexuels non protégés. Il semble donc clair aux professionnels de l'AMP que l'état des

connaissances actuelles démontre que la congélation des spermatozoïdes VHC+, imposée par l'arrêté du 10 mai 2001, n'est pas nécessaire et ne devrait plus être retenue. Le débat est en cours.

Certains risques théoriques, tels que le risque de contamination entre les couples dont le membre infecté est soit l'homme soit la femme, ne sont pas définis par l'arrêté du 10 mai 2001 et méritent des procédures particulières. Enfin, l'arrêté du 10 mai 2001 sépare les activités à risque viral identifié, ce qui impose que la tentative d'AMP d'un couple infecté par un virus donné doit être séparée de la tentative d'AMP d'un couple infecté par un autre virus, rendant impossible une telle organisation. Pour ne pas alourdir les procédures de prise en charge de ces couples, il semble probable que les centres d'AMP devront choisir, après concertation, de ne prendre en charge qu'une activité d'AMP à risque viral identifié, au mieux à la fois de leur propre expérience et de la distribution géographique des centres ayant cette activité, donnant ainsi toutes les conditions d'une activité médicale devant à terme être soumise à agrément ministériel.

Enfin, rien n'est dit dans l'arrêté du 10 mai 2001 concernant la poly-contamination virale d'un couple inclus en AMP. Comment organiser le laboratoire d'AMP pour prendre en charge un couple dont par exemple le membre infecté est à la fois VHC+ et VIH+, situation très fréquente liée à une origine de contamination par toxicomanie intraveineuse ?

**Bibliographie**

1. Anderson DJ, O'Brien T, Politch JA, Martinez A, Padian N, Horsburgh R, Mayer KH. Effect of disease stage and zidovudine therapy on the detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen. *JAMA* 1992; 267: 2769-2774.
2. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Elia C, Piomboni P, Renieri T, Sensini C, Zaccarelli M. HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1991; 23: 339-345.
3. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Ceccarini EC, Crisa N, Di Caro A, Estenoz M, Garbuglia AR, Massacesi A, Piomboni P, Renieri T, Solazzo D. HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into oocyte. *J Cell Biol* 1994; 127: 903-914.
4. Baccetti B, Benedetto A, Collodel G, di Caro A, Garbuglia AR, Piomboni P. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 41-67.
5. Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, Oakes JW, Saah A, Pomerantz RJ. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1 infected men. *AIDS* 1994; 12: 1669-1674.
6. Brechard N, Galea P, Silvy F, Amram M, Chermann JC. Study of HIV localization in semen. *Contracept Fertil Sex* 1997a; 25: 389-391.
7. Brechard N, Galea P, Silvy F, Amram M, Chermann JC. HIV virus detection in ejaculates collected at different times in seropositive patients. *Contracept Fertil Sex* 1997b; 25: 725-29.
8. Borzy MS, Connell RS, Kiessling AA. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988; 1: 419-424.
9. Botta-Fridlund D. Risk of hepatitis virus B and C transmission during medically assisted reproduction *Contracept Fertil Sex* 1994; 22: 298-301
10. Brogi A, Prsentini R, Pimboni P, Collodel G, Strazza M, Solazzo D, Costantino-Ceccarini E. Human sperm and spermatogonia express a galactoglycerolipid which interacts with gp120. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1995; 11: 565-571.
11. Caldwell SH, Sue M, Bowden JH, Dickson RC, Driscoll CJ, Yeaton P, Stevenson WC, Ishitani MB, McCullough CS, Pruett TL, Lovell MA. Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. *Liver Transplant Surg* 1996; 2: 124-129.
12. Cassuto NG, Sifer C, Feldmann G, Bouret D, Moret D, Benifla JL, Porcher R, Naouri M, Neuraz A, Alvarez S, Poncelet C, Madelenat P, Devaux A. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod* (accepté pour publication)
13. Centers for Disease Control. HIV-1 infection and artificial insemination with processed semen. *Morb Mortal Wkly Rep* 1990; 39: 249-256.
14. Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA, Kazembe P, Dyer JR, Daly CC, Zimba D, Vernazza PL, Maida M, Fiscus SA, Eron JJ. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *AIDSCAP Malawi Research Group. Lancet* 1997; 349: 1868-73.
15. Coombs RW, Speck CE, Huges JP, Lee W, Sampoleo R, Ross SO, Dragavon J, Peterson G, Hooton TM, Collier AC, Corey L, Koutsky L, Krieger JN. Associated between culturable immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and bloods: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *J Infect Dis* 1998; 177: 320-330.
16. Crittenden JA, Handelsman DJ, Stewart GJ. Semen analysis in human immunodeficiency virus infection. *Fertil Steril* 1992; 57: 1294-1299.
17. Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol* 1987; 4: 37-44
18. Debono E, Halfon P, Bourliere M, Gerolami-Santandrea V, Gastaldi M, Castellani P, Cartouzou G, Botta-Fridlund D, Cau P, Gauthier A.



- Absence of hepatitis C genome in semen of infected men by polymerase chain reaction, branched DNA and in situ hybridization. *Liver* 2000; 20: 257-261.
19. Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 Suppl 1: 66-70.
  20. Dondero F, Rossi T, D'Offizi G, Mazzilli F, Rosso R, Sarandrea N, Pinter E, Aiuti F. Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. *Hum Reprod* 1996; 4: 765-768.
  21. Donnelly ET, Steele E.K, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191-1199.
  22. Dubois F, Desenclos JC, Mariotte N, Goudeau A. Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatology* 1997; 25: 1490-1496.
  23. Dulioust E, Tachet A, De Almeida M, Finkelsztein L, Rivalland S, Salmon D, Sicard D, Rouzioux C, Jouannet P. Detection of HIV-1 in seminal plasma and seminal cells of HIV-1 seropositive men. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 27-40.
  24. Dulioust E, Du AL, Costagliola D, Guibert J, Kunstmann JM, Heard I, Juillard JC, Salmon D, Leruez-Ville M, Mandelbrot L, Rouzioux C, Sicard D, Zorn JR, Jouannet P, De Almeida M. Semen alterations in HIV-1 infected men. *Hum Reprod* 2002; 17: 2112-2118
  25. Dussaix E, Guetard D, Dauguet C, De Almeida M, Auger J, Ellrodt A, Montagnier L, Aurox M. Spermatozoa as potential carriers of HIV. *Res Virol* 1993; 144: 487-495.
  26. Eron JJ, Vernazza PL, Johnston DM, Seillier-Moisewitsch F, Alcorn TM, Fiscus SA, Cohen MS. Resistance of HIV-1 to antiretroviral agents in blood and seminal plasma: implications for transmission. *AIDS* 1998; 15: F181-9.
  27. Fried MW, Shindo M, Fong T, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie, A.M. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992; 102: 1306-1308.
  28. Gadella BM, Colanbrander B, Van Golde LMG, Lopez-Cardozo M. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. *Biol Reprod* 1993; 48: 483-489.
  29. Gil T, Castilla JA, Hortas ML, Molina J, Redondo M, Samaniego F, Garrido F, Vergara F, Herruzo A. CD4+ cells in human ejaculates. *Hum Reprod* 1995; 11: 2923-2927.
  30. Gobert B, Amiel C, Tang JQ, Barbarino P, Bene MC, Faure G. CD4-like molecules in human sperm. *FEBS Lett* 1990; 261: 339-342.
  31. Gresenquet G, Belec L, Herve VM, Massanga M, Martin PM. Quantitative and qualitative anomalies of sperm in African individuals infected with HIV. *Bull Soc Pathol Exot* 1992; 85: 205-207.
  32. Guibert J, Merlet F, Le Du A, Leruez M, Heard I, Costagliola D, Mandelbrot L, Kunstmann JM, De Almeida M, Salmon D, Sicard D, Zorn JR, Rouzioux C, Jouannet P. ICSI for HIV-1 serodifferent couples: results of a preliminary study. ESHRE 17th annual meeting Vienna 2001; O-140: 56-57.
  33. Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, Molinie C, Villa E, Degos F, Brechot C. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line. *J Med Virol* 1985; 16: 61-66.
  34. Kim LU, Johnson MR, Barton S, Nelson MR, Sontag G, Smith JR, Gotch FM, Gilmour JW. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. *AIDS* 1999; 13: 645-51.
  35. Krieger JN, Coombs RW, Collier AC, Ho DH, Ross SO, Zeh JE, Corey L. Intermittent shedding of human immunodeficiency virus in semen: implications for sexual transmission. *J Urol* 1995; 154: 1035-40.
  36. Hsu HH, Wright TL, Luba D, Martin M, Feinstein SM, Garcia G, Greenberg HB. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology* 1991; 14: 763-767.
  37. Leruez-Ville M, Kunstmann JM., De Almeida M, Rouzioux C, Chaix ML. Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* 2000; 356: 42-43.
  38. Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J, Guerin JF. Transmission risk of hepatitis C virus in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1083-1085.

## AMP EN CAS DE VIH, HÉPATITE C OU HÉPATITE B POSITIFS

39. Liou T, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid and ascites. *J Med Virol* 1992; 37: 197-202.
40. Liu FH, Tian GS, Fu XX. Detection of plus and minus strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and sperm. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1994; 74: 284-286.
41. Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Valenza A, Cataldo PT, Piazza M. Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS* 1996; 10: 51-56.
42. Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Noce S, Piazza M. Differences in the genotypic resistance pattern of HIV between semen and plasma samples from HIV-infected subjects and evidence for viral compartmentalization. *Drug Therapy in HIV infection (AIDS)* 1998; P232.
43. McKee TA, Avery S, Majid A, Brinsden PR. Risks for transmission of hepatitis C virus during artificial insemination. *Fertil Steril* 1996; 66: 161-163.
44. Mandelbrot L, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Benifla JL, Delfraissy JF, Blanche S, Mayaux MJ. Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *JAMA* 1998; 280: 55-60.
45. Marina S, Marina F, Alcolea R, Exposito R, Huguet J, Nadal J, Verges A. Human immunodeficiency virus type 1-serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1998a; 70: 35-39.
46. Marina S, Marina F, Alcolea R, Nadal J, Exposito R, Huguet J. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod* 1998b; 13: 3247-3249.
47. Marina S, Marina F, Exposito R, Alcolea R, Nadal J, Verges A. Results from artificial insemination and in-vitro fertilization in HIV-serodiscordant couples. *ESHRE 15th annual meeting Tours 1999*; P-083: 182.
48. Mermin JH, Holodny M, Katzenstein DA, Merigan DC. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 164: 769-772.
49. Michielsens PP, Van Damme P. Viral hepatitis and pregnancy. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 21-29.
50. Muciaccia B, Filippini A, Ziparo E, Colelli F, Baroni CD, Stefanini M. Testicular germ cells of HIV-1 seropositive asymptomatic men are infected by the virus. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 81-93.
51. Muller CH, Coombs RW, Krieger JN. Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men. *Andrologia* 1998; 30: 15-22.
52. Nuovo GJ, Becker J, Sinsir A, Margiotta M, Khalife G, Shevchuk M. HIV nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994; 144: 1142-1148.
53. Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, Massip P, Puel J, Bujan L, Izopet J. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS* 2000; 14: 2093-2099.
54. Politch JA, Mayer KH, Abbott AF, Anderson DJ. The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. *Fertil Steril* 1994; 61: 922-928.
55. Pudney J, Nguyen H, Xu C, Anderson DJ. Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 301-306.
56. Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997; 176: 960-968.
57. Scofield VL, Rao B, Broder S, Kennedy C, Wallace M, Graham B, Poiesz BJ. HIV interaction with sperm. *AIDS* 1994; 8: 1733-1736.
58. Scofield VL. Sperm as infection-potentiating cofactors in HIV transmission. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 359-372.
59. Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, Albani E, Oneta M, Pardi G. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 1992; 340: 1317-1319.

60. Semprini AE, Persico T, Thiers V, Oneta M, Tuveri R, Serafini P, Boschini A, Giuntelli S, Pardi G, Brechot C. Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men. *J Infect Dis* 1998a; 177: 848-854.
61. Semprini AE, Fiore S, Oneta M, Castagna C, Savasi V, Giuntelli S, Persico T. Assisted reproduction in HIV-discordant couples. ESHRE 14th annual meeting Goteborg 1998b; O-176: 89.
62. Semprini AE. Prise en charge en AMP intraconjugale. Symposium francophone " Le désir d'enfant et le suivi de la grossesse chez les couples VIH sérodifférents ". Sydney 1999.
63. Sifer C, Benifla JL, Branger M, Devaux A, Brun-Vezinet F, Madelenat P, Feldmann G. Effect of hepatitis C virus on the apoptosis percentage of granulosa cells in vivo in women undergoing IVF: preliminary results. *Hum Reprod* 2002; 17: 1773-1776.
64. Stewart GJ, Tyler JPP, Cunningham AL, Barr JA, Driscoll GL, Gold J, Lamont BJ. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) by artificial insemination by donor. *Lancet* 1985; 14: 581-585.
65. Tachet A, Dulioust E, Salmon D, De Almeida M, Rivalland S, Finkielstejn L, Heard I, Jouannet P, Sicard D, Rouzioux C. Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS* 1999; 13: 823-31.
66. Tang Z, Yang D, Hao L, Tang Z, Huang Y, Wang S. Detection and significance of HCV RNA in saliva, seminal fluid and vaginal discharge in patients with hepatitis C. *J Tongji Med Univ* 1996; 16: 11-13.
67. Taylor S, Back DJ, Workman J, Halifax K, Choudhury B, Dedicoat M, Drake SM, White DJ, Beards G, Cane P, Pillay D. Poor penetration of protease inhibitors into semen may impair antiviral activity. *Drug Therapy in HIV infection (AIDS)* 1998; P38.
68. Terada S, Kawanishi K, Katayama K. Minimal hepatitis C infectivity in semen. *Ann Intern Med* 1992; 117: 171-172.
69. Tur R, Veiga A, Busquets A, Coll O, Colleu B, Vinas LI, Barri PN. Artificial insemination with processed sperm samples from serodiscordant couples for HIV-1. ESHRE 15th annual meeting Tours 1999; P-133: 208.
70. Valley RM, Sharrard PJ, Rees RC. The identification of factors in seminal plasma responsible for suppression of natural killer cell activity. *Immunology* 1988; 63: 451-456.
71. Vernazza PL, Eron JJ, Fiscus SA. Sensitive method for the detection of infectious HIV in semen of seropositive individuals. *J Virol Methods* 1996; 56: 33-40.
72. Vernazza PL, Gilliam BL, Dyer J, Fiscus SA, Eron JJ, Franck AC, Cohen MS. Quantification of HIV in semen: correlation with antiviral treatment and immune status. *AIDS* 1997a; 11: 987-993.
73. Vernazza PL, Gilliam BL, Flepp M, Dyer J, Franck AC, Fiscus SA, Cohen MS, Eron JJ. Effect of antiviral treatment on the shedding of HIV-1 in semen. *AIDS* 1997b; 11: 1249-1254.
74. Vernazza PL, Troiani L, Flepp M, Cone R, Shock J, Roth F, Boggian K, Cohen MS, Fiscus SA, Eron JJ. Potent antiretroviral treatment (ART) results in marked suppression of seminal HIV-RNA and -DNA shedding. *Drug Therapy in HIV infection (AIDS)* 1998; OP6-3.
75. Xu C, Politch JA, Tucker L, Mayer KH, Seage JR III, Anderson D. factors associated with increased levels of human immunodeficiency virus type 1 DNA in semen. *J Infect Dis* 1997; 176: 941-947.
76. Zagury D, Bernard J, Leibowitch J, Groopman JE, Feldman M, Gallo RC. HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* 1984; 226: 449-451.
77. Zanetti AR, Tanzi E, Romano L, Zuin G, Minola E, Vecchi L, Principi N. A prospective study on mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Intervirology* 1998; 41: 208-212.
78. Zhang H, Dornadula G, Beumont M, Livornese L, Van Uitert B, Henning K, Pomerantz RJ. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998; 339: 1803-1809.