

# Pourquoi, quand et comment utiliser le sperme frais d'un homme séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine ?

## Why, when and how to use fresh semen of HIV men?

Xavier Ferraretto<sup>1,2</sup>  
Anne-Sophie Gille<sup>3,4</sup>  
Lucile Ferreux<sup>3</sup>  
Emmanuel Dulioust<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup> AP-HP, Service d'histologie embryologie biologie de la reproduction, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

<sup>2</sup> Université Paris-Diderot, Paris, France <xavier.ferraretto@aphp.fr>

<sup>3</sup> AP-HP, service d'histologie embryologie biologie de la reproduction, CHU Cochin, site Port-Royal, Paris, France

<sup>4</sup> Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, faculté de médecine, Paris, France

<sup>5</sup> Inserm, unité de recherche U1016, Institut Cochin, Paris, France

**Résumé.** Plusieurs éléments justifient aujourd'hui la simplification des procédures d'assistance médicale à la procréation (AMP) concernant la prise en charge d'un patient séropositif pour le VIH : l'efficacité confirmée des thérapies antirétrovirales hautement actives sur la transmission sexuelle du virus et sa présence dans le sperme, d'une part, et, d'autre part, la sécurité des techniques de sélection spermatique adaptées au contexte viral, démontrée depuis plusieurs années par des tests de détection très sensibles. Depuis juin 2017, il est légalement possible en France d'utiliser le sperme frais des hommes séropositifs pour le VIH en AMP, après préparation sur un gradient de densité, et en circuit à risque viral, après s'être assuré du contrôle optimal de la réplication virale chez le patient et en l'absence d'infection urogénitale et/ou de leucospermie. Le diagnostic d'infection urogénitale repose sur un interrogatoire minutieux accompagné d'un examen clinique, sans se résumer à une simple analyse bactériologique (spermoculture et premier jet d'urine). En ce qui concerne la leucospermie, et plus généralement les marqueurs de l'inflammation, l'objectif est de dépister une situation inflammatoire à risque d'excrétion accrue de particules virales ou de cellules infectées dans le sperme. En cas de résultats douteux non étayés par des éléments cliniques, il faut garder présent à l'esprit que la combinaison d'un traitement efficace et de procédures rigoureuses de préparation des spermatozoïdes confère par elle-même une très haute sécurité. En revanche, en cas de forte suspicion d'état infectieux et/ou inflammatoire persistant, il paraît plus raisonnable de valider l'utilisation des spermatozoïdes avant AMP par une évaluation de la charge virale dans le plasma séminal, ce qui implique une congélation des spermatozoïdes sélectionnés.

**Mots clés :** sperme, VIH, assistance médicale à la procréation (AMP)

**Abstract.** Several factors now justify the simplification of ART procedures for the management of an HIV-positive patient: the confirmed efficacy of highly active antiretroviral therapies on the sexual transmission of the virus and its presence in semen on the one hand and, on the other hand, the safety of the sperm selection techniques adapted for the viral context and tested over several years by highly sensitive detection tests. Since June 2017, it is legally possible in France to use the fresh semen of HIV-positive men in ART, using sperm preparation by a density gradient method, and in a viral risk circuit, provided that an optimal control of viral replication is achieved by the antiretroviral therapy. In addition, the absence of urogenital infection and/or leukospermia needs to be assessed. The diagnosis of urogenital infection is based on careful anamnesis and clinical examination, and not only on bacteriological analysis (spermoculture and first urine sample). With regard to leukospermia, and more generally inflammation markers, the objective is to detect an inflammatory situation at risk of increased HIV seminal shedding. In the case of uncertain results not supported by clinical evidence, it should be borne in mind that the combination of effective treatment and rigorous procedures for the preparation of spermatozoa, provides a very high security. On the other hand, if there is a strong suspicion of a persistent infectious and/or inflammatory state, it seems more reasonable to validate the use of spermatozoa before any ART by a quantification of viral load in the seminal plasma, which implies freezing the selected spermatozoa.

**Key words:** semen, HIV, ART

Médecine  
de la **Reproduction**

Tirés à part : X. Ferraretto

Quand utiliser le sperme frais d'un homme séropositif pour le VIH ? Cette question aurait, jusqu'à ces dernières années, appelé une réponse lapidaire : jamais. Depuis quand se pose-t-elle concrètement, pour

quelles raisons ? Quelles avancées dans la connaissance de l'infection à VIH, sa transmission et sa prise en charge ont-elles permis d'en faire une question d'actualité ? Dans ce chapitre, nous retracerons les étapes

d'une problématique apparue peu de temps après l'apparition de l'épidémie à VIH, avec la mise en évidence de sa transmission sexuelle et le rôle majeur du sperme dans cette transmission, pour aboutir à l'exposé des recommandations actuelles et des éléments sur lesquels elles s'appuient.

### **Pourquoi peut-on utiliser le sperme frais d'un homme séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine ?**

#### *Situation de l'épidémie de virus de l'immunodéficience humaine dans les années 1980 et 1990*

Des années 1980, qui ont vu la mise en évidence de la transmission sexuelle du VIH et le rôle majeur de sa présence dans le sperme, à la fin des années 1990, les seules possibilités offertes aux couples qui souhaitaient avoir des enfants et dont seul l'homme était atteint par le VIH, étaient le recours au don de spermatozoïdes et l'adoption. En réalité, dans un contexte où l'espérance de vie de ces patients était très courte (évaluée à seulement dix mois en 1987), ces deux possibilités étaient elles-mêmes très peu accessibles. La pratique de rapports sexuels non protégés par préservatif, et par conséquent toute tentative de procréation naturelle, étaient formellement déconseillées en raison du risque élevé de transmission du virus à la femme (8 % par rapport sexuel) et, si elle était contaminée, du risque élevé de transmission à l'enfant (25-50 %) [1].

Dans ce contexte, certains couples, notamment ceux où l'homme porteur du VIH était néanmoins bien portant, sollicitaient, dès la fin des années 1980, l'utilisation des techniques d'extraction et de lavage des spermatozoïdes développées dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation (AMP). Cependant, l'absence de technique de détection du virus suffisamment sensible, et donc le manque de connaissances précises sur les modalités de la présence du VIH dans le sperme, ainsi que les doutes sur sa possible liaison ou incorporation aux spermatozoïdes [2, 3], s'opposaient fortement à une application des procédés de l'AMP en vue de permettre à ces couples une procréation intraconjugale, particulièrement en France après la découverte de la contamination liée au sang et ses dérivés dans les années 1980. Confrontés à cet obstacle, certains couples décidaient tout de même de concevoir naturellement. Ceci les poussait parfois à avoir recours aux rapports sexuels non protégés dans un contexte où les thérapies antirétrovirales n'étaient pas aussi développées ni efficaces qu'aujourd'hui.

#### *Avancées thérapeutiques et techniques*

Après la zidovudine, premier inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI) en 1990 [4], quatre autres INTI ont fait leur apparition entre 1992 et 1994 :

le didasonide et la zalcitabine en 1992, la stavudine en 1993 et la lamivudine en 1994. Ce n'est que pendant l'été 1996 que les inhibiteurs de protéase (IP) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) sont introduits [5], marquant l'arrivée des thérapeutiques antirétrovirales combinées hautement actives (cARV). L'efficacité de ces traitements sur la charge virale sanguine et le taux de lymphocytes CD4 a été rapidement mise en évidence [6]. Leur utilisation à grande échelle a considérablement amélioré la qualité de vie des patients atteints par le VIH, en permettant une nette augmentation de l'espérance de vie, une diminution importante du risque de maladies opportunistes [5] et de transmission verticale [7]. Ces avancées ont permis aux patients infectés par le VIH de reconsidérer leur désir d'enfant, et à la communauté scientifique d'accepter de les prendre en charge en AMP, le recours au préservatif étant encore hautement recommandé à cette époque [8, 9].

Parallèlement au développement des traitements antirétroviraux, des biologistes (virologues et biologistes de la reproduction) travaillaient sur la mise au point de méthodes de détection du VIH et sur l'optimisation des méthodes de lavages du sperme dans l'élimination du VIH, en prenant des précautions virobactériologiques assurant une sécurité technique renforcée. C'est à la fin des années 1980 qu'une équipe italienne met en place un protocole de lavage des spermatozoïdes pour les patients atteints par le VIH-1, afin de prendre en charge ces couples en insémination intra-utérine (IIU). Après recueil, les spermatozoïdes des patients infectés par le VIH-1 étaient sélectionnés par centrifugation sur un gradient de densité pendant 30 min, puis lavés pendant 10 min. La fraction de spermatozoïdes mobiles était ensuite récupérée après 60 min de *swim-up* ou migration ascendante avant d'être inséminée chez la conjointe. La présence de cellules infectées par le VIH-1 dans la fraction de spermatozoïdes mobiles était évaluée de façon rétrospective, après étalement puis fixation sur lame, par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-p17. La totalité des échantillons testés par immunofluorescence, afin d'évaluer la présence de VIH-1 dans la fraction de spermatozoïdes inséminés, s'est révélée négative. Aucune patiente n'a présenté de séroconversion, ni aucun des dix enfants nés suite à ces procédures d'AMP [10]. En 1997, Marina *et al.* améliorent la technique de détection du VIH dans la fraction de spermatozoïdes avant IIU en utilisant une technique de PCR modifiée permettant la détection d'ARN VIH-1 et d'ADN proviral dans les cellules. Les seuils de détection étaient de 200 copies/mL pour l'ARN VIH et de dix cellules infectées pour l'ADN proviral. Parmi les 107 recueils de sperme étudiés, obtenus à partir de soixante-trois patients séropositifs, 101 étaient indétectables (94,4 %). L'insémination n'a pas eu lieu pour les six recueils positifs. Suite aux 101 cycles d'IIU, aucun cas

de séroconversion chez la partenaire n'a été décrit six mois après la tentative [11].

En France, le recours à l'AMP pour ces patients est initié plus tardivement, le corps médical et l'opinion publique, marqués par l'affaire du sang contaminé, étant réticents à ces pratiques. Deux protocoles de recherche sous l'égide de l'Agence nationale de recherche sur le sida (ANRS) sont donc lancés en 1999. Le protocole NECO (ANRS 092), mené par une équipe parisienne (Pr Jouannet), a expérimenté la faisabilité et les résultats de l'AMP chez ces couples en utilisant exclusivement l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) [12], et l'ANRS 096 dirigée par une équipe de Toulouse (Pr Bujan) travaille sur la prise en charge de ces couples exclusivement en IIU [13]. Ces deux études ont montré la faisabilité de méthodes spécifiques d'AMP pour réduire au maximum le risque de contamination de la partenaire séronégative avec une absence de transmission verticale et horizontale. Ainsi, en 2001, à la vue des résultats préliminaires de ces deux protocoles, et sous la pression des associations de patients, le ministère de la Santé publie l'arrêté 2001 qui fera office de référence pour la prise en charge des couples « à risque viral » en AMP. Dans la continuité des travaux précédents, Pasquier *et al.* publient, en 2006, un protocole standardisé à partir d'un kit commercial modifié qui permet d'automatiser l'extraction, l'amplification et la détection de génome VIH-1 dans les échantillons de plasma séminal. Il établit un seuil de détection de l'ARN VIH-1 à 200 copies/mL dans le plasma séminal avec une sensibilité de 100 % (21/21) et une spécificité de 100 % (18/18). Pour la détection de génome dans les cellules séminales, il fixe un seuil de détection à 200 copies/ $3 \times 10^6$  cellules avec une sensibilité et une spécificité de 100 % également [14]. Une mise à jour de ce protocole a été publiée en 2009 [15].

C'est donc l'action combinée de l'apparition des cARV, qui améliore de façon drastique le pronostic des patients atteints par le VIH, et de la mise au point de techniques efficaces de préparation de spermatozoïdes et de détection du virus dans le sperme, qui est à la base de la révision des règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'AMP concernant les modalités de prise en charge de couples sérodiscordants pour le VIH.

### **Efficacité des thérapeutiques antirétrovirales combinées hautement actives, évolution des pratiques et des mentalités**

À partir de la fin des années 1990, avec la généralisation des cARV, plusieurs études se sont intéressées au potentiel infectieux des rapports sexuels non protégés avec des hommes infectés par le VIH-1 traités par cARV. Quin *et al.* ont déterminé le taux de transmission du VIH-1

pour 228 couples dont l'homme était infecté par le VIH-1 en fonction de la charge virale VIH-1 dans le sang. Ce taux était nul lorsque la charge virale était inférieure à 400 copies/mL [16] – valeur ordinairement atteinte par les patients sous cARV [6]. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études qui mettent en évidence un taux de transmission nul chez des couples dont l'homme est traité par cARV efficace ayant des rapports non ciblés sur l'ovulation. Cependant, ces premières études portaient sur des effectifs réduits [17, 18].

Au-delà de l'efficacité des cARV sur la charge virale plasmatique sanguine et la transmission sexuelle du virus, leur impact sur la charge virale dans le plasma séminal a fait l'objet d'études durant la même période. Ces travaux ont démontré une efficacité certaine des traitements antirétroviraux sur la présence du virus dans le plasma séminal ; le virus devient néanmoins indétectable plus lentement que dans le sang, et reste en outre détectable chez un nombre restreint de patients (4,5 %) [19, 20].

Au vu de la littérature alors disponible, la Commission fédérale suisse pour les problèmes liés au sida (CFS) publiait, en janvier 2008, un rapport dans lequel elle affirmait qu'une personne séropositive ne souffrant d'aucune autre infection sexuellement transmissible (IST) et suivant un traitement antirétroviral entraînant une virémie indétectable, ne transmet pas le VIH par voie sexuelle. Cette affirmation reste valable à condition que :

- la personne séropositive applique le traitement antirétroviral à la lettre et soit suivie par un médecin traitant,
- la charge virale se situe en dessous du seuil de détection depuis au moins six mois (autrement dit : la virémie doit être supprimée depuis au moins six mois),
- la personne séropositive ne soit atteinte d'aucune autre IST [21].

### **Vers une procréation naturelle autorisée**

La publication de Vernazza *et al.* impressionne la communauté scientifique [21] et plusieurs équipes s'intéressent alors au risque de transmission du VIH-1 aux partenaires de patients sous cARV. En août 2011, Cohen *et al.* publient une étude prospective qui inclut 1 763 couples sérodiscordants pour le VIH-1 séparés en deux groupes de traitement : le premier recevait un cARV immédiatement après l'inclusion, le second seulement en cas de diminution du taux de lymphocytes CD4. Une seule séroconversion a été mise en évidence dans le groupe ayant reçu un traitement immédiat, et celle-ci est survenue après moins de trois mois de cARV [22]. Le risque de transmission du VIH-1 à la partenaire d'un patient traité par cARV et avec une charge virale indétectable dans le sang est donc, théoriquement, nul. Cette notion sera confirmée par plusieurs études, plus récentes, ne mettant en évidence aucune séroconversion lorsque le

partenaire séropositif est traité par cARV et possède une charge virale VIH-1 indétectable dans le sang [23, 24]. Plusieurs équipes se sont ainsi intéressées à la détection de l'ARN VIH-1 dans le plasma séminal chez des patients sous cARV et ayant une charge virale indétectable dans le sang depuis plus de six mois [25-31]. Bien que la fréquence des charges virales VIH-1 positives dans le plasma séminal soit variable d'une étude à l'autre (de 31 % chez Sheth *et al.* [26] à 3,7 % pour Dulioust *et al.*, 2011 [27]), toutes les fractions finales de spermatozoïdes analysées étaient négatives pour le VIH-1, quelle que soit la charge virale VIH-1 initiale dans le plasma séminal.

Au vu de ces différentes études, l'Agence France Recherche Nord & Sud sida-HIV hépatites (ANRS) et le Conseil national du sida (CNS) publient, en septembre 2013, dans le cadre du rapport Morlat, de nouvelles recommandations pour la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. La possibilité d'avoir recours à la procréation naturelle pour les couples sérodifférents pour le VIH apparaît pour la première fois en France. Le désir de conception naturelle au sein des couples sérodifférents est pris en considération, sous réserve d'un contrôle virologique par le traitement chez la personne séropositive. « *La procréation naturelle est désormais considérée comme une alternative à l'AMP* » [32, 33]. Dans ce contexte, les couples sérodifférents pris en charge en AMP sont soit réticents au fait d'avoir recours aux rapports sexuels non protégés, soit infertiles, un bilan de fertilité masculin et féminin devant être proposé rapidement au couple pour éviter des rapports sexuels non protégés inefficaces.

### **Vers la modification du guide des bonnes pratiques en assistance médicale à la procréation**

Avant le 30 juin 2017, les dernières recommandations en vigueur dataient du 11 septembre 2010 (arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'AMP). Elles imposaient :

- la préparation du sperme (prélèvement simple ou cumulé) en vue de l'AMP, en utilisant au minimum un gradient de densité afin d'isoler le plasma séminal et une fraction finale de spermatozoïdes,
- une évaluation de la charge virale VIH dans le plasma séminal, un arbre décisionnel permettant de valider ou non l'utilisation de la fraction finale de spermatozoïdes isolés pour une AMP.

L'autorisation de procréation naturelle mentionnée dans le rapport Morlat de 2013 a pour conséquence une modification tardive des recommandations de septembre 2011 dans l'arrêté du 30 juin 2017 qui autorise l'utilisation du sperme frais des patient VIH en AMP sous certaines conditions.

## **Quand et comment utiliser le sperme frais d'un homme séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine ?**

Depuis juillet 2017, sous réserve d'une maîtrise constante de la réplication virale, objectivée par au minimum deux charges virales plasmatiques indétectables espacées de trois mois dans les six mois précédant la tentative d'AMP, il est possible d'utiliser, sans crainte de contamination de la conjointe, des embryons et du personnel au laboratoire, les spermatozoïdes d'un patient séropositif pour le VIH sans validation préalable de ces spermatozoïdes par une recherche d'ARN VIH négative.

Les spermatozoïdes peuvent donc provenir d'un éjaculat recueilli le jour même, mais nécessitent une préparation selon les règles définies pour les patients à risque viral, qui comprend toujours « *au minimum un gradient de densité, afin d'isoler une fraction finale de spermatozoïdes en vue de l'AMP* ». Néanmoins, la fraction finale de spermatozoïdes peut être utilisée sans étape de congélation préalable.

Ces mêmes recommandations imposent toutefois la validation de la préparation spermatique par quantification de la charge virale dans le plasma séminal, voire dans la fraction finale lorsque le patient ne prend pas de traitement antirétroviral, ou en cas d'infection urogénitale et/ou de leucospermie significative. Dans ces situations, à risque d'excrétion accrue de particules virales ou de cellules infectées dans le sperme, une congélation de la fraction finale de spermatozoïdes sélectionnés est nécessaire. La fraction finale de spermatozoïdes est congelée dans une cuve dédiée au risque viral dans l'attente des résultats de la recherche dans le liquide séminal. L'arbre décisionnel à suivre est le même que celui qui s'appliquait pour toute utilisation du sperme d'un homme séropositif pour le VIH jusqu'alors. Si le nombre de copies d'ARN VIH dans le plasma séminal est :

- supérieur à 5 log par millilitre, les paillettes préparées à partir de l'échantillon ne pourront pas être utilisées en AMP dans l'état actuel de connaissances,
- positif mais inférieur à 5 log par millilitre, une recherche de l'ARN VIH est réalisée dans la fraction finale de spermatozoïdes isolés, cette recherche doit être négative pour que des paillettes puissent être utilisées pour une AMP.

Nous précisons dans les paragraphes suivants les conditions spécifiques pour lesquelles l'utilisation du sperme frais des patients VIH en AMP est discutée voire contre-indiquée.

### **Obstacles à l'utilisation du sperme frais d'un homme séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine : l'infection urogénitale et/ou la leucospermie significative**

Dans les années 1990, des études épidémiologiques au sein de certaines populations à forte prévalence d'IST

ont conduit à mettre en évidence le rôle facilitateur des infections génitales dans la transmission sexuelle du VIH [34]. Il a été montré par la suite que la présence de virus et de bactéries dans le tractus génital modifie, d'une part, la susceptibilité à l'infection au VIH d'un potentiel hôte (via la réaction inflammatoire ou d'éventuelles lésions ulcéreuses) et, d'autre part, accroît le potentiel infectieux des sécrétions génitales. Les infections, qu'elles soient occasionnées par des micro-organismes à l'origine d'IST (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*) ou provoquées par des uropathogènes qui proviennent essentiellement du tube digestif (entérobactéries telles qu'*Escherichia coli*), induisent des modifications locales susceptibles d'accroître la réplication du VIH dans le tractus génital d'un sujet porteur [35, 36].

La présence du VIH dans le sperme résulte à la fois de la diffusion passive de particules virales à partir du sang, de l'amplification clonale de souches virales sanguines au sein de leucocytes infectés qui infiltrent le tractus génital, mais aussi de la réplication locale de particules virales dans des cellules résidentes du tractus génital mâle [37]. Ces cellules peuvent être des macrophages et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par le VIH, sous la forme d'ADN proviral, localisées dans le tissu interstitiel du testicule, dans le stroma de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate et de l'urètre. L'activation de ces cellules lors d'une infection (mais aussi lors de toute inflammation génitale) peut entraîner une augmentation de la quantité d'ARN VIH dans le sperme. En outre, ces cellules peuvent passer dans la lumière du tractus génital, constituant un contingent parfois important des cellules non spermatiques observées dans le sperme et participant à l'augmentation de la charge virale séminale par la production de particules virales [38, 39].

### L'infection urogénitale

En pratique, dans la perspective d'une tentative d'AMP, poser le diagnostic d'une infection urogénitale est compliqué par l'existence d'une certaine confusion avec le constat d'une bactériospermie. Certaines présentations sont évidentes, comme des symptômes urogénitaux à type de brûlures urinaires, de dysurie, d'écoulement urétral, de douleurs répétées à l'éjaculation ou encore d'hématurie ou d'hémospermie macroscopique faisant clairement suspecter une infection génitale masculine, d'autant plus si une fièvre est associée à l'un de ces symptômes. Ces signes cliniques doivent susciter la recherche approfondie d'une infection bactérienne au moyen de toutes les analyses disponibles : spermoculture avec bactériologie standard et recherche de mycoplasmes urogénitaux, recherche des germes intracellulaires comme *C. trachomatis*, préférentiellement dans les urines par PCR du premier jet urinaire en raison de la présence fréquente d'inhibiteurs dans le sperme, examen cyto bactériologique des urines, recherche éventuelle – en fonction de l'origine géogra-

phique du patient – d'autres bactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) ou de parasites (*Schistosoma*), ainsi que les explorations par imagerie du tractus génital (échographie, IRM).

De façon systématique, la présence de certains pathogènes tels que *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*, quelle que soit leur concentration et y compris en l'absence de symptômes, est considérée comme une infection urogénitale justifiant une antibiothérapie adaptée et doit contre-indiquer, tant que la guérison n'est pas acquise, l'utilisation du sperme frais avant AMP en contexte viral.

Concernant la présence d'uropathogènes non accompagnée des symptômes mentionnés plus haut dans le sperme, des seuils de positivité ont été proposés par différentes équipes, pour aider à la décision de prescription ou non d'un traitement antibiotique. Cependant, le suivi de ces seuils entraîne la prescription fréquente d'antibiotiques sans que l'intérêt de traiter ces spermocultures positives asymptomatiques ne soit confirmé, ni pour le patient, ni pour l'efficacité de la tentative d'AMP elle-même. Il ne semble donc pas fondé de vouloir « stériliser » le sperme avant une tentative, attitude qui entraîne des prescriptions inutiles d'antibiotiques tout en contribuant à l'émergence de bactéries résistantes.

En revanche, la positivité monomicrobienne pour les seuils et les germes suivants (nous citons les seuils définis par Boitrelle *et al.* en 2012) doit faire évoquer une infection génitale, si elle est associée à des symptômes urogénitaux [40] :

- seuil supérieur ou égal à 10<sup>2</sup> UFC/mL pour les entérobactéries : *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Morganella morganii*,
- seuil supérieur ou égal à 5 × 10<sup>3</sup> UFC/mL pour *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Gardnerella vaginalis* (seulement si prélèvement vaginal positif associé pour certains) et *Candida albicans*,
- seuil supérieur ou égal à 10<sup>4</sup> UFC/mL pour *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*.

En pratique, à partir de l'expérience du service de biologie de la reproduction de l'hôpital Cochin (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), les spermocultures initiales positives sont, en l'absence de symptômes génitaux et/ou urinaires, considérées comme des colonisations urétrales. Elles ne justifient ni vérification, ni traitement antibiotique. Elles sont à signaler au patient, avec la recommandation de suivre une cure hydrique et de respecter rigoureusement les consignes de recueil dans des conditions d'asepsie strictes le jour d'une tentative d'AMP. Le corollaire est que, lors de chaque recueil de sperme, le patient doit être interrogé sur l'existence de symptômes génito-urinaires actuels ou récents. Les cultures polymicrobiennes sont dues à des contaminations lors des recueils de sperme. Dans ces situations, une tentative d'AMP avec sperme frais

du patient séropositif pour le VIH est envisageable, sous réserve de ne pas avoir mis en évidence d'inflammation du tractus génital.

### *La leucospermie significative*

Considérant que toute inflammation génitale, qu'elle soit d'origine infectieuse ou non, est susceptible d'augmenter la quantité de particules virales dans le sperme et doit donc être recherchée avant la prise en charge d'un patient séropositif en AMP, par quels moyens peut-on la mettre en évidence ou, au contraire, l'exclure ? Là encore, l'existence de symptômes est un élément important, mais les manifestations (douleurs testiculaires, pesanteur pelvienne, brûlures urinaires, douleurs à l'éjaculation, hémospérme) sont souvent frustes voire totalement absentes [41].

En pratique, les examens disponibles sont peu nombreux et imparfaits. Le plus répandu est le test à la peroxydase (LeucoScreen®). Il permet de marquer les polynucléaires neutrophiles (PNN) non dégranulés et d'en estimer la proportion parmi les cellules non spermatoïques du sperme, c'est-à-dire les cellules de la lignée germinale et les cellules de la lignée blanche, communément appelées cellules rondes, à quantifier selon les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [42]. Une présence modérée de leucocytes dans le sperme est considérée comme physiologique. Le seuil à partir duquel la quantité de cellules positives à ce test est considérée comme « significative » (c'est-à-dire non physiologique, liée possiblement à un état inflammatoire) fait l'objet de débat, mais la valeur de 1 million de leucocytes par millilitre de sperme fait actuellement consensus [42, 43]. Le test à la peroxydase a une bonne valeur prédictive positive mais une faible valeur prédictive négative : il ne détecte que les PNN non dégranulés. Il ne met en évidence ni les PNN activés (donc dégranulés) ni les macrophages et les lymphocytes, qui participent aussi à la réaction inflammatoire.

Le compte des cellules rondes peut également être établi en réalisant le spermocytogramme, par l'observation d'un frottis de sperme fixé et coloré. Pendant que les spermatozoïdes sont caractérisés, les autres cellules et éléments cellulaires observés sur les mêmes champs sont comptés. À la différence du LeucoScreen®, cette analyse permet d'observer divers types cellulaires (PNN, cellules de la lignée germinale et cellules lysées). Cependant, beaucoup de cellules observées dans le sperme sont en partie dénaturées, ce qui rend leur caractérisation difficile [42]. De plus, les chiffres rendus ont une valeur relative, dont l'exactitude est tributaire de la concentration spermatoïque.

Outre ces deux méthodes, le manuel de l'OMS décrit la détection et la quantification des leucocytes par immunomarquage du marqueur panleucocytaire CD45 [42]. La cytométrie de flux est maintenant utilisée pour établir la

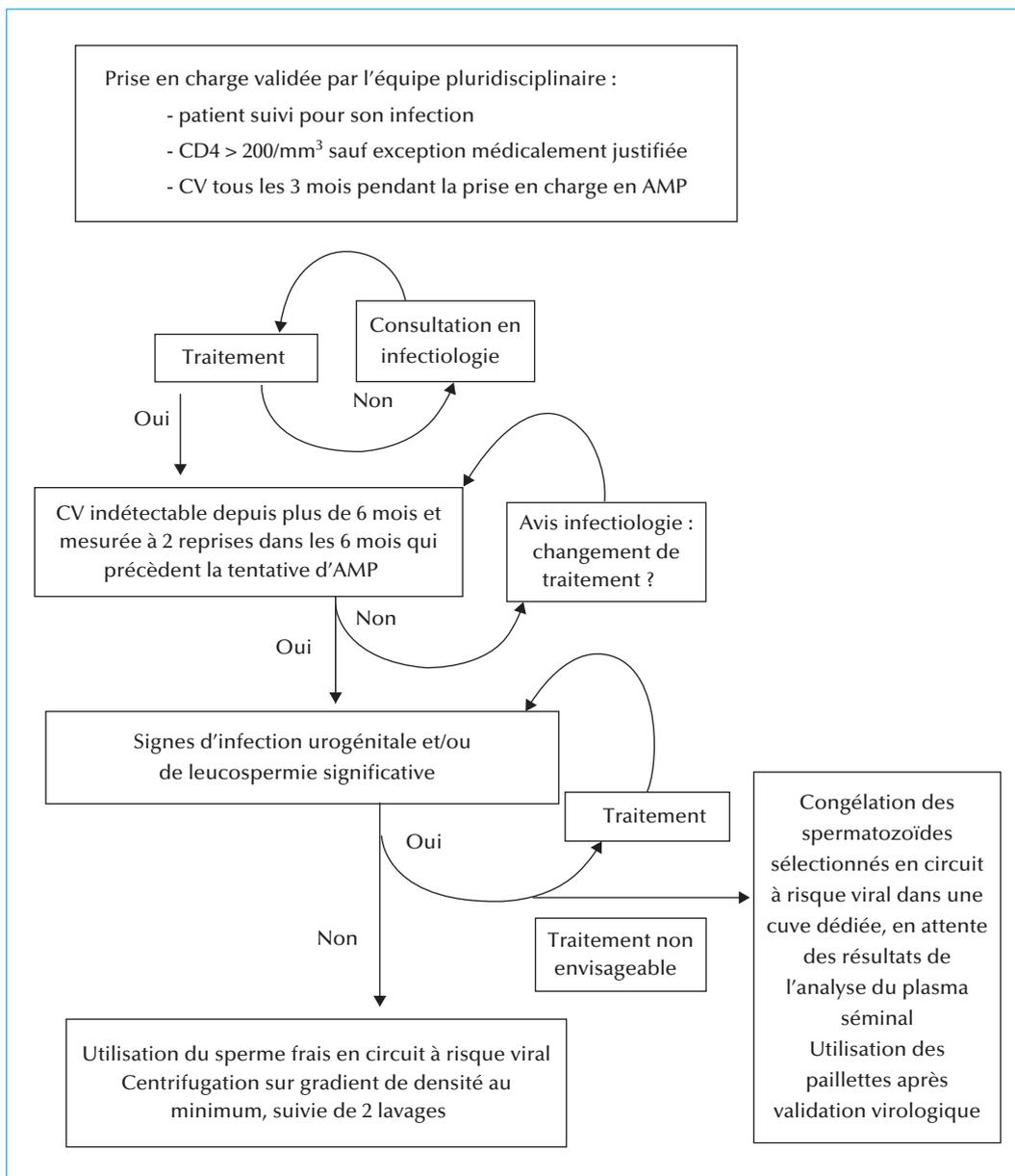
formule leucocytaire dans le plasma séminal : CD15 et CD16 pour la lignée granuleuse, CD4 et CD8 pour la lignée T, CD19 et CD20 pour la lignée B, CD11c et CD14 pour la lignée monocytaire, CD16 et CD56 pour la lignée natural killer (NK). Fathy *et al.* montrent que cette méthode – néanmoins plus coûteuse – a une valeur prédictive négative supérieure à celle du LeucoScreen® [43].

D'autres marqueurs de l'inflammation, plus accessibles en routine, peuvent être recherchés pour documenter une inflammation du tractus génital masculin. Le dosage de l'élastase, protéase lysosomale libérée par les granulocytes au cours du processus inflammatoire, est réalisé par certains laboratoires. Il est considéré depuis longtemps comme informatif d'une réaction inflammatoire, avec un seuil de significativité qui diffère dans la littérature, propre à chaque centre qui doit le fixer selon sa patientèle [44, 45].

Le dosage de cytokines inflammatoires telles l'interleukine 6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) ou l'IL-8 a également été envisagé par certaines équipes [46, 47]. Ces dosages, comme celui d'autres produits de la réponse inflammatoire (prostaglandines, fractions du complément, formes réactive de l'oxygène [protéines, lipides ou ADN oxydés]) ne relèvent pas de la pratique courante, les valeurs seuils associées à une situation d'inflammation ne sont pas encore définies.

Ainsi, les analyses de base à mettre en œuvre pour dépister une leucospermie sont un compte rigoureux des cellules rondes, un test à la peroxydase et une évaluation du pourcentage de leucocytes (principalement les PNN) sur frottis par rapport aux spermatozoïdes, ces trois types de comptage devant porter sur des effectifs suffisants de cellules. Ces analyses peuvent être complétées par d'autres analyses plus sophistiquées.

La caractérisation d'une infection du tractus urogénital et celle d'une leucospermie significative restent délicates, reposant souvent sur des faisceaux d'arguments plus que sur des critères nets. La conduite à tenir concernant l'utilisation du sperme frais d'un patient porteur du VIH peut ainsi sembler difficile à déterminer, en dehors des cas où un traitement anti-infectieux est formellement indiqué. En cas de suspicion forte d'inflammation sans perspective concrète de traitement, il est raisonnable de recourir à des spermatozoïdes congelés et validés par une recherche négative d'ARN-VIH (*figure 1*). Dans les autres cas, il faut garder à l'esprit que le patient doit être sous traitement antirétroviral efficace, et que la maîtrise constante de la réplication virale est le principal garant qu'il n'y aura pas de production importante du virus au niveau du tractus génital. Par ailleurs, l'efficacité des techniques de préparation des spermatozoïdes en vue d'AMP en contexte viral a été amplement démontrée : pour des concentrations virales initiales inférieures à  $10^5$  copies/mL, elles permettent d'obtenir constamment des suspensions de spermatozoïdes exemptes de toute présence virale.



**Figure 1.** Conditions d'utilisation du sperme frais d'un homme séropositif pour le VIH selon l'arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'AMP.

### Cas du VIH-2

Lorsque l'homme est infecté par le VIH-2, la prise en charge globale ne diffère pas de la prise en charge d'un homme infecté par le VIH-1 décrite précédemment. Cependant, les charges virales VIH-2 dans le sang doivent être réalisées dans un laboratoire de référence pour le VIH-2. De même, des charges virales spécifiques VIH-2 doivent être effectuées dans le plasma séminal et/ou la fraction finale en cas de nécessité de congélation du sperme. Celles-ci ne sont réalisées, en

France, qu'au laboratoire de virologie de l'hôpital Bichat-Claude-Bernard, de l'AP-HP (Pr F Brun-Vézinet/Pr Diane Descamps).

### Conclusion

L'efficacité des traitements antirétroviraux actuels sur la présence du VIH dans le compartiment génital et sa transmission sexuelle permet désormais aux couples dont

l'homme est porteur de ce virus de procréer de façon naturelle, sous réserve d'un accompagnement médical. Alliée à la sécurité démontrée des techniques de préparation du sperme mises en place pour l'AMP à risque viral, elle permet aussi de s'affranchir de la nécessité de vérifier l'absence d'ARN VIH dans les échantillons de spermatozoïdes préparés en vue d'AMP et de la cryoconservation qui en était le corollaire, et d'alléger ainsi la réalisation de l'AMP qui, de fait, devrait à l'avenir être principalement demandée par des couples présentant une infertilité.

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Boily M, Baggaley R, Wang L, *et al.* Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 118-29.
2. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, *et al.* HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1991; 23(2): 339-45.
3. Dussaix E, Guetard D, Dauguet C, *et al.* Spermatozoa as potential carriers of HIV. *Res Virol* 1993; 144(6): 487-95.
4. Beck EJ. HIV infection and intervention: the first decade. *AIDS Care* 1991; 3: 295-302.
5. Hogg RS, Heath KV, Yip B, *et al.* Improved survival among HIV-infected individuals following initiation of antiretroviral therapy. *JAMA* 1998; 279: 450-4.
6. Egger M, Hirschel B, Francioli P, *et al.* Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study. Swiss HIV Cohort Study. *BMJ* 1997; 315: 1194-9.
7. European collaborative study. Mother-to-child transmission of HIV-infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 458-65.
8. Chen JL, Philips KA, Kanouse DE, Collins RL, Miu A. Fertility desires and intentions of HIV-positive men and women. *Fam Plann Perspect* 2001; 33: 144-52.
9. Panozzo L, Battegay M, Friedl A, Vernazza P. High risk behaviour and fertility desires among heterosexual HIV-positive patients with a serodiscordant partner—two challenging issues. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 124-7.
10. Semprini A, Levi-Setti P, Bozzo M, *et al.* Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 1992; 340: 1317-9.
11. Marina S, Marina F, Alcolea R, *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1998; 70: 35-9.
12. Guibert J, Merlet F, Le Du A, *et al.* Prise en charge des couples séro-différents pour le VIH. Résultats du protocole NECO (ANRS 092) à Paris. *Reprod Hum Horm* 2001; XIV: 363-4.
13. Bujan L, Pasquier C, Labeyrie E, Lanusse-Crousse P, Morucci M, Daudin M. Insemination with isolated and virologically tested spermatozoa is a safe way for human immunodeficiency type 1 virus-serodiscordant couples with an infected male partner to have a child. *Fertil Steril* 2004; 82: 857-62.
14. Pasquier C, Souyris C, Moinard N, Bujan L, Izopet J. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in semen. *J Virol Methods* 2006; 137: 156-9.
15. Pasquier C, Sauné K, Raymond S, *et al.* Determining seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 load in the context of efficient highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2883-7.
16. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *NEJM* 2000; 342: 921-9.
17. Castilla J, Del Romero J, Hernando V, Marincovich B, García S, Rodríguez C. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40: 96-101.
18. Barreiro P, del Romero J, Leal M, *et al.* Natural pregnancies in HIV-serodiscordant couples receiving successful antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43: 324-6.
19. Vernazza P, Troiani L, Flepp M, *et al.* Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 2000; 14: 117-21.
20. Leruez-Ville M, Dulioust E, Costagliola D, *et al.* Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study (ANRS EP012). *AIDS* 2002; 16: 486-8.
21. Vernazza P, Hirschel B, Bernasconi E, Flepp M. HIV seropositive persons without sexually transmitted diseases under fully suppressive antiretroviral treatment do not sexually transmit HIV. *BMS* 2008; 89: 165-9.
22. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *NEJM* 2011; 365: 493-505.
23. Loutfy R, Wu W, Letchuman MW, *et al.* Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy. *PLoS One* 2013; 8: e55747.
24. Del Romero J, Río I, Castilla J, *et al.* Absence of transmission from HIV infected individuals with HAART to their heterosexual serodiscordant partners. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2015; 33: 666-72.
25. Marcelin A, Tubiana R, Lambert-Niclot S, *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS* 2008; 22: 1677-9.
26. Sheth P, Kovacs C, Kemal K, *et al.* Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009; 23: 2050-4.
27. Dulioust E, Leruez-Ville M, Guibert J, *et al.* No detection of HIV 1-RNA in semen of men on efficient HAART in the past 4 years of a 2002-2009 survey. *AIDS* 2010; 24: 1595-8.
28. Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, *et al.* Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle. *PLoS One* 2010; 5: e10569.
29. Lambert-Niclot S, Tubiana R, *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. *AIDS* 2012; 26: 971-5.

30. Ferraretto X, Estellat C, Damond F, *et al.* Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *PLoS One* 2014; 9: e88922.
31. Pasquier C, Walschaerts M, Raymond S, *et al.* Patterns of residual HIV-1 RNA shedding in the seminal plasma of patients on effective antiretroviral therapy. *Basic Clin Androl* 2017; 27: 17.
32. Morlat P. (ed.) *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Recommandation d'un groupe d'expert.* CNS-ANRS: 2013, chap. 9, 300.
33. Morlat P. (ed.) *Désir d'enfant et grossesse.* In: *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Recommandation d'un groupe d'expert.* Paris: CNS-ANRS, 2018: 7. [https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/11/experts-vih\\_grossesse.pdf](https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/11/experts-vih_grossesse.pdf)
34. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Inf* 1999; 75: 3-17.
35. Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA, *et al.* Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *Lancet* 1997; 349: 1868-73.
36. Dyer JR, Eron JJ, Hoffman IF, *et al.* Association of CD4 cell depletion and elevated blood and seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA concentrations with genital ulcer disease in HIV-1-infected men in Malawi. *J Infect Dis* 1998; 177: 224-7.
37. Anderson JA, Ping LH, Dibben O, *et al.* HIV-1 populations in semen arise through multiple mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; 6(8): e1001053.
38. Tachet A, Dulioust E, Salmon D, *et al.* 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.
39. Bujan L, Daudin M, Matsuda T, *et al.* Factors of intermittent HIV-1 excretion in semen and efficiency of sperm processing in obtaining spermatozoa without HIV-1 genomes. *AIDS* 2004; 18: 757-66.
40. Boitrelle F, Robin G, Lefebvre C, *et al.* Bacteriospermia in Assisted Reproductive Techniques: effects of bacteria on spermatozoa and seminal plasma, diagnosis and treatment. *Gynecol Obstet Fertil* 2012; 40: 226-34.
41. Chan PTK, Schlegel PN. Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. Part I. *J Androl* 2002; 23: 453-60.
42. World Health Organization (WHO) laboratory. *Manual for the examination and processing of human semen.* Geneva: World Health Organization, 2010.
43. Fathy A, Chen SJ, Novak N, Schuppe HC, Haidl G, Allam J-P. Differential leucocyte detection by flow cytometry improves the diagnosis of genital tract inflammation and identifies macrophages as proinflammatory cytokine-producing cells in human semen. *Andrologia* 2014; 46: 1004-12.
44. Jochum M, Pabst W, Schill WB. Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. *Andrologia* 1986; 18: 413-9.
45. Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000; 15: 1978-84.
46. Moretti E, Collodel G, Mazzi L, Campagna M, Iacoponi F, Figura N. Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit and varicocele. *Fertil Steril* 2014; 102: 354-60.
47. Maegawa M, Kamada M, Irahara M, *et al.* A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002; 54: 33-42.