

Spermoculture positive le jour de la tentative de fécondation in vitro : fréquence et impact au cours de la prise en charge

Camille Jean

▶ **To cite this version:**

Camille Jean. Spermoculture positive le jour de la tentative de fécondation in vitro : fréquence et impact au cours de la prise en charge . Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01619789

HAL Id: dumas-01619789

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01619789

Submitted on 19 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016 N° 267

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE

DOCTEUR EN MÉDECINE

Spécialité : Biologie médicale

Spermoculture positive le jour de la tentative de fécondation in vitro : fréquence et impact au cours de la prise en charge

Présentée et soutenue publiquement

le 27 octobre 2016

Par

Camille JEAN

Née le 1er mai 1987 à Montpellier (34)

Dirigée par Mme Le Professeur Rachel Levy

Jury :

Mme Le Professeur Catherine Patrat ..... Président

Mme Le Professeur Nelly Achour Frydman

Mme Le Docteur Florence Boitrelle

M. Le Docteur Salah Gallah

Except where otherwise noted, this work is licensed under **http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu les membres de mon jury :

A Madame Le Professeur Catherine PATRAT,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury, et de m'avoir accueilli dans votre service pendant ces 6 derniers mois.

A Madame Le Professeur Rachel LEVY,
Pour avoir accepté de diriger ce travail, pour votre disponibilité, votre encadrement et pour la qualité de votre enseignement au cours de ce projet. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame Le Professeur ACHOUR FRYDMAN Nelly,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Madame Le Docteur BOITRELLE Florence,
Pour avoir accepté de juger ce travail avant même de me rencontrer, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur Le Docteur GALLAH Salah,
Pour tes conseils éclairés et ton aide à la réalisation de ce mémoire et contributions à l'analyse des données de ce travail. Sois assuré de toute ma reconnaissance, et merci de juger mon travail.

A Bruno dit Brubru, Dori et tant d'autres surnoms… Je te remercie pour ta disponibilité, ton aide, tes conseils avisés et ton soutien tout au long de ce travail.

A Vincent, merci pour ton aide précieuse et ta patience avec mes statistiques.

A Laurent Benzerara, merci pour toutes tes questions bactério qui ont permis de développer ce travail et pour ton aide dans l'analyse des statistiques

A toute l'équipe du laboratoire de biologie de la reproduction et de bactériologie de Tenon, pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.

A toute l'équipe du laboratoire de biologie de la reproduction de Bichat et de Cochin pour votre bonne humeur, votre aide et vos enseignements techniques.

A Xavier, Achraf et Marie-Astrid pour m'avoir soutenu pendant ces derniers mois de mon internat, pour avoir répondu à mes nombreuses questions et vos conseils avisés sur mon travail.

A mes supers co-internes de PMA : Taous, Anne-Sophie, Johanna, Laure, Sarah, Ahmed
Au top des parisiens/parisiennes : Agathe, Emeline, Hélène, Boubou,
Et aux meilleurs des sudistes : Caroline (alias Pinu), Sandra, Rebec, Mimi, Eric, Eva, Anaïs, Julie, Claire
Un grand merci pour ces années et tous ces bons moments partagés.

A ma famille,
Mes parents pour leur soutient depuis toujours et pour les années futures, merci de tout ce que vous avez fait pour moi durant ces longues années.
A mes frères et sœur pour notre complicité, nos rigolades et de m'avoir supportée… je sais que c'est très dur au quotidien ;))
(A Jack et Simba)

A PO, pour ton soutien de tous les jours, ta bonne humeur… et les jours à venir à tes côtés qui j'en suis sûr nous réservent de belles surprises. (*Bon par contre tu dois toujours m'écrire une chanson !!!)*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 2

TABLE DES MATIÈRES 4

LISTE DES FIGURES 6

LISTE DES TABLEAUX 7

LISTE DES ABRÉVATIONS 9

1. INTRODUCTION 10

2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 11

2.1. PREVALENCE DES BACTERIOSPERMIES ASYMPTOMATIQUES 11

2.2. BACTERIOSPERMIES ET PARAMETRES SPERMATIQUES 15

2.3. PREPARATION DU PRELEVEMENT DE SPERME EN AMP 21

2.4. CONTAMINATION DES MILIEUX DE CULTURE 22

2.5. BACTERIOSPERMIES ET TAUX DE FECONDATION, QUALITE EMBRYONNAIRE ET TAUX DE GROSSESSE 23

3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 26

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES 27

4.1. CRITERES D'INCLUSION 27

4.2. RECUEIL DE SPERME, PRELEVEMENT BACTERIOLOGIQUE ET INTERPRETATION 27

4.3. FECONDATION *IN VITRO* 29

4.4. ANALYSE DES DONNEES 30

5. RÉSULTATS 32

5.1. DESCRIPTION DES PATIENTS 32

5.2. PREVALENCE DES BACTERIES DANS LE SPERME AVANT PREPARATION 32

5.2.1. PREVALENCE DES SPERMOCULTURES POSITIVES ET NEGATIVES 32

5.2.2. COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DES 4 GROUPES 36

5.2.3. COMPARAISON DES RESULTATS DES TENTATIVES 37

- FIV CLASSIQUE, ICSI ET MI FIV- MI ICSI 37
- FIV CLASSIQUE 40
- ICSI 43

5.3. PREVALENCE DES BACTERIES DANS LE SPERME APRES PREPARATION 45
5.4. RESULTATS DES MILIEUX DE CULTURE EMBRYONNAIRE 48

6. DISCUSSION 49

CONDITIONS DE RECUEIL DE SPERME ET PREVALENCE DES BACTERIOSPERMIES 49
- CONDITIONS DE RECUEIL DU SPERME ET PREVALENCE DES BACTERIES DANS LE SPERME 49
- FLORE BACTERIENNE 50

PREPARATION DU SPERME ET MILIEU DE CULTURE EMBRYONNAIRE 51
- ELIMINATION DES GERMES PAR LA PREPARATION SUR GRADIENT DE DENSITE 51
- BACTERIES RETROUVEES APRES PREPARATION 52
- CONTAMINATION DE MILIEU DE CULTURE 53

IMPACT DE LA BACTERIOSPERMIE SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES, LE TAUX DE FECONDATION, LA QUALITE EMBRYONNAIRE ET L'ISSUE DE LA TENTATIVE 54
- PARAMETRES SPERMATIQUES *IN VIVO* - *IN VITRO* 54
- PARAMETRES DE LA FIV CLASSIQUE ET DE L'ICSI 55
- STRESS OXYDATIF 57
- L'ICSI 58
- FAUSSES COUCHES 58

CONCLUSION 60

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 61

ANNEXES 66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Résultats des bactériospermies avant préparation du sperme 33

Figure 2. Distribution des espèces bactériennes avant migration sur gradient..... 35

Figure 3. Distribution des espèces bactériennes après migration sur gradient..... 35

Figure 4. Résultats des bactériospermies avant puis après préparation du sperme 46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Prévalence des bactériospermies asymptomatiques dans la littérature. 12

Tableau 2. Impact des micro-organismes sur les paramètres spermatiques dans la littérature. 18

Tableau 3. Seuils de pathogénicité des principales bactéries du sperme dans le cadre d'une tentative d'AMP. 28

Tableau 4. Effectifs des groupes. 34

Tableau 5. Caractéristiques des groupes. 36

Tableau 6. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients de FIV classique, d'ICSI et de mi FIV- mi ICSI. 38

Tableau 7. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients de FIV classique, d'ICSI et de mi FIV- mi ICSI. 39

Tableau 8. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients de FIV classique. 41

Tableau 9. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients de FIV classique. 42

Tableau 10. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients d'ICSI.. 43

Tableau 11. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients d'ICSI. 44

Tableau 12. Résultats des grossesses des spermocultures positives après préparation 47

LISTE DES ABRÉVATIONS

AMP : Assistance médicale à la procréation

CCO : Complexe cumulo ovocytaire

CMI : concentration minimale inhibitrice

DFI : index de dégradation de l'ADN

E.coli : *Escherichia coli*

FCS : Fausse couche spontanée

FIV : Fécondation *in vitro*

hCG : Human chorionic gonadotrophin

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection

IMC : Indice de masse corporelle

NP : Non précisé

ROS : radicaux libres oxygénés

SA : semaines d'aménorrhées

UU : *Ureaplasma urealyticum*

1. INTRODUCTION

En France, l'arrêté du 2 juin 2014 (modifiant l'arrêté du 3 août 2010)(1) relatif aux bonnes pratiques cliniques et biologiques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) recommande la réalisation d'une spermoculture « récente » avant toute tentative de fécondation *in vitro* (FIV*)*. La spermoculture fait partie de la prise en charge diagnostic d'un couple venant consulter pour infertilité. Cet examen bactériologique permet de mettre en évidence une infection du tractus génital masculin pouvant être associée à des anomalies spermatiques. En effet, le sperme est une sécrétion qui, à l'état physiologique, est stérile ; cependant la présence de bactéries commensales ou pathogènes peut être détectée. Rehewy *et al.* (1979)(2) retrouve plus de spermocultures positives chez les patients asymptomatiques infertiles (73%) que chez les patients fertiles (54%). De la même manière, Toth *et al.* (1981)(3) montre que les hommes fertiles ont significativement moins de spermoculture positives que le groupe d'hommes infertiles. L'interprétation des résultats de la spermoculture est variable en fonction des centres et entraine une prise en charge de ses résultats différente (4). Dans notre centre d'AMP, une spermoculture négative de moins d'un an est exigée avant toute FIV. L'absence de germe (ou culture stérile) ainsi que la présence d'une flore (ou culture polymicrobienne) dans l'échantillon de sperme envoyé en bactériologie sont définis comme des spermocultures négatives. La présence d'une bactérie isolée, au-dessus d'un seuil établi par l'étude de Boitrelle *et al.* (2012)(5), est considéré comme une spermoculture positive et nécessite un traitement antibiotique afin d'éradiquer la bactérie et limiter le risque de contamination du milieu de culture embryonnaire.

Dans ce travail nous avons cherché à évaluer l'impact des bactéries présentes dans le sperme le jour de la tentative sur les résultats de l'AMP.

2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Prévalence des bactériospermies asymptomatiques

La définition d'une spermoculture positive change selon les études en fonction du seuil de détection et du type de micro-organisme détecté. L'analyse de la littérature montre une prévalence des bactériospermies chez des hommes infertiles en âge de procréer qui varie de 15 à 92,3% (Tableau 1). De nombreux micro-organismes sont détectés en culture aérobie et anaérobie et leur seuil de détection diffère entre les études et se situe entre « détection de la bactérie quel que soit le seuil » et $\geq 10^6$ bactéries/mL. On retrouve une proportion importante de Streptocoques sp. (Streptocoque non hémolytique, Streptocoque alpha-hémolytique, *Streptococcus agalactiae*, et *Streptococcus anginosus*), de Staphylocoques sp. (*Staphylococcus epidermidis*, coagulase négative, *Staphylococcus aureus*), et d'Entérocoques sp. (dont *Enterococcus faecalis*). Ces micro-organismes peuvent être issus d'une flore commensale ou d'une flore pathogène.

Selon l'étude de Cottel *et al.* (1997)(6), la présence de bactéries dans le sperme est inconstante. Les 74 patients pris en charge en AMP devaient faire deux recueils le même jour. Vingt hommes (27%) ont eu une spermoculture qui a changé entre les deux prélèvements : spermoculture positive puis négative ou spermoculture négative puis positive. La prévalence des bactéries dans le sperme peut varier dans une même journée.

Tableau 1. Prévalence des bactériospermies asymptomatiques dans la littérature.

*(*NP : non précisé)*

Auteurs	Effectif des spermocultures	Seuils (CFU/mL)	Prévalence	Micro-organismes retrouvés
Huyser *et al.* (1991) (7)	183	NP	92,3%	• Flore commensale (*Staphylococcus epidermidis* (49%), Streptocoque non hémolytique (23%)…) • Flore pathogène (*Enterococcus faecalis* (16%), *Escherichia coli* (7,7%)…)
Stovall *et al.* (1993) (8)	207	≥10^2 à 10^6	80,7%	« ¾ de flore cutanée » : - Staphylocoque coagulase négative (51%), - Streptocoque alpha-hémolytique (42%), - *Corynebacterium* (22%), - *Escherichia coli* (4%) (*E.coli*)
Shalika *et al.* ((1996) (9)	342	> 10^4	32% + 11% *Ureaplasma*	- Entérocoque (73%), - *E.coli* (8%), - *Staphylococcus aureus* (6%), - *Ureaplasma* (11%)
Cottel *et al.* (1997) (6)	140	≥ 10^5	63%	Majorité de germes non-pathogènes : - Streptocoques non hémolytiques (30%), - *Staphylococcus epidermitis*(28,6%), - *Ureaplasma urealyticum* (13,6%), - *E.coli* (6,4%)

Virecoulon *et al.* (2005) (10)	600	• ≥10^3 pour 1 à 2 bactéries isolées • ≥10^4 *Ureaplasma urealyticum*	22% + 49% flore polymicrobienne	- *Gardnerella vaginalis* (27%) - Staphylocoque coagulase négative (16%) - *Streptococcus anginosus* (14%) - *E.coli* (6%)
Sanocka-Maciejewskz, Ciupinska & Kurpisz (2005) (11)	39	NP	NP	- Staphylocoques hémolytiques (38%), - *Peptostreptococcus spp* (21%), - *Enterococcus faecalis* (20%), - *E.coli* (20%), - *Ureaplasma urealyticum* (17%)
Jedrzejczak *et al.* (2005) (12)	79	>10^3	86,1%	- Staphylocoque coagulase négative (24,2%), - Streptocoque (20,1), - Entérocoque (13,7%), - Mycoplasmes (11,3%)
Moretti *et al*. (2009) (13)	1256	• ≥10^4 pour les Gram positifs • ≥10^5 pour les Gram négatifs et *Ureaplasma urealyticum*	33%	- *Enterococcus faecalis* (32%), - E.*coli* (20%), - *Streptococcus agalactiae* (13%), - *Ureaplasma urealyticum* (12%), - *Staphylococcus epidermitis* (10%)
Leterrrier *et al.* (2010) (14)	14119	≥10^3	44,8%	- Streptocoque alpha-hémolytique (30%), - Staphylocoque coagulase négative (21%), - Entérocoque spp. (18%), - E.*coli* (14%)

De Francesco *et al.* (2011) (15)	696	$>10^3$	22% + 30% flore	- *Gardnerella vaginalis* (28%), - E.*coli* (24%), - Entérocoque sp. (14%)
Domes *et al.* (2012) (16)	7852	$>10^3$	15%	- *Enterococcus faecalis* (56%), - E.*coli* (16%), - *Streptococcus agalactiae* (13%), - *Staphylococcus aureus* (5%)
Fourie, Loskutoff & Huyser (2012) (17)	1210	NP*	50%	-Staphylocoque coagulase négative (23%), - E.*coli* (5%), - *Staphylococcus aureus* (4%)
Abeysundara *et al.* (2013) (18)	118	Présence de germes quel que soit le seuil	72,88%	- Streptocoque *sp.* (46,5%), - Staphylocoque *sp.* (19,8%), - *Coliform species* (12,8%), - *Corynebacterium sp.* (5,8%)
Dissanayake *et al.* (2014) (19)	66	NP*	63%	- Streptocoque *sp*. (36,3%), - E.*coli* (33,3%), - Staphylocoque *sp*. (13,6%)

2.2. Bactériospermies et paramètres spermatiques

- ***In vivo – In vitro***

La présence de bactéries dans le sperme a un impact variable sur les paramètres spermatiques. Des études ont été réalisées selon deux modèles : *in vivo* et *in* vitro (Tableau 2).

In vivo, l'équipe de Cottell *et al.* (1997)(6) n'observe pas de différence significative de mobilité, concentration ou morphologie spermatique lorsque l'on retrouve une bactérie isolée dans le sperme; tandis que De Geyter *et al.* (1994)(20) montre une diminution significative de la concentration et de la mobilité progressive spermatique chez des patients infertiles en présence d'un micro-organisme >10^3CFU/mL.
Selon Sanocka-Maciejewskz *et al.* (2005)(11), Moretti *et al.* (2009)(13) et De Francesco *et al*. (2011)(15), on note une altération des paramètres spermatiques (numération et mobilité) associée à certains micro-organismes (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae, E.coli*, *Staphylococcus epidermitis, Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*, *ureaplasma urelyticum, Gardnerella vaginalis*).
Selon Bussen *et al.* (1997)(21), l'impact des bactéries diffère avant et après préparation du sperme. Avant préparation de l'éjaculat sur gradient de densité (Percoll), il existe une diminution significative de la mobilité progressive en présence d'une bactérie ; cependant, après préparation, cet impact disparait. Dans cette étude, la bactériospermie n'est donc pas associée à une altération des paramètres spermatiques après préparation du sperme.

In vitro, Berktas *et al.* (2008)(22), Fraczek *et al.* (2014)(23) et Boguen *et al.* (2015)(24), ont montré une diminution significative de la mobilité progressive spermatique à certaines bactéries. Dans ces études, des échantillons de spermes aux caractéristiques spermatiques normales (WHO 5th édition 2010)(25) ont été incubés avec des germes (*E.coli*,...) à des concentrations différentes.

- **Antibiotiques**

Afin de limiter l'impact négatif des bactéries sur les paramètres spermatiques, plusieurs études ont été entreprises pour évaluer l'impact de la prise d'antibiotique sur ces micro-organismes et leur bénéfice sur les spermatozoïdes.
Dans l'étude d'Huyser *et al.* (1991)(7), un traitement antibiotique adapté au germe et à son antibiogramme a été proposé aux patients ayant une spermoculture positive et bénéficiant d'une prise en charge en FIV. Quatorze jours avant la ponction ovocytaire, 92,3% des spermocultures étaient positives (flore commensale et/ou pathogène). Après un traitement antibiotique adapté, on ne retrouve plus que 77% des prélèvements contaminés ; il existe une diminution significative des bactéries initialement présentes (p 0,0001). Dans l'étude de Barletta *et al.* (1995)(26), on note une amélioration de la mobilité et la morphologie spermatiques chez des patients infectés par *E.coli* après un traitement par quinolone.

Cependant l'utilisation des antibiotiques reste controversée. L'étude de Comhaire *et al.* (1986)(27) a montré une amélioration spontanée des paramètres spermatiques, non influencée par la doxycycline, chez des hommes infertiles présentant une infection des glandes accessoires (MAGI). Trente-trois hommes ont été inclus dans cette étude : 20 ont reçu de la doxycycline pendant 1 mois et 13 ont reçu un placebo. On observe à 6 mois, une amélioration significative de la mobilité spermatique et une diminution du nombre de spermocultures positives, à la fois pour le groupe traité par doxycycline et pour celui qui a reçu le placebo.
Dans l'étude de Liversedge *et al.* (1996)(28), une antibiothérapie adaptée a été instaurée chez 52 patients (sur un total de 100) ayant une spermoculture positive (germe potentiellement pathogène ou flore cutanée) dont le seuil de positivité est supérieur à 10^4 colonies/mL. Aucune différence significative entre les deux groupes n'a été démontrée concernant la qualité du sperme. En revanche on note une augmentation significative de bacilles à gram négatif dans les prélèvements vaginaux effectués chez les partenaires des hommes traités par antibiotique, ce qui suppose que pendant un rapport sexuel, les antibiotiques sont introduits par l'éjaculat dans le vagin et entrainent une modification de la flore vaginale.

Il est important de bien choisir un antibiotique adapté pour éliminer la bactérie contaminant le sperme. En effet l'étude de Schlegel *et al.* (1991)(29) montre que certains antibiotiques peuvent s'avérer toxique quel que soit leur concentration et avoir des effets sur la spermatogénèse ou le spermatozoïde. La nitrofurantoine aurait un effet néfaste sur la spermatogénèse avec une diminution de la production de spermatozoïdes, et une baisse de la mobilité est observée à des concentrations hors-clinique (5 à 10 fois supérieure aux recommandations)(30). L'érythromycine et le chlorotétracycline peuvent entrainer une altération de la mobilité (31). La néomycine entrainerait une diminution de la numération des spermatozoïdes et une altération de la mobilité (32).

Tableau 2. Impact des micro-organismes sur les paramètres spermatiques dans la littérature.

Auteurs	Etude *in vivo* ou *in vitro*	Population étudiée	PAS D'IMPACT	IMPACT
Bussen *et al.* (1997)(21)	*In vivo*	88 couples asymptomatiques : - 46 spermocultures positives avec un seul germe isolé - 14 spermocultures avec la présence d'une flore cutanée - 28 spermocultures négatives	- concentration et numération - morphologie	- **diminution** de la mobilité progressive (a+b%) AVANT préparation spermatique au Percoll
Cottell *et al.* (1997)(6)	*In vivo*	140 spermocultures de patients infertiles : - groupe ≥10^5 CFU/mL - groupe < 10^5 CFU/mL - groupe spermoculture négative	- concentration - mobilité - morphologie	/
De Geyter *et al.* (1994) (20)	*In vivo*	281 spermocultures de patients infertiles : - 120 spermocultures négatives - 99 spermocultures positives < 10^3 CFU/mL - 62 spermocultures positives > 10^3 CFU/mL	- morphologie	**diminution :** - concentration - mobilité
Sanocka-Maciejewskz, Ciupinska & Kurpisz	*In vivo*	83 spermocultures : - 30 patients controles SANS infection du tractus génital - 14 patients infertiles SANS infection du	/	**Diminution :** - Volume de sperme - concentration - mobilité progressive

(2005)(11)		tractus génital - 39 patients infertiles AVEC une infection du tractus génital		- morphologie - vitalité • **E.*coli*** → diminution de la concentration et de la mobilité progressive • ***Staphylococcus aureus*** → diminution de la concentration, de la mobilité progressive et de la morphologie
Moretti *et al.* (2009)(13)	*In vivo*	246 spermocultures positives de patients infertiles comparés à 20 patients contrôles	/	***Enterococcus faecalis* + E.*coli* + *Staphylococcus epidermitis* + *Morganella morganii* + *ureaplasma urelyticum*** → diminution de la numération et la mobilité spermatique
De Francesco *et al.* (2011) (15)	*In vivo*	4 groupes : - 36 patients contrôles - 332 patients avec spermoculture négative - 208 patients avec une flore polymicrobienne - 156 patients avec une spermoculture positive	/	**Diminution :** - concentration - mobilité progressive - morphologie • ***Enterococcus sp.*** → diminution de la mobilité progressive et de la morphologie • ***E.coli*** → diminution de la concentration spermatique • ***Streptococcus agalactiae*** → diminution de la concentration et de la mobilité • ***Gardnerella vaginalis* + *Ureaplasma urealyticum*** → diminution de la concentration, de la mobilité progressive et de la morphologie

Berktas *et al.* (2008)(22)	*In vitro*	Incubation à différentes concentrations de bactéries avec des spermes de concentration spermatique entre 20 et 150 millions	/	***Staphylococcus epidermitis* + *Staphylococcus aureus* + *Pseudomonas aeruginosa* + E.*coli* →** diminution de la mobilité progressive pour des concentrations bactériennes $2x10^5$, $2x10^6$ et $2x10^7$
Boguen e*t al.* (2015)(24)	*In vitro*	Incubation de différentes souches d'*E.coli* à des concentrations différentes (ratio 1 :2, 1 :16, 1 :128)	***E.coli* non hémolytique souche isolée →** pas de diminution de la mobilité et de la vitalité	***E.coli* hémolytique →** diminution de la mobilité et de la vitalité quel que soit la concentration ***E.coli* non hémolytique souche américaine →** diminution de la mobilité à une forte concentration (ratio 1 :128)
Fraczek et *al.* (2014)(23)	*In vitro*	Incubation d'*E.coli* >$3x10^5$ CFU/mL	/	***E.coli* →** Diminution de la mobilité progressive

2.3. Préparation du prélèvement de sperme en AMP

Lors de la prise en charge en AMP, une préparation du sperme est réalisée le jour du recueil de l'éjaculat. Cette préparation a pour but de sélectionner les spermatozoïdes les plus fécondants et d'éliminer le liquide séminal, les débris cellulaires et certaines bactéries. On distingue classiquement deux techniques de préparation de sperme pour l'AMP : migration ascendante (*swim-up*) et migration sur gradient de densité. De plus, les milieux de lavage et de culture embryonnaire peuvent contenir des antibiotiques ou non.

- **Résultats bactériologiques en fonction de la technique de préparation, sans supplémentation d'antibiotiques**

Plusieurs études ont montré l'efficacité des techniques de préparation du sperme dans l'élimination des bactéries. L'étude de Huyser *et al.* (1991)(7) montre que la technique de *swim-up* + lavage entraine une diminution significative de 57,4% des bactéries retrouvées dans le sperme. Le jour de la ponction, 77% des spermocultures étaient positives (flore ou germes pathogènes) ; après préparation, 19,6% des spermocultures étaient encore positives.

L'étude réalisée par l'équipe d'Abeysundara *et al.* (2013)(18) a montré l'efficacité des deux techniques de préparation du sperme (*swim-up* et gradient de sélection) dans l'élimination des bactéries. Soixante douze pourcents des spermocultures étaient positives avant le *swim-up* et 24% des prélèvements restaient positifs après ; avant gradient de sélection, 74% des spermocultures étaient positives et 36% des prélèvements restaient positifs après.

Dans l'étude de Knox *et al.* (2003)(33), les *Ureaplasmas* (*Ureaplasma parvum* et *Ureaplasma urealyticum*) ont été détectés dans 73 échantillons de sperme sur 343 collectés puis dans 29 échantillons après préparation du sperme par gradient.

Dans l'étude de l'équipe d'Al-Mously *et al*. (2009)(34), la recherche de *chlamydia trachomatis*, effectuée par PCR chez 100 patients asymptomatiques au cours du bilan d'infertilité, était positive pour 13 patients. Après centrifugation sur gradient de densité, persistance du *chlamydia* par PCR dans 6 prélèvements (sans lien avec le nombre de copies détectées à l'état frais).

Ces études ont montré une efficacité relative d'élimination des germes pour les deux techniques de préparation du sperme.
Associé à la réduction du nombre de germes, selon l'équipe de Bussen *et al.* (1997)(21), la préparation permet aussi d'améliorer les paramètres spermatiques. Après préparation au gradient de densité (Percoll), la diminution significative de la mobilité en présence d'une spermoculture positive disparait.

- **Résultats bactériologiques en fonction de l'absence ou la présence d'antibiotiques dans la préparation**

La présence d'antibiotiques dans le milieu de préparation permet également une diminution de la présence de bactéries. On retrouve dans l'équipe de Dissanayake *et al.* (2014)(19) une élimination totale des bactéries après *swim-up* dans un milieu supplémenté en antibiotiques (pénicilline et streptomycine) contre 75,7% d'élimination après *swim-up* dans un milieu non supplémenté.
L'équipe de Cottell *et al*. (1997)(6) a observé une élimination de 95% des micro-organismes après gradient de densité dans un milieu avec supplémentation en antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

La préparation de sperme le jour de la tentative a donc un rôle essentiel sur la présence de bactéries. L'association de la technique de préparation et de la présence d'antibiotiques dans les milieux permet une élimination plus efficace des bactéries.

2.4. Contamination des milieux de culture

Quelle que soit la technique de préparation du sperme et la présence ou non d'antibiotique, le risque de contamination du milieu de culture embryonnaire existe. La fréquence exacte de ces contaminations est inconnue. Peu de publications sont disponibles aujourd'hui. L'équipe de Ben-Chetrit *et al.* (1996)(35), rapporte 5 milieux contaminés avec des levures sur 729 cycles (soit 0,69% de milieux contaminés).

L'équipe de Cottel *et al.* (1996)(36) reporte 6 cas de contamination du milieu de culture sur 1691 ponctions (soit 0,35% de milieux contaminés).
L'équipe de Zhu *et al.* (2004)(37) observe 11 milieux de culture contaminés sur 2174 cycles de FIV (soit 0.51% de milieux contaminés) ; le germe le plus souvent retrouvé est l'*Escherichia coli*.
L'étude de Krissi *et al.* (2004)(38) retrouve 4 milieux de culture embryonnaire contaminés sur 93 cycles de FIV (soit 4,3%), avec cependant des micro-organismes différents de ceux retrouvés initialement dans le sperme.
L'équipe de Kastrop *et al.* (2007)(39) objective 95 cas de contamination de milieu de culture embryonnaire sur les 11 051 cycles FIV classique (soit 0,86% de milieux contaminés). En revanche, aucun cas de contamination n'a été observé en ICSI. Les bactéries et les levures responsables majoritairement des contaminations du milieu de culture étaient *E.coli* (n=56) et *Candida sp.* (n=24). Concernant l'*E.coli*, dans 96,4% des cas, il existait une résistance à la pénicilline et/ou à la streptomycine, antibiotiques présents dans la préparation du sperme et dans le milieu de culture. L'association pénicilline + streptomycine a été remplacée par de la gentamycine en 2005. Rétrospectivement, dans l'étude de Kastrop *et al.* (2007)(39), 70 bactéries isolées étaient sensibles à la gentamycine, ce qui aurait pu prévenir ces contaminations.

2.5. Bactériospermies et taux de fécondation, qualité embryonnaire et taux de grossesse

Alors que la présence de bactéries dans le sperme a un impact sur les paramètres spermatiques, l'impact des bactéries sur les résultats de la fécondation *in vitro* est controversé.

- **Impact des bactéries sur les paramètres de la FIV**

L'étude de Huyser *et al.* (1991)(7) a montré que lors d'une contamination du milieu de culture par des pathogènes tel que *E.coli*, *enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca* ou *Klebsiella pneumoniae*, tous les ovocytes étaient dégénérés, sans aucun signe de pronuclei. Rowlands *et al.* (1994)(40) étudie les échecs de fécondation et montre que la

cause probable de l'échec de fécondation d'une partie de ces cas est la contamination du milieu de culture d'origine séminale.

Fraczek *et al.* (2014)(23) a étudié la vitalité et la fécondance des spermatozoïdes en présence de bactéries grâce aux tests hypo-osmotic swelling (HOS) et sperm penetration assay (SPA). Le test de HOS montre une baisse de la vitalité des spermatozoïdes en présence de différents germes : en l'absence de bactérie la vitalité est de 73%, en présence d'*E.coli* 65 %, avec *Staphylococcus haemolyticus* 63% et avec *Bacteroides urelyticus* 56% (p <0,01). Le test SPA permet d'apprécier le pourcentage d'ovocytes fécondés (avec présence de 2 pronucléi) ; sans bactérie le test SPA est de 70,5%, 58,2 % en présence d'*E.coli*, 57,4% avec *Staphylococcus haemolyticus* et 54,7% avec *Bacteroides urelyticus* (p <0,001).

L'étude de Guillet-Rosso *et al.* (1987)(41) montre une diminution significative du taux de grossesse en présence d'une spermoculture positive : 48 grossesses pour 232 cycles étudiés (21%) chez les couples avec une spermoculture négative, versus 18 grossesses pour 150 cycles (12%) chez les couples avec une spermoculture positive (p <0,05). Ces résultats sont indépendants du nombre d'embryons transférés. En revanche, on ne trouve pas de différence significative concernant le taux de fécondation.

- **Pas d'impact des bactéries sur les paramètres de la FIV**

L'étude de Forman *et al.* (1987)(42) observe une élimination totale des micro-organismes présents dans les milieux de culture embryonnaire grâce à la supplémentation dans le milieu de pénicilline et de streptomycine. En l'absence de bactérie après préparation, ils ne retrouvent pas de diminution du taux de fécondation.

L'étude de Liversedge *et al*. (1996)(28) montre que la présence de bactéries potentiellement pathogènes et de flore cutanée n'ont pas d'impact sur le taux de fécondation. En présence d'un germe pathogène ou d'une flore le taux de fécondation est de 60% et en l'absence d'une bactérie au-dessous du seuil de positivité (<10^4CFU/mL) le taux de fécondation est de 55%.

Dans l'étude de Cottell *et al.* (1996)(36) les taux de fécondation, de clivage et de grossesse étaient indépendants de la présence de germes.

L'étude de Krissi *et al.* (2004)(38) n'a montré aucune différence sur les taux de fécondation ou la qualité embryonnaire des 93 couples pris en charge en FIV classique et

ICSI : 65,38% de taux de fécondation contre 64,62% pour les groupes de spermocultures négatives et positives, respectivement.

L'étude de De Geyter *et al.* (1994)(20) ne montre pas de différence significative concernant les taux de fécondation et les taux de grossesse. Cependant, même si la différence n'est pas significative, on note une tendance à la diminution de ces deux paramètres : 66,7% de taux de fécondation pour les patients dont la spermoculture réalisée 5 semaines avant la tentative de FIV était négative versus 54,5% pour ceux qui avaient un germe au-dessus du seuil de pathogénicité (bactéries $>10^3$ CFU/mL) et qui ont été traités par un antibiotique (erythromycine, vibramycine, cotrimoxazol ou penicilline). Concernant le taux de grossesse, ils obtiennent 25,8% versus 11,3% de grossesse respectivement, mais ces différences ne sont pas significatives.

L'étude de Stovall *et al.* (1993)(8) a montré que les taux de fécondation et les taux de grossesse étaient comparables entre les patients avec une spermoculture positive et ceux avec une spermoculture négative : les taux de fécondations étaient de 60% contre 62,9% ($p>0,05$) respectivement et les taux de grossesses cliniques 18,1% contre 18,9% respectivement ($p>0,05$).

L'étude de Bussen *et al.* (1997)(21) a étudié les spermocultures de 88 couples asymptomatiques sans mettre en évidence de différence significative sur les taux de fécondation et de grossesse : le taux de fécondation était de 52% dans le groupe « spermoculture négative » et 45% dans le groupe « spermoculture positive (flore cutanée et microorganismes isolés) » ($p=0,437$). Le taux de fécondation ne variait pas, quel que soit l'importance de l'infection bactérienne. Concernant le taux de grossesse, on avait 11 grossesses pour 42 cycles dans le groupe « négatif » et 7 grossesses pour 46 cycles dans le groupe « positif » ($p=0,456$), avec un nombre d'embryons transférés similaire dans les deux groupes.

3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Nous avons conduit une étude prospective dans le but de répondre à deux questions :

1) Quelle est la pertinence de la réalisation d'une spermoculture systématique de moins d'un an précédent toute tentative de FIV classique ou d'ICSI ? Pour cela nous avons recherché le taux de bactériospermie le jour de la tentative.

2) Quelle est l'impact de la présence de bactéries dans le sperme le jour de la tentative sur les paramètres spermatiques, le taux de fécondation, la qualité embryonnaire et sur l'issue de la tentative ? Nous avons réalisé, par ailleurs, une évaluation de l'efficacité de la technique de préparation du sperme.

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre étude se déroulait en 3 étapes (Annexe 1), et une recherche bactériologique standard était réalisée pour chaque homme inclus :

- sur le sperme frais
- après la préparation du sperme sur gradient
- après la tentative de FIV ou d'ICSI, si le bouillon de culture cœur-cervelle ensemencé par les milieux de culture embryonnaire se troublait.

4.1. Critères d'inclusion

Les couples devant bénéficier d'une FIV classique ou ICSI avec sperme frais du conjoint ont été inclus de janvier à octobre 2015. Les couples dont la tentative est réalisée avec du sperme congelé, des spermatozoïdes testiculaires ou épididymaires et les couples bénéficiant d'un don d'ovocytes ou de spermatozoïdes n'ont pas été inclus. Les patients avec risque viral n'étaient pas inclus. Il n'existait pas de limite d'âge. Cette étude prospective s'est déroulée dans le service biologie de la reproduction – CECOS de l'hôpital Tenon en collaboration avec le service de microbiologie.

Tous les hommes disposaient d'une spermoculture négative (absence de bactérie) ou polymicrobienne (flore cutanée, flore oropharyngée ou flore polymorphe) de moins de 1 an avec recherche de mycoplasmes (*mycoplasma hominis* et *ureaplasma urealyticum*) et de *chlamydia trachomatis* (recherche par PCR) négatives. En cas de spermoculture positive, les patients recevaient un traitement antibiotique adapté au germe isolé et un contrôle était effectué à distance de l'arrêt des antibiotiques.

4.2. Recueil de sperme, prélèvement bactériologique et interprétation

- **Recueil de sperme**

Le recueil était réalisé conformément aux bonnes pratiques en AMP et aux recommandations de la société française de microbiologie (43). Le patient recevait une

information orale et écrite (information affichée dans la salle de recueil) sur les conditions d'hygiène à respecter pour le recueil (Annexe 2).

- **Prélèvements bactériologiques du sperme avant préparation**

Après liquéfaction, 100 µL de sperme était prélevé stérilement pour la bactériologie standard. Le tout était acheminé rapidement au service de microbiologie. Le prélèvement pour la recherche de bactériologie standard était dilué au 1/10ème avec de l'eau distillée stérile pour éliminer le pouvoir bactériostatique du plasma séminal et pour numérer les germes. Une partie de l'échantillon dilué était ensuite ensemencé en râteau sur une gélose au sang en condition aérobie et une gélose chocolat (sang cuit), sous CO2 à 37°C. Il y avait une première lecture à 24h et une seconde à 48h. Au bout de 48h, la culture était négative en l'absence de croissance de micro-organismes.
Concernant l'interprétation des résultats, les seuils de concentration en germes avaient été établis à partir de l'article du Dr Boitrelle (5) (Tableau 3).

Tableau 3. Seuils de pathogénicité des principales bactéries du sperme dans le cadre d'une tentative d'AMP.

Contamination	Présence d'une flore polymorphe (> 3 espèces différentes)
Germes pathogènes de par leur présence	*Chlamydia trachomatis*
	Neisseria gonorrhoeae
Germes pathogènes au seuil de $\geq 10^2$ UFC/mL	*Escherichia coli*
	Proteus mirabilis
	Klebsiella pneumoniae
	Morganella morganii
Au seuil de $\geq 5,10^3$ UFC/mL	*Corynebacterium seminale*
	Streptococcus pyogenes
	Staphylococcus aureus
	Gardnerella vaginalis (seulement si prélèvement vaginal positif associé pour certains)
	Candida albicans
Au seuil de $\geq 10^4$ UFC/mL	*Mycoplasma hominis*
	Ureaplasma urealyticum

- **Prélèvements bactériologiques après préparation du sperme**

Après les prélèvements bactériologiques, le volume d'éjaculat, la mobilité progressive spermatique et la concentration en spermatozoïdes étaient évaluées. Puis le sperme était déposé sur un gradient de densité pour sa préparation. Nous avons préparé des colonnes de gradient à l'aide de PureSperm® dilué avec de l'Universal IVF Medium (ORIGIO®) : 2 fractions, l'une 90% de PureSperm® (1,5mL) et l'autre 45% (1,5mL). Après dépôt du sperme frais et centrifugation de 20 minutes à 300g, le culot de centrifugation était recueilli dans 2mL d'Universal IVF Medium (ORIGIO®), milieu avec gentamicine. Une seconde centrifugation 10mn à 600g était alors réalisée. Après élimination du surnageant, et mise en suspension du culot dans le milieu Universal IVF Medium (ORIGIO®), nous avons obtenu la préparation de spermatozoïdes finale. À partir de la préparation, 100 µL de sperme était prélevé pour la bactériologie standard et envoyé en microbiologie dans un délai rapide. Les seuils de pathogénicité en germes étaient établis à partir de l'article de Boitrelle *et al.* (2012)(5).

4.3. Fécondation *in vitro*

- **Tentative de FIV classique et d'ICSI**

La ponction ovarienne était réalisée au bloc opératoire, par voie transvaginale sous échoguidage. Les liquides folliculaires étaient observés sous loupe binoculaire, et les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) recueillis. Pour la FIV classique, les CCO étaient mis en contact avec le sperme préparé (la préparation contenait environ 100000 spermatozoïdes mobiles progressifs pour 4 CCO). Pour l'ICSI, l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans l'ovocyte décoronisé est réalisée. Les signes de fécondation étaient observés à J1, avec l'apparition de 2 pronuclei (PN). Les embryons étaient cultivés sous huile dans un milieu ISM1™ culture medium (ORIGIO®) dans une étuve à 5,5% de CO2 et à 36,5°C jusqu'au troisième jour de développement (J3) ; le milieu ISM1™ culture medium (ORIGIO®) contient de la gentamicine. L'évaluation de la qualité embryonnaire était appréciée à J2 et J3 par le nombre de blastomères, la symétrie de clivage (typique, atypique)

et le pourcentage d'occupation du volume embryonnaire par des fragments. Étaient considérés comme TOP embryon ceux qui étaient annotés 4Ta à J2 (4 blastomères, typique, <10% de fragments au deuxième jour de leur évolution) (Annexe 3).
Après observation et sélection des embryons à transférer, le transfert d'un ou deux embryons était réalisé. Un dosage d'hCG était réalisé environ 2 semaines après la ponction et renouvelé en cas de positivité. Une échographie était alors programmée quelques semaines plus tard.

- **Bactériologie des milieux de culture embryonnaire**

Après transfert des embryons, arrêt de culture des embryons, congélation ou passage en culture longue, les milieux ISM1 étaient ensemencés dans des bouillons cœur-cervelle de bœuf. Chaque goutte d'ISM1 avait un volume entre 20 et 30 µL, donc le volume d'ISM1 variait en fonction du nombre d'embryon. Une dilution maximum au 1/100ème des milieux ISM1 devait être respectée pour la détection de bactéries (notion de seuil de sensibilité) ; en cas de volume insuffisant de milieu ISM1 (<100 µL), le volume du bouillon était ajusté.
Le bouillon cœur-cervelle était ensuite mis à l'étuve pendant 5 jours, à 36,5°C. Si le bouillon se troublait, l'étude bactériologique était effectuée au laboratoire de microbiologie.

4.4. Analyse des données

- **Définition des paramètres étudiés**

Le taux de fécondation est calculé par le rapport du nombre total de zygotes avec 2 pronuclei rapporté au nombre total d'ovocytes matures à J0 pour l'ICSI et à J1 pour la FIV classique.
Le taux de TOP embryons à J2 correspond à la somme des embryons 4Ta (4 blastomères, typique, <10% de fragments) sur la somme de tous les embryons obtenus.

Le taux de grossesse débutante par ponction (ou par transfert) correspond au nombre de grossesse avec hCG supérieur à 100 mUI/mL sur le nombre de ponctions (ou de transferts).
Le taux de grossesse évolutive correspond au nombre de grossesses dont le terme est supérieur ou égal à 12 semaines d'aménorrhées sur le nombre de ponctions.

- **Analyses statistiques**

Dans un premier temps, une analyse univariée a été réalisée comparant les 7 variables suivantes: qualité du sperme (numération et mobilité progressive), taux de fécondation, qualité embryonnaire, taux de grossesse débutante par ponction, taux de grossesse débutante par transfert et taux de grossesse évolutive, pour les 4 modalités de la variable microbiologie (négatif, flore, germe isolé en-dessous du seuil de pathogénicité, germe isolé au-dessus du seuil de pathogénicité). Une comparaison globale a été réalisée par ANOVA pour les variables quantitatives et test du chi2 pour les variables qualitatives.
Une analyse univariée similaire a été réalisée sur les 2 sous-groupes d'AMP, ICSI et FIV. Le groupe mi FIV- mi ICSI ne disposant pas de l'effectif requis, l'analyse n'a pas été réalisée pour ce sous-groupe (n=28).

Pour l'analyse globale, la variable microbiologie a été binarisée entre cultures négatives et cultures positives (flore, germe en-dessous du seuil de pathogénicité, germe au-dessus du seuil de pathogénicité). L'analyse a été réalisée en cas complets, les individus présentant une valeur manquante pour l'une des variables inclus dans le modèle étant exclus. Le seuil de significativité était de 0.05.

5. RÉSULTATS

5.1. Description des patients

L'étude a inclus 404 couples de janvier à octobre 2015; 184 couples ont été pris en charge en FIV classique, 192 en ICSI et 28 en moitié FIV-moitié ICSI. L'âge moyen des femmes était de 34,7 ans (+/- 4,1).

5.2. Prévalence des bactéries dans le sperme avant préparation

5.2.1. Prévalence des spermocultures positives et négatives

Quatre cent quatre spermocultures ont été réalisées sur le sperme avant préparation.

Nous avons distingué 4 groupes en fonction des résultats de la spermoculture : 35% (n=140) des spermocultures étaient négatives (groupe 1), 48% (n=194) étaient contaminées par la flore (cutanée, oropharyngée ou polymorphe) (groupe 2), 4% (n=18) étaient positives à un germe isolé en-dessous du seuil de pathogénicité (groupe 3), et 13% (n=52) étaient positives à un germe isolé au-dessus du seuil de pathogénicité (groupe 4). Au total, 65 % des cultures étaient positives (groupes 2 à 4) (Figure 1).
On retrouve une répartition homogène des effectifs en FIV classique, ICSI ou mi FIV–mi ICSI en fonctions des 4 groupes mis en valeurs (Tableau 4)

Pour les spermocultures polymicrobiennes (flore cutanée, flore oropharyngée et flore polymorphe), la concentration bactérienne était comprise entre 10^3 et ≥ 10^4 UFC/mL.
Pour les spermocultures monomicrobiennes, la numération de germe était comprise entre 10^2 et ≥ 10^4 UFC/mL. Les principales bactéries isolées étaient les streptocoques (35%), les entérobactéries (34%) et les entérocoques (10%) (Figure 2).

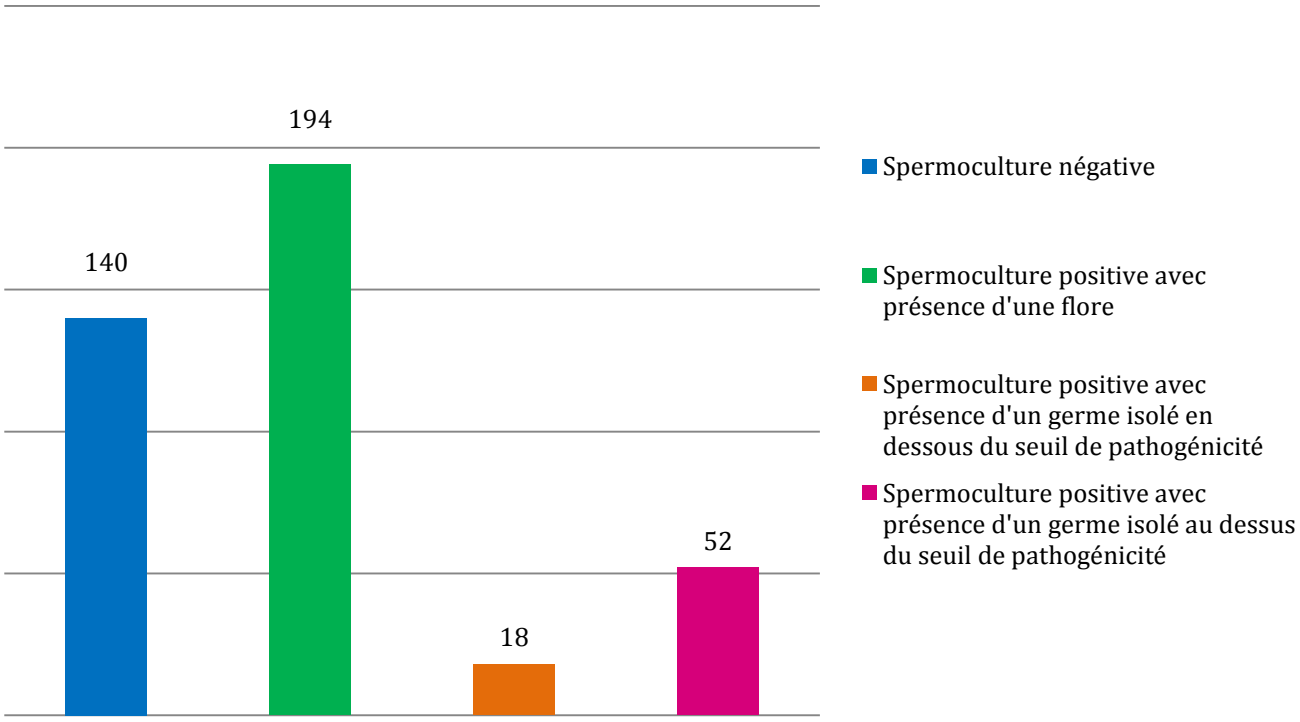


Figure 1. Résultats des bactériospermies avant préparation du sperme.

Tableau 4. Effectifs des groupes.

FIV classique + ICSI + mi FIV- mi ICSI	Spermoculture négative (groupe 1)	Flore (groupe 2)	Germe en-dessous du seuil de pathogénicité (groupe 3)	Germe au-dessus du seuil de pathogénicité (groupe 4)
Effectif	140	194	18	52
FIV classique	63	89	10	22
ICSI	66	98	5	23
Moitié FIV classique-moitié ICSI	11	7	3	7

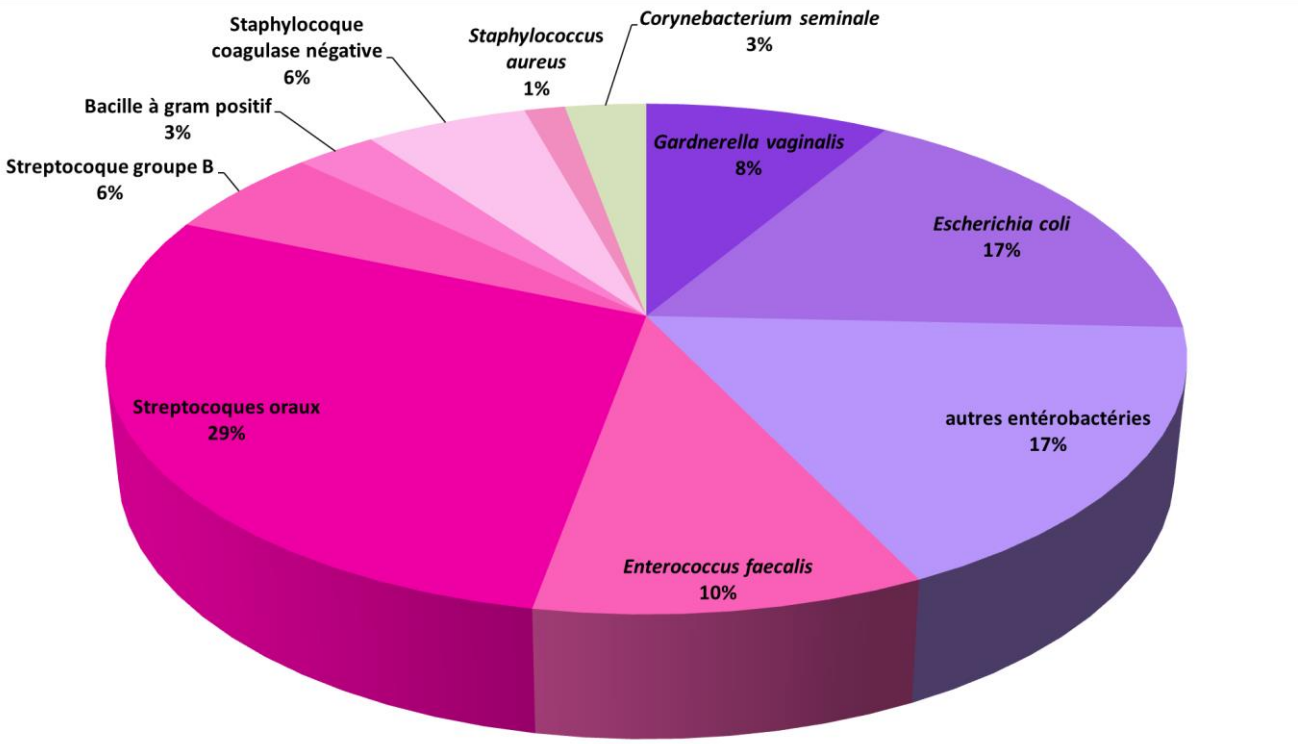


Figure 2. Distribution des espèces bactériennes avant migration sur gradient (n=70)

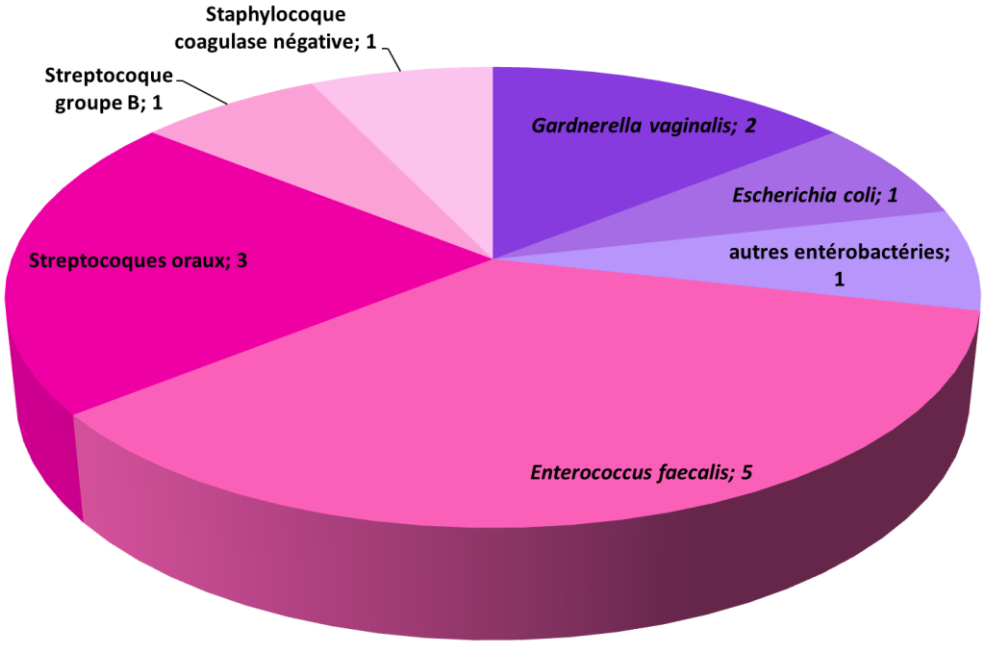


Figure 3. Distribution des espèces bactériennes après migration sur gradient (n=14)

5.2.2. Comparaison des caractéristiques des 4 groupes

L'âge moyen des femmes pris en charge était de 34,7 ans ± 4,1, et leur IMC moyen (kg/m²) de 24,4 ± 4,3. Pour les hommes, l'IMC moyen était de 25,6 ± 3,8.

On retrouve dans notre population, 139 femmes (35%) dont l'IMC est supérieur à 25 kg/m², dont 49 (12%) supérieur à 30 kg/m². Chez les hommes, 174 patients (53%) avaient un IMC supérieur à 25 kg/m², dont 45 (14%) supérieur à 30 kg/m².

Dans 80% des cas les femmes n'ont jamais fumé (320 femmes non-fumeuses sur 404) et 15% fument actuellement (61 femmes fumeuses sur 404). Chez les hommes, 62% n'ont jamais fumé (224 non-fumeurs sur 359) et 28% fument au moment de la prise en charge (99 fumeurs sur 359). On retrouve 39 couples (11%) pris en charge dont les deux partenaires fument au moment de la tentative.

Les 4 groupes étaient comparables en termes d'âge des femmes, d'IMC femme et homme, et de rang de la tentative d'AMP (Tableau 5).

Tableau 5 Caractéristiques des groupes**.** (Données exprimées en moyenne +/- Écart type et effectif)

FIV classique + ICSI + mi FIV-mi ICSI	**groupe 1**	**groupe 2**	**groupe 3**	**groupe 4**	***p***
Age Femme	34,4 ± 4,3	34,8 ± 4,2	35,1 ± 4,2	35,4 ± 3,5	NS
IMC Femme	24,5 ± 4,7	24,1 ± 4,1	24,6 ± 4,4	23,3 ± 3,5	NS
IMC Homme	25,6 ± 3,9	25,8 ± 4,0	24,0 ± 4,3	25,5 ± 3,3	NS
Rang de la tentative	1,7 ± 1,0	1,7 ± 1,0	1,8 ± 1,2	1,8 ± 1,2	NS

5.2.3. Comparaison des résultats des tentatives

- **FIV classique, ICSI et mi FIV- mi ICSI**

Nous avons réalisé une première analyse en comparant les 4 groupes de spermoculture pour l'ensemble des patients pris en charge (FIV classique et ICSI). Pour les différentes variables étudiées (paramètres spermatiques, taux de fécondation, qualité embryonnaire, taux de grossesse débutante par ponction, taux de grossesse débutante par transfert et taux de grossesse évolutive) nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les patients avec une spermoculture négative (groupe 1), ceux avec une spermoculture avec une flore (groupe 2), ceux avec présence d'un germe isolé en-dessous du seuil de pathogénicité (groupe 3) et ceux avec un germe isolé au-dessus du seuil de pathogénicité groupe 4). Le taux de fécondation pour le groupe 1 est de 65% tandis que pour le groupe 4 il est de 62% ; pour le taux de grossesse débutante par transfert on obtient 34,1% et 30,2% respectivement. (Tableau 6)

Nous avons ensuite regroupé les patients avec une spermoculture positive (groupe 2, 3 et 4) pour les comparer avec les patients qui avaient une spermoculture négative (groupe 1) sur les différentes variables déjà étudiées (Tableau 7). Aucune différence significative n'a été retrouvée dans cette analyse. En effet, le taux de fécondation pour le groupe 1 est de 65% et 67% pour le groupe de culture positive ; le taux de grossesse débutante par transfert est de 34,1% pour le groupe de culture négative et de 31,3% pour celui de culture positive. On remarque cependant une petite diminution en absolue du taux de grossesse évolutive entre les spermocultures négatives et celles positives : 25% et 18,6% respectivement, mais les résultats ne sont pas significatifs (p 0,35).

Tableau 6. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients de FIV classique, d'ICSI et de mi FIV- mi ICSI. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests globaux entre les 4 groupes)

FIV classique, ICSI et mi FIV- mi ICSI	groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4	*p*
Effectifs	140	194	18	52	
Qualité sperme: numeration moyenne (10^6/mL)	44,8 ± 42,1	50,0 ± 47,4	43,8 ± 39,5	35,4 ± 32,5	NS
Qualité sperme: mobilité moyenne (%)	39,4 ± 16,2	39,2 ± 17,2	37,8 ± 15,6	38,4 ± 15,9	NS
Taux moyen de fécondation (%)	65 ± 25	68 ± 28	69 ± 29	62 ± 29	NS
Qualité embryonnaire moyenne (Taux de TOP embryon à J2) (%)	15 ± 27	14 ± 23	9 ± 14	16 ± 22	NS
Taux de grossesse débutante par ponction (%)	32,4 (n=45)	27,8 (n=54)	27,8 (n=5)	25,0 (n=13)	NS
Taux de grossesse débutante par transfert (%)	34,1 (n=45)	31,8 (n=54)	29,4 (n=5)	30,2 (n=13)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	25,0 (n=35)	17,5 (n=34)	22,2 (n=4)	21,2 (n=11)	0,26

Tableau 7. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients de FIV classique, d'ICSI et de mi FIV- mi ICSI. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests entre les 2 groupes).

FIV classique + ICSI + mi FIV- mi ICSI	Culture négative (Groupe 1)	Culture positive (Groupe 2, 3 et 4)	*p*
Effectifs	140	264	
Qualité sperme: numeration moyenne (10^6/mL)	44,8 ± 42,1	46,7 ± 44,5	NS
Qualité sperme: mobilité moyenne (%)	39,4 ± 16,1	38,9 ± 16,8	NS
Taux moyen de fécondation (%)	65 ± 25	67 ± 28	NS
Qualité embryonnaire moyenne (Taux de TOP embryon à J2) (%)	15 ± 27	14 ± 22	NS
Taux de grossesse débutante par ponction (%)	32,4 (n=45)	27,3 (n=72)	NS
Taux de grossesse débutante par transfert (%)	34,1 (n=45)	31,3 (n=72)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	25,0 (n=35)	18,6 (n=49)	NS

- **FIV classique**

Nous avons analysé les données séparément des tentatives de FIV classique et d'ICSI et exclu l'analyse des mi FIV- mi ICSI.

En FIV classique, les paramètres spermatiques, le taux de fécondation, le pourcentage de TOP embryon, les taux de grossesse débutante par ponction ou par transfert et le taux de grossesse évolutive ne sont pas significativement différents quand on compare les 4 groupes de spermocultures (

Tableau **8**).

Le taux de fécondation est de 65% pour le groupe 1, 73% pour le groupe 2, 69% pour le groupe 3 et 67% pour le groupe 4 ; on ne retrouve pas de différence significative. Cependant, même si les résultats ne sont pas significatifs, on note une diminution importante du taux de grossesse débutante par ponction et par transfert entre les groupes et du taux de grossesse évolutive. Pour le taux de grossesse débutante par ponction, on obtient 23 grossesses dans le groupe 1 (soit 36,5%), 25 grossesses dans le groupe 2 (28,1%), 2 grossesses dans le groupe 3 (20%) et 3 grossesses dans le groupe 4 (soit 13,6%).

La comparaison entre 2 groupes : les groupes « culture négative » et « culture positive » en FIV classique, permet d'observer dans nos résultats des différences significatives.
En effet on retrouve un résultat significatif pour le taux de grossesse évolutive. Il y a eu 20 grossesses évolutives dans le groupe dont la spermoculture était négative (31,7%) et 21 grossesses se sont poursuivies au dela du premier trimestre de grossesse dans le groupe avec une spermoculture positive (groupes 2, 3 et 4) (17,4%) (p 0,02). Il y a eu 9 fausses couches à moins de 12 semaines d'aménorrhées dans le groupe des spermocultures positives.
Il existe aussi un résultat significatif pour la qualité embryonnaire, mais pas dans le sens attendu : le taux de TOP embryon à J2 chez les patients avec une spermoculture négative est de 9% alors qu'il est de 13% dans le groupe de culture positive (p 0,03). Ces résultats se retrouvent aussi pour les taux de fécondation : 65% et 71% respectivement, mais ne sont pas significatifs (p 0,07) (Tableau 9).

Tableau 8. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients de FIV classique. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests globaux entre les 4 groupes)

FIV classique	groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4	*p*
Effectifs	63	89	10	22	
Numération (10^6/mL)	65,8 ± 46,0	72,1 ± 49,5	58,1 ± 42,0	49,7 ± 32,1	0,18
Mobilité progressive (%)	49,4 ± 11,9	48,4 ± 13,1	46,0 ± 12,0	45,7 ± 12,3	NS
Taux moyen de fécondation (%)	65 ± 25	73 ± 23	69 ± 37	67 ± 32	NS
Qualité embryonnaire moyenne (%)	9 ± 21	14 ± 20	6 ± 10	14 ± 20	NS
Taux de grossesse débutante par ponction (%)	36,5 (n=23)	28,1 (n=25)	20,0 (n=2)	13,6 (n=3)	NS
Taux de grossesse débutante par transfert (%)	37,1 (n=23)	30,9 (n=25)	22,2 (n=2)	17,7 (n=3)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	31,7 (n=20)	19,1 (n=17)	10 (n=1)	13,6 (n=3)	NS

Tableau 9. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients de FIV classique. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests entre les 2 groupes).

FIV classique	Culture négative	Culture positive	*p*
Effectifs	63	121	
Numération (10^6/mL)	65,8 ± 46,0	66,9 ± 46,8	NS
Mobilité progressive (%)	49,4 ± 11,9	47,7 ± 12,8	NS
Taux moyen de fécondation (%)	65 ± 25	71 ± 26	0,07
Qualité embryonnaire moyenne (%)	9 ± 21	13 ± 20	0,03
Taux de grossesse débutante par ponction (%)	36,5 (n=23)	24,8 (n=30)	NS
Taux de grossesse débutante par transfert (%)	37,1 (n=23)	28,0 (n=30)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	31,7 (n=20)	17,4 (n=21)	**0,02**

- **ICSI**

En ICSI, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 4 groupes de spermocultures (Tableau 10), ni dans la comparaison entre les cultures négatives et les cultures positives (Tableau 11).

Tableau 10. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction des 4 groupes de spermoculture définis pour les patients d'ICSI. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests globaux entre les 4 groupes).

ICSI	groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4	*p*
Effectifs	66	98	5	23	
Numération (10^6/mL)	23,5 ± 28,0	29,4 ± 35,2	14,5 ± 18,0	16,3 ± 17,1	NS
Mobilité progressive (%)	28,9 ± 14,3	30,2 ± 16,3	21,0 ± 12,5	25,9 ± 10,4	NS
Taux moyen de fécondation (%)	64 ± 24	64 ± 31	73 ± 20	54 ± 28	NS
Qualité embryonnaire moyenne (%)	20 ± 31	15 ± 25	8 ± 18	15 ± 24	NS
Taux de grossesse débutante par ponction (%)	24,6 (n=16)	25,5 (n=25)	40,0 (n=2)	34,8 (n=8)	NS
Taux de grossesse débutante par transfert (%)	26,7 (n=16)	30,1 (n=25)	40,0 (n=2)	40,0 (n=8)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	18,1 (n=12)	15,3 (n=15)	40,0 (n=2)	30,0 (n=7)	NS

Tableau 11. Comparaison des paramètres spermatiques, taux de fécondation, taux de TOP embryon, taux de grossesse débutante (ponction/transfert) et taux de grossesse évolutive en fonction de deux groupes (spermoculture positive et spermoculture négative) pour les patients d'ICSI. (Analyse univariée ; *p* correspond aux tests entre les 2 groupes).

ICSI	Culture négative	Culture positive	*p*
Effectifs	66	126	
Numération (10^6/mL)	23,5 ± 28,0	26,3 ± 32,4	NS
Mobilité progressive (%)	28,9 ± 14,3	29,1 ± 15,3	NS
Taux moyen de fécondation (%)	64 ± 24	63 ± 31	NS
Qualité embryonnaire moyenne (%)	20 ± 31	15 ± 25	NS
Taux de grossesse par ponction (%)	24,6 (n=16)	27,8 (n=35)	NS
Taux de grossesse par transfert (%)	26,7 (n=16)	32,4 (n=35)	NS
Taux de grossesse évolutive par transfert (%)	18,1 (n=12)	19,0 (n=24)	NS

L'analyse multivariée partielle (réalisée sur 314 patients) n'a pas montré de résultats significatifs : les taux de fécondation, le pourcentage de TOP embryon, les taux de grossesse débutante par ponction ou par transfert et les paramètres spermatiques n'étaient pas significativement différents.

On a comparé aussi les groupes 2 à 2 de manière systématique pour le taux de fécondation et la qualité embryonnaire mais aucun résultat significatif ; les groupes spermoculture négatives et flore ont été comparés aux groupes présence de germe en-dessous et au-dessus du seuil de pathogénicité mais aucun résultat n'était significatif.

5.3. Prévalence des bactéries dans le sperme après préparation

Après préparation du sperme, on observe une diminution du nombre de cultures positives. En effet, sur les 360 cultures de sperme migré réalisées, 52 ont une culture positive polymicrobienne ou monomicrobienne (groupe 2, 3 et 4) soit 15%, tandis qu'avant la préparation 65% des spermocultures étaient positives. Seulement 14 ont une culture monomicrobienne (groupe 3 et 4) soit 4%, versus 17% avant préparation. On passe donc de 35% de spermocultures négatives avant préparation de sperme à 85% après préparation, d'où l'importance de cette phase d'élimination des germes (Figure 4). Donc une diminution de 77% des cultures positives.
Les bactéries les plus fréquemment retrouvées étaient les *Enterococcus faecalis* (n=5) et les Streptocoques *sp.* (n=4) (Figure 3).

Parmi les cultures positives monomicrobiennes après préparation, certaines avaient une spermoculture négative ou positive polymorphe avant préparation. Sur les 132 spermocultures négatives avant préparation, 124 cultures restent négatives après préparation, et 8 cultures deviennent positives : 6 cultures polymicrobienne (3 flores polymorphes et 3 flores cutanées), et 2 cultures monomicrobiennes avec un germe isolé en-dessous du seuil de pathogénicité (groupe 3). Les 2 germes retrouvés sont un *Enterococcus faecalis* et un Cocci Gram positif type Streptocoque.
Quatre spermocultures avec une flore polymorphe ou cutanée avant préparation, ont présenté une culture positive monomicrobienne après préparation. On a retrouvé une

Gardnerella vaginalis, un streptocoque β hémolytique, un Cocci Gram positif type Streptocoque et un *Enterococcus faecalis*. Au final, seules 6 spermocultures monomicrobiennes sont restées positives au même germe après préparations (Tableau 12).

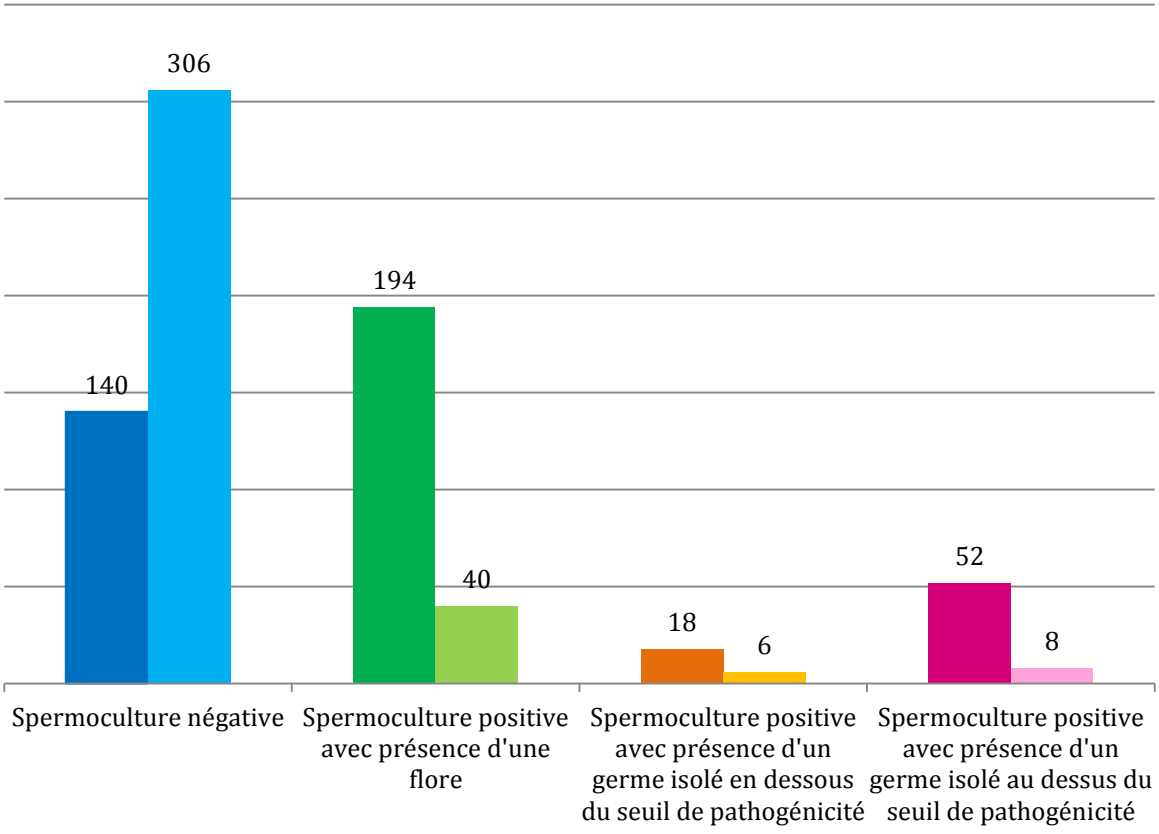


Figure 4. Résultats des bactériospermies avant puis après préparation du sperme

Tableau 12. Résultats des grossesses des spermocultures positives après préparation

Spermoculture avant préparation	Culture après préparation	Grossesse
Négative	*Enterococcus faecalis*	Non
Négative	Cocci gram positif type Streptocoque	Non
Flore polymorphe	*Gardnerella vaginalis*	Non
Flore cutanée	Streptocoque β hémolytique	Non
Flore polymorphe	Cocci gram positif type Streptocoque	**Oui, FCS <12 SA**
Flore polymorphe	*Enterococcus faecalis*	Non
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*	Non
Cocci gram positif type Streptocoque	*Enterococcus faecalis*	Non
Streptocoque du groupe B	Staphylocoque coagulase négative	**Oui, grossesse évolutive**
Escherichia coli	*Escherichia coli*	Non, pas de transfert
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*	Non
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*	Non
Streptococcus oralis	*Streptococcus oralis*	Non
Gardnerella vaginalis	*Gardnerella vaginalis*	**Oui, grossesse évolutive**

5.4. Résultats des milieux de culture embryonnaire

Nous n'avons pas retrouvé de bactéries sur aucun des 378 milieux de culture embryonnaire étudiés.

6. DISCUSSION

Nous avons obtenu une prévalence de 65% de spermocultures positives (groupes 2, 3 et 4) le jour de la tentative. Après préparation du sperme, seulement 15% des cultures bactériennes étaient positives, et nous n'avons détecté dans aucun des milieux de culture embryonnaire la présence de bactéries.

Chez les patients pris en charge en AMP (FIV classique, ICSI et miFIV-miICSI), les spermocultures positives n'avaient pas d'impact sur les paramètres spermatiques, le taux de fécondation et les taux de grossesses. En revanche, uniquement pour les tentatives en FIV classique, il existait un impact sur le taux de grossesse évolutive lorsque l'on retrouvait une bactérie dans le sperme. Aucun impact n'a été observé lors de la prise en charge en ICSI.

Conditions de recueil de sperme et prévalence des bacteriospermies

- **Conditions de recueil du sperme et prévalence des bactéries dans le sperme**

La spermoculture est un examen bactériologique nécessitant un prélèvement par masturbation qui doit être réalisé de la façon la plus stérile possible afin de limiter les contaminations lors du recueil et ses conséquences sur la tentative de FIV.

L'étude de Kim & Goldstein (1999)(44) montre que l'utilisation d'antibactérien pour nettoyer la peau du gland avant le recueil de sperme, peut permettre de diminuer d'au moins 50% les spermocultures faussement positives. Chaque patient (n=14) était son propre témoin et a réalisé 2 recueils, avec et sans utilisation d'antibactérien. Dans le groupe sans antibactérien, les 14 spermocultures étaient positives (11 ont présenté de la flore cutanée et 7 un germe dit pathogène (Enterococcus *faecalis* et *E.coli*)), tandis que dans le groupe qui a utilisé l'antibactérien seulement 10 spermocultures étaient positives (6 ont montré de la flore cutanée et 4 un germe dit pathogène).

L'étude de Krissi *et al.* (2004) (38) a évalué l'importance des consignes d'asepsies le jour de la ponction ovarienne de couples pris en charges en FIV classique et en ICSI. Avant le recueil, 41 hommes ont reçu des informations sur les conditions de recueil du sperme et les 52 autres hommes n'ont reçu aucune information. Trente-neuf pourcent des

prélèvements étaient positifs dans le groupe informé et 94% dans le groupe non informé et une majorité de ces micro-organismes étaient des germes issus de la flore cutanée.
Dans notre étude, nous avons observé que 65% des spermocultures étaient positives le jour de la tentative d'AMP (48% de flore et 17% de cultures monomicrobiennes), et ce malgré une information orale et écrite systématique sur les conditions du recueil ainsi que le lavage des mains associé à l'utilisation d'un antibactérien. La prévalence de la flore cutanée, oropharyngée ou polymorphe restait importante, or les patients avaient reçu au moins à deux reprises les informations liées au recueil car ils devaient systématiquement réaliser un recueil à l'hôpital Tenon avant leur prise en charge en FIV, au moment du diagnostic d'infertilité.

La prévalence des bactériospermies varie de 15 à 92,3% dans la littérature (Tableau 1) et peut être expliquée par des seuils de pathogénicité et une définition de micro-organismes pathogènes différents en fonction des équipes. Ce seuil de pathogénicité varie de « présence d'un germe quel que soit le seuil »(18), à « ≥ 10^3 »(12,14–16), à « ≥ 10^4 »(9), à « ≥ 10^5 »(6) et à « variable en fonction du germe » (13). La notion de germe pathogène est elle aussi différente en fonction des études ; Stoval *et al.* (1993)(8) a une prévalence de 80,7% de bactéries présentes dans le sperme, et comptabilise ¾ de flore cutanée, tandis que Virecoulon *et al.* (2005)(10), sépare les germes isolés et les germes issus de la flore et obtient donc une prévalence de 22% de spermocultures positives.
Ainsi, la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature est rendue difficile. Toutefois, on retrouve les mêmes espèces bactériennes avec une forte présence de streptocoques, d'entérobactéries, et de staphylocoques.

- **Flore bactérienne**

Dans cette étude, nous avons décidé de ne pas considérer comme « négatif » les spermocultures présentant une flore, et ceux afin de mesurer leur impact sur la tentative d'AMP et d'évaluer nos pratiques. On peut supposer qu'une flore avec un seuil de détection ≥ 10^4 CFU/mL, pourrait cacher une bactérie pathogène.
De Francesco *et al.* (2011) a montré un impact de la flore sur les paramètres spermatiques. Deux cents huit patients (28%) avaient une spermoculture avec une flore

polymicrobienne sur 732 spermes étudiés ; ils étaient comparés à un groupe contrôle aux paramètres spermatiques normaux (25). Une diminution de la numération spermatique, de la mobilité progressive et de la morphologie des spermatozoïdes a été mise en évidence en présence d'une flore (p<0,01).

Selon Liversedge *et al.* (1996)(28), la flore cutanée n'a aucun impact sur le taux de fécondation. Sur les 90 patients inclus, 14 spermocultures avaient une flore cutanée, 66 une spermoculture dite négative (absence de bactéries ou seuil non significatif) et 10 un germe potentiellement pathogène. Le taux de fécondation était de 60%, 55% et 60% respectivement (p NS).

Nous n'avons pas montré de différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 dans notre étude, même si on notait une diminution des différents paramètres étudiés pour le groupe 2 proche de celle des groupes 3 et 4. Le taux de grossesse débutante par ponction est de 32,4% dans le groupe 1, 27,8% dans le groupe 2, 27,8% dans le groupe 3 et 25,0% dans le groupe 4 (p NS). Devant ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que la flore joue un rôle sur les paramètres de l'AMP.

Dans une analyse secondaire partielle, réalisée sur 314 patients, nous avons cherché à savoir s'il était important de mettre en place un seuil de pathogénicité pour les spermocultures positives avec présence d'une flore. Aucune différence significative n'a été montrée avec les seuils ≥ 10^4 CFU/mL.

Préparation du sperme et milieu de culture embryonnaire

- **Elimination des germes par la préparation sur gradient de densité**

Les équipes de Cottell *et al.* (1997) (6), d'Abeysundara *et al.* (2013) (18) et de Dissanayake *et al.* (2014) (19) ont montré que la technique de préparation du sperme par gradient de densité associée à une supplémentation en antibiotiques du milieu de lavage du sperme jouait un rôle important dans l'élimination des bactéries présentes dans le sperme. Cependant la préparation du sperme n'était pas toujours efficace pour éliminer la totalité des micro-organismes présents dans le sperme et il existe alors un risque de contamination du milieu de culture. Il reste 5% de micro-organismes après préparation de sperme chez Cottel *et al.* (1997) et 36% chez Abeysundara *et al.* (2013).

Dans notre étude, il ne reste que 15% des cultures après préparation du sperme qui sont positives (groupe 2, 3 et 4).

Devant cette diminution du nombre de cultures positives après préparation, deux hypothèses s'offrent à nous : soit l'association du gradient de densité et de la gentamycine permet l'élimination des bactéries, soit le seuil de détection de celles-ci est trop haut.
Pour l'analyse bactériologique, le sperme frais et le sperme après préparation étaient ensemencés dans des milieux gélosés pour la détection des germes aérobies. Le seuil de sensibilité des géloses utilisées pour la détection des bactéries après préparation n'étaient peut-être pas suffisant contenu de la dilution du sperme.
Un bouillon cœur-cervelle a été utilisé pour 28 spermes et nous avons obtenu seulement 40 % de cultures négatives. Sur les géloses standards, 85 % des cultures étaient négatives après préparation. L'utilisation du bouillon cœur-cervelle, semble plus sensible pour les spermes préparés, et permet de détecter une quantité plus faible de bactéries.

- **Bactéries retrouvées après préparation**

Parmi les bactéries isolées après préparation, on a retrouvé 5 *Enterococcus faecalis*, 3 Streptocoque oraux et 1 Streptocoque β hémolytique, soit 64% des germes isolés. On suppose qu'ils n'ont pas été éliminés car il existe une résistance de bas niveau avec la gentamicine (45). Par contre, il n'y a pas de raison pour que l'*E.coli* et le *Proteus mirabilis* n'aient pas été éliminés par la gentamicine, tous deux étaient sensibles. En effet la concentration de gentamicine dans les milieux de préparation et de culture embryonnaire est de 10 mg/L, et la Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'*E.coli* et du *Proteus mirabilis* est de 0,5mg/L (cible) (45).
Seulement 3 grossesses ont été observées chez les patients présentant une bactérie isolée post-préparation (n=14) : 1 chez le couple présentant une *Gardneralla vaginalis*, 1 chez le couple présentant un Staphylocoque coagulase négative et 1 chez le couple présentant un Cocci gram positif type Streptocoque (Tableau 12).
Chez le couple présentant un *E.coli*, il n'y a pas eu de transfert. Le jour de la tentative d'ICSI, 4 ovocytes ont été ponctionnés (3 matures et 1 vésicule germinale). Trois

ovocytes ont été injectés ; le lendemain, il y avait 1 ovocyte atrétique et 2 zygotes avec 3 *Pronuclei*. Les paramètres spermatiques étaient comparables aux précédents spermogrammes concernant la numération ; en revanche il y avait une légère diminution de la mobilité progressive (25% et 35% sur les spermogrammes de moins d'un an avec une spermoculture négative et 15% le jour de la ponction). L'*E.coli* était peut être responsable d'une diminution de la mobilité progressive mais pas de l'échec de transfert.

Pour 2 couples, nous avons retrouvé une bactérie isolée après préparation du sperme alors que la spermoculture sur sperme frais était négative. Nous avons retrouvé un *Enterococcus faecalis* et un Cocci gram positif type Streptocoque. Pour l'*Enterococcus faecalis*, le prélèvement de sperme après préparation a été envoyé en bactériologie à 16h alors qu'il a été techniqué le matin. Entre la technique et l'envoi en bactériologie le prélèvement est resté dans une étuve à 36,5°C. On se pose la question si entre temps une bactérie qui n'était pas détectable se serait multipliée. Pour le Cocci gram positif type Streptocoque, la culture était négative à 24h mais à 48h il y avait une seule colonie de Streptocoque, ce qui s'explique probablement par une contamination lors de la lecture à 24h.

Dans ce travail et dans notre pratique quotidienne, seules les bactéries aérobies sont recherchées, or les germes anaérobies peuvent être présent dans le sperme. Ceci est la conséquence de recommandations imprécises sur la prise en charge d'une spermoculture et sur les germes à rechercher. Il serait intéressant d'étudier dans un premier temps la prévalence de ces bactéries anaérobies dans le sperme, puis d'évaluer leurs conséquences sur l'issue de la tentative d'AMP. Dans l'étude de Damirayakhian *et al* (2006)(46), 27% des spermocultures positives avaient des germes anaérobies.

- **Contamination de milieu de culture**

Dans l'étude de Cottel *et al.* (1996) (36), 0,35% des milieux de cultures embryonnaires étaient contaminés (6 cas sur 1691 ponctions) ; Krissi *et al.* (2004) (38), 4,3% des milieux étaient contaminés (4 cas sur 93 cycles de FIV) et Kastrop *et al.* (2007) (39), 0.86% des tentatives de FIV classique étaient contaminés (95 milieux de cultures embryonnaire sur 11 051 cycles). Dans ces 3 études les milieux utilisés pour la

préparation du sperme et la culture embryonnaire contenaient des antibiotiques : pénicilline et streptomycine. Cependant, il existe de nombreuses résistances connues à la pénicilline et à la streptomycine (45) et les germes retrouvés dans l'étude de Katrop *et al.* (39) étaient dans 91% des cas résistants à au moins l'un des deux antibiotiques.
Dans notre étude, 15% des cultures restaient positives (groupes 2, 3 et 4) après préparation du sperme. Il existait donc un risque résiduel de contamination des milieux de cultures embryonnaire, or aucune bactérie n'a été isolée dans nos milieux de culture embryonnaire (n=378). Contrairement aux études présentées, nous avons utilisé des milieux de préparation du sperme et de culture embryonnaire supplémentés avec de la gentamycine. Il est également possible que l'effectif de notre étude soit trop faible pour détecter des contaminations, car l'étude réalisée par Kastrop *et al*. a inclus 11 051 cycles et celle de Cottel *et al.* (1996) (36) 1691 ponctions, alors que notre étude n'a été réalisée qu'avec 404 ponctions.

Impact de la bactériospermie sur les paramètres spermatiques, le taux de fécondation, la qualité embryonnaire et l'issue de la tentative

- **Paramètres spermatiques *in vivo* - *in vitro***

<u>In vivo</u>

L'examen de la littérature montre un impact de la bactériospermie sur les paramètres spermatiques : la concentration ou numération spermatique et la mobilité sont diminuées de façon significative((11)(13)(15)).
Dans notre étude, il n'existait pas d'impact des bactéries retrouvées sur les paramètres spermatiques. En effet, en comparant les 4 groupes de spermocultures identifiés ou en comparant les spermocultures négatives avec celles qui sont positives (groupes 2, 3 et 4), aucun résultat significatif n'a été montré pour l'ensemble des couples pris en charge en FIV classique et en ICSI (Tableau 6Tableau 7).
L'analyse en sous-groupe pour les patients de FIV classique et ceux d'ICSI permettait de séparer les patients dont l'indication était une ICSI, et rechercher une sous-estimation

de l'altération des paramètres spermatiques en présence d'une bactérie chez les patients en FIV classique. Nous n'avons pas non plus retrouvé de différences significatives dans l'analyse en sous-groupe.

<u>In vitro :</u>

Les études *in vitro* montrent une altération des paramètres spermatiques en présence d'une bactérie isolée. Berktas *et al.* (2008) (22) montrait qu'en présence de concentrations bactériennes de $2x10^5$, $2x10^6$ et $2x10^7$ CFU/mL pour *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli,* il existait une diminution de la numération et de la mobilité progressive des spermatozoïdes. Boguen *et al.* (2015) et Fraczek *et al.* (2014) (23,24), montraient les mêmes résultats pour l'*E.coli* à différentes concentrations (> $3x10^5$ CFU/mL). Cependant ces études sont réalisées sur des spermes dont les paramètres spermatiques sont normaux (25) et ils utilisaient des concentrations bactériennes supérieures à celles observées dans notre pratique quotidienne. Il est difficile de pouvoir comparer ces résultats avec notre étude, les concentrations d'*E.coli* retrouvées étant entre 10^2 CFU/mL (n=4) et supérieure à 10^4 CFU/mL (n=2).
Contrairement aux études *in vitro*, nous n'étudions pas spécifiquement l'impact d'une espèce bactérienne isolée sur les paramètres spermatiques en raison d'une faible prévalence des bactériospermies monomorphes (17%). Cette faible prévalence de spermocultures positives dans notre étude peut être expliquée par l'obligation d'avoir une spermoculture négative ou plurimicrobienne de moins de 1 an précédent la tentative de FIV. En cas de spermoculture positive monomicrobienne, selon les critères définis par l'étude menée par l'équipe de Boitrelle *et al.* (5), les patients étaient traités par antibiotiques et une spermoculture de contrôle était demandée jusqu'à négativation avant l'AMP.

- **Paramètres de la FIV classique et de l'ICSI**

Les résultats de notre étude sur l'ensemble de nos patients pris en charge (FIV classique, ICSI et miFIV-miICSI), rejoignent les données publiées concernant l'absence d'impact de la bactériospermie sur le taux de fécondation et la qualité embryonnaire.

Cependant, pour les patients ayant eu une FIV classique, on remarque une amélioration significative de la qualité embryonnaire chez les couples avec une spermoculture positive (groupe 2, 3 et 4). Le taux moyen de TOP embryon au deuxième jour d'évolution est de 9% dans le groupe 1, tandis qu'il est de 13% avec une spermoculture positive (*p* 0,03). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux observés dans la littérature. Cependant cette analyse a été réalisée en mode univariée, alors que probablement le rôle des bactéries dans le sperme n'est pas le seul à avoir un impact sur la tentative. Une analyse multivariée serait judicieuse pour déterminer s'il existe un autre paramètre à prendre en compte.

Concernant l'impact de la bactériospermie sur le taux de grossesse, les études retrouvées étaient contradictoires. L'équipe de Shalika *et al.* (1996)(9), notait une tendance à la diminution des taux de grossesse quand *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ou le streptocoque du groupe D étaient identifiés parmi les 109 (32%) infections monomicrobiennes rapportées. En cas de présence d'*E.coli* le jour du recueil des CCO, le taux de grossesse était de 44% (4 grossesses sur 9 cas), et il était de 60% (3 grossesses sur 5 cas) pour ceux dont *E.coli*, initialement positif, n'avait pas été retrouvé le jour de la ponction. De même pour *Staphylococcus aureus* et le streptocoque groupe D, le taux de grossesse était de 17% (1 grossesse pour 6 cas) quand on retrouvait *Staphylococcus aureus* le jour du recueil des CCO et 40% (2 grossesses sur 5 cas) quand on retrouvait le Streptocoque groupe D. Aucun effet des entérocoques n'avait été retrouvé. Cependant ces résultats n'étaient pas significatifs et concernaient un très faible effectif de patients.
L'équipe de Bussen *et al.* (1997)(21), Liversedge *et al.* (1996)(28) et Cottell *et al.* (2000)(47) n'avaient pas noté d'impact des bactériospermies sur le taux de grossesse.
Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur les taux de grossesse débutante et évolutive entre les 4 groupes de spermocultures étudiés des patients pris en charge en FIV classique, ICSI et miFIV-miICSI (117 grossesses débutantes). Cependant, en FIV classique uniquement, lorsque l'on compare le groupe de spermocultures négatives (groupe 1) avec le groupe de spermocultures positives (groupes 2, 3 et 4), il existe une diminution significative du taux de grossesse évolutive (Tableau 9). On note aussi une tendance à la diminution du taux de grossesse débutante par transfert et par ponction. Cette diminution n'a pas été retrouvée en ICSI, ou lorsque l'effectif total était analysé (FIV classique + ICSI + miFIV-miICSI)(Tableau 7 etTableau

10). On observe un taux de grossesse débutante par ponction en FIV classique de 36,5% dans le groupe de spermoculture négative (groupe 1) et 13,6% pour le groupe avec un germe isolé au-dessus du seuil de pathogénicité (*p* 0,09). Pour les taux de grossesse évolutive : 31,7% de grossesse évolutive dans le groupe avec une spermoculture négative et 17,4% de taux de grossesse pour le groupe avec une spermoculture positive (groupe 2, 3 et 4) (*p* 0,02).

- **Stress oxydatif**

Ces résultats en FIV classique, non retrouvés en ICSI, peuvent suggérer que d'autres facteurs que la présence de bactéries dans le sperme peut être responsable de ces résultats. Le stress oxydatif et la fragmentation de l'ADN ont notamment été décrits comme responsables d'infertilités. La cause la plus connue de la fragmentation de l'ADN est l'augmentation des radicaux libres oxygénés (ROS) qui entraine un déséquilibre de la balance pro-oxydants et anti-oxydants ; ce déséquilibre est responsable du stress oxydatif (48). Le spermatozoïde produit lui-même une partie des ROS (49), car les ROS ont des fonctions essentielles dont un rôle dans la capacitation. Selon Domes *et al.* (2012) et Moskovtsev *et al.* (2010)(16,50), les patients avec une bactériospermie le jour de la tentative ont un taux de fragmentation de l'ADN qui est significativement plus élevé; Giwercman *et al*. (2010)(51) montrent qu'un haut niveau de fragmentation de l'ADN serait un indicateur d'infertilité masculine. Un index de fragmentation de l'ADN (DFI) supérieur à 30% serait lié à une diminution significative du potentiel de fertilité (52). Plusieurs études ont montré qu'en FIV classique, un DFI supérieur à 30% est associé à une diminution de la qualité embryonnaire, mais pas d'effet sur le taux de grossesse (53–55) mais l'équipe de Oleszczuk *et al.* (2016)(56) montre qu'en analysant par ovocyte ponctionné en FIV classique, un DFI supérieur à 20% est associé à une diminution significative du taux de naissance et qu'un DFI supérieur à 40% augmente le risque de fausse couche. Ces résultats ne s'observent pas en ICSI, et suggèrent que l'ICSI serait la technique à privilégier en cas de fragmentation de l'ADN élevée. L'ensemble de ces études permet de répondre, en partie, à cette différence de résultats entre la FIV classique et l'ICSI dans notre étude. L'insémination de 100000 spermatozoïdes après sélection, dans les puits contenant les CCO, pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif responsable de la tendance à la diminution des taux de grossesses, contrairement à l'ICSI, où seulement 1 spermatozoïde est microinjecté.

Une concentration élevée de ROS dans le sperme est associée à une diminution du taux de fécondation et du taux de grossesse en FIV classique (57). Cette corrélation n'a pas été retrouvée en ICSI. La recherche de ROS associée à une spermoculture pourrait être intéressante en pratique quotidienne pour identifier les patients avec un risque majeur de diminution de taux de grossesse.

- **L'ICSI**

Il est difficile de comparer nos résultats d'ICSI à ceux de la littérature et vérifier l'hypothèse que la présence de bactérie ait peu d'impact sur la tentative. En effet, la plupart des études sont faites sur des patients infertiles pris en charge en FIV classique. L'impact des bactériospermies sur les taux de fécondation et de qualité embryonnaire en ICSI a été étudié par l'équipe de Krissi *et al.* (2004) (38). Il a séparé en sous-groupe d'analyse ceux qui ont eu une FIV classique (n=29) et ceux qui ont eu une ICSI (n=44). Ses résultats sont similaires à ceux de notre étude, et ne montrent pas de différence significative des taux de fécondation et de qualité embryonnaire en fonction des résultats de la spermoculture. Le taux de fécondation moyen chez les couples en FIV classique avec spermoculture positive est de 59,32% et celui en ICSI est de 68,27%. La qualité embryonnaire était de 59,27% versus 63,94% respectivement. On retrouve cependant une meilleure qualité des paramètres chez les patients pris en charge en ICSI en présence d'une bactérie, en comparaison à la FIV.

- **Fausses couches**

Sur les 117 grossesses débutantes il y a eu 31 FCS de moins de 12 SA et 2 grossesses extra-utérines. Dix grossesses se sont arrêtées dans le groupe 1 (23%), 18 dans le groupe 2 (33%), 1 dans le groupe 3 (20%) et 2 dans le groupe 4 (15%). Il n'existe pas de différences significatives entre ces groupes (p 0,26).

Devant la diminution du taux de grossesse évolutive en FIV classique, on se pose la question si l'on ne devrait pas modifier nos pratiques et demander une spermoculture plus rapprochée de la tentative afin de mettre en place un traitement antibiotique pour

s'assurer de l'utilisation d'un échantillon de sperme non contaminé. Actuellement, nous demandons une spermoculture négative ou la présence d'une flore de moins d'un an avant la tentative, et les patients pris en charge dans notre étude avaient une spermoculture qui correspondait à nos critères. Cependant sur les 404 patients, 52 spermocultures étaient positives à un germe isolé au-dessus du seuil de pathogénicité (groupe 4) et ces hommes auraient du recevoir un traitement antibiotique avant l'AMP. Dans cette période de 1 an, le sperme de ces patients s'est positivé.

Un délai plus rapproché n'est pas non plus une solution idéale car elle expose à un risque d'annulation des tentatives d'AMP et des répercussions psychologiques sur les patients chez qui on retrouve une spermoculture positive. L'annulation est due au temps que prend le rendu des résultats de bactériologie, le traitement antibiotique et le contrôle après le traitement.

D'autre part, l'étude de Cottell *et al.* (1997)(6) montre une variation des germes retrouvés, un même jour, pour un même patient, entre deux recueils.

Dans le guide des bonnes pratiques de 2010, une spermoculture « récente » était demandée avant une prise en charge en FIV classique ou ICSI, alors qu'en insémination intra-utérine, un délai de 6 mois était exigé. Une modification des guides de bonnes pratiques est en cours en aout 2016, et ce texte n'évoque plus de faire une spermoculture avant la tentative d'AMP. Il exige seulement une spermoculture ainsi que la recherche de *Chlamydiae trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* par PCR sur les urines dans le cadre du bilan préalable au don de spermatozoïdes. Mais devant les résultats de notre étude, cette tendance à la diminution est nette et ne peux être exclue. La spermoculture est un examen important dans la prise en charge en AMP et ne doit pas être éliminé dans le bilan des patients asymptomatiques. Un délai plus court qu'un an est à proposer dans notre centre mais tout en respectant un délais suffisamment important en cas de positivité, pour pouvoir mettre en place un traitement antibiotique adapté.

CONCLUSION

Les résultats de notre étude montrent une prévalence de bactériospermie importante le jour de la tentative d'AMP, avec des conséquences sur l'issue de la tentative. Le taux de grossesse évolutive en FIV classique est impacté par la présence de bactéries polymorphes et monomorphes dans le sperme le jour de la tentative, et il existe une tendance à la diminution du taux de grossesse débutante. L'impact sur les naissances vivantes est en cours. Les paramètres spermatiques, le taux de fécondation et la qualité embryonnaire ne sont pas altérés en présence de bactéries, et il n'existe pas d'impact significatif sur les patients pris en charge en ICSI.

Ces résultats nous amènent dès lors à insister plus fortement sur les conditions d'asepsie lors du recueil au moment de la prise en charge en AMP. Une réflexion sur la flore polymicrobienne, considérée comme une spermoculture négative dans la prise en charge des patients à Tenon, est en cours pour déterminer s'il ne serait pas intéressant de demander aux patients de répéter leur examen de sperme en cas de flore à un seuil élevé. On pourrait vérifier, pour les patients pris en charge dans notre étude et présentant une flore le jour de la tentative, si celle-ci était déjà présente lors de la spermoculture réalisée dans le délai d'un an. En cas de récidive, nous pourrions mettre en place un traitement multicouche lors de la préparation de sperme avant la tentative d'AMP. Par ailleurs, un délai de 6 mois entre la spermoculture et la prise en charge devrait être envisagé à Tenon, pour un meilleur suivi des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arrêté du 2 juin 2014 modifiant l'arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

2. Rehewy MS, Hafez ES, Thomas A, Brown WJ. Aerobic and anaerobic bacterial flora in semen from fertile and infertile groups of men. Arch Androl. 1979 May;2(3):263–8.

3. Toth A, Lesser ML. Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. Fertil Steril. 1981 Jul;36(1):88–91.

4. Rivet-Danon D. L'analyse bactériologique du sperme chez un patient asymptomatique dans un contexte d'Assistance Médicale à la Procréation: étude multicentrique des pratiques dans les laboratoires de bactériologie et les centres d'Assistance Médicale à la Procréation en France. [Thèse d'exercice]. [Université Pierre et Marie Curie, Paris]; 2015.

5. Boitrelle F, Robin G, Lefebvre C, Bailly M, Selva J, Courcol R, et al. [Bacteriospermia in Assisted Reproductive Techniques: effects of bacteria on spermatozoa and seminal plasma, diagnosis and treatment]. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2012 Apr;40(4):226–34.

6. Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. Fertil Steril. 1997 Jan;67(1):98–103.

7. Huyser C, Fourie FL, Oosthuizen M, Neethling A. Microbial flora in semen during in vitro fertilization. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1991 Oct;8(5):260–4.

8. Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. Fertil Steril. 1993 Jan;59(1):197–201.

9. Shalika S, Dugan K, Smith RD, Padilla SL. The effect of positive semen bacterial and Ureaplasma cultures on in-vitro fertilization success. Hum Reprod. 1996 Dec 1;11(12):2789–92.

10. Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot J-M, Peers M-C, Mitchell V, et al. Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. Andrologia. 2005 Oct;37(5):160–5.

11. Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol. 2005 Oct;67(1-2):51–6.

12. Jedrzejczak P, Fraczek M, Szumala-Kakol A, Taszarek-Hauke G, Pawelczyk L, Kurpisz M. Consequences of semen inflammation and lipid peroxidation on fertilization capacity of spermatozoa in in vitro conditions. Int J Androl. 2005 Oct;28(5):275–83.

13. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. J Assist Reprod Genet. 2009 Jan;26(1):47–56.

14. Leterrier M, Fréour T, Guillouzouic A, Juvin M-E, Barriere P, Reynaud A, et al. Semen cultures analysis: retrospective study during a 6-year period and interest in the management of infertility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2011 Mar;30(3):401–6.

15. De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N. Bacterial species present in the lower male genital tract: a five-year retrospective study. Eur J Contracept Reprod Health Care Off J Eur Soc Contracept. 2011 Feb;16(1):47–53.

16. Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JBM, Mazzulli T, Jarvi K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. Fertil Steril. 2012 May;97(5):1050–5.

17. Fourie J, Loskutoff N, Huyser C. Elimination of bacteria from human semen during sperm preparation using density gradient centrifugation with a novel tube insert. Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:513–7.

18. Abeysundara PK, Dissanayake D, Wijesinghe PS, Perera R, Nishad A. Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. J Hum Reprod Sci. 2013 Apr;6(2):152–7.

19. Dissanayake DM a. B, Amaranath KA, Perera RRDP, Wijesinghe PS. Antibiotics supplemented culture media can eliminate non-specific bacteria from human semen during sperm preparation for intra uterine insemination. J Hum Reprod Sci. 2014 Jan;7(1):58–62.

20. De Geyter C, De Geyter M, Behre HM, Schneider HP, Nieschlag E. Peroxidase-positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer. Int J Androl. 1994 Jun;17(3):127–34.

21. Bussen S, Zimmermann M, Schleyer M, Steck T. Relationship of bacteriological characteristics to semen indices and its influence on fertilization and pregnancy rates after IVF. Acta Obstet Gynecol Scand. 1997 Nov;76(10):964–8.

22. Berktas M, Aydin S, Yilmaz Y, Cecen K, Bozkurt H. Sperm motility changes after coincubation with various uropathogenic microorganisms: an in vitro experimental study. Int Urol Nephrol. 2008;40(2):383–9.

23. Fraczek M, Wiland E, Piasecka M, Boksa M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, et al. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. Fertil Steril. 2014 Sep;102(3):711–9.e1.

24. Boguen R, Treulen F, Uribe P, Villegas JV. Ability of Escherichia coli to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. Fertil Steril. 2015 May

1;103(5):1155–61.

25. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. In: 5th ed. Geneva; 2010. p. p 26 et 44.

26. Barletta D, Monzani F, Gasperi M, Caraccio N, Maccanti O, Bellitti P, et al. [Efficacy of enoxacin in the treatment of prostatitis-vesiculitis: its absence of toxicity on spermatogenesis]. Presse Médicale Paris Fr 1983. 1995 Jun 17;24(22):1025–7.

27. Comhaire FH, Rowe PJ, Farley TM. The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study. Int J Androl. 1986 Apr;9(2):91–8.

28. Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, McLaughlin EA, Al-Sufyan H, Maile LA, et al. Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in in-vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. Hum Reprod. 1996 Jun 1;11(6):1227–31.

29. Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. Antibiotics: potential hazards to male fertility. Fertil Steril. 1991 Feb;55(2):235–42.

30. Nelson WO, Bunge RG. The effect of therapeutic dosages of nitrofurantoin (furadantin) upon spermatogenesis in man. J Urol. 1957 Feb;77(2):275–81.

31. White IG. The toxicity of some antibacterials for bull, ram, rabbit and human spermatozoa. Aust J Exp Biol Med Sci. 1954 Feb;32(1):41–8.

32. Yunda IF, Kushniruk YI. Neomycin effect on testicle function. Antibiot Med Bioteknol. 1973;18:43–8.

33. Knox CL, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe WR, Stenzel D, Lawrence FA, et al. Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. Fertil Steril. 2003 Oct;80(4):921–9.

34. Al-Mously N, Cross NA, Eley A, Pacey AA. Real-time polymerase chain reaction shows that density centrifugation does not always remove Chlamydia trachomatis from human semen. Fertil Steril. 2009 Nov;92(5):1606–15.

35. Ben-Chetrit A, Shen O, Haran E, Brooks B, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. Fertil Steril. 1996 Aug;66(2):335–7.

36. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawsy M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. Fertil Steril. 1996 Nov;66(5):776–80.

37. Zhu G, Wei Y, Hu J, Liu Q. [Microorganism contamination in in vitro fertilization-embryo transfer system and their sources]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2004 Jun;39(6):382–4.

38. Krissi H, Orvieto R, Ashkenazi J, Gilboa Y, Shalev J, Moscovitch I, et al. Effect of contaminated preprocessed semen on fertilization rate and embryo quality in assisted reproductive techniques. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol. 2004 Feb;18(2):63–7.

39. Kastrop PMM, de Graaf-Miltenburg LAM, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. Hum Reprod Oxf Engl. 2007 Aug;22(8):2243–8.

40. Rowlands DJ, McDermott A, Hull MG. The prognosis for assisted conception treatment after unexpected failure of fertilization in vitro: a comparative study. Hum Reprod Oxf Engl. 1994 Dec;9(12):2287–90.

41. Guillet-Rosso F, Fari A, Taylor S, Forman R, Belaisch-Allart J, Testart J, et al. Systematic semen culture and its influence on IVF management. Br J Obstet Gynaecol. 1987 Jun;94(6):543–7.

42. Forman R, Guillett-Rosso F, Fari A, Volante M, Frydman R, Testart J. Importance of semen preparation in avoidance of reduced in vitro fertilization results attributable to bacteria. Fertil Steril. 1987 Mar;47(3):527–30.

43. Remic. Société Française de microbiologie (2015). In: Référentiel en microbiologie médicale édition 2015. p. Chapitre 24.

44. Kim FY, Goldstein M. Antibacterial skin preparation decreases the incidence of false-positive semen culture results. J Urol. 1999 Mar;161(3):819–21.

45. Société Française de microbiologie, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Recommandations 2015 du commité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie/EUCAST. 2015.

46. Damirayakhian M, Jeyendran RS, Land SA. Significance of semen cultures for men with questionable semen quality. Arch Androl. 2006 Aug;52(4):239–42.

47. Cottell E, Harrison RF, McCaffrey M, Walsh T, Mallon E, Barry-Kinsella C. Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? Fertil Steril. 2000 Sep;74(3):465–70.

48. Aitken RJ, Iuliis GND. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 2010 Jan 1;16(1):3–13.

49. Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2012;10:109.

50. Moskovtsev SI, Mullen JBM, Lecker I, Jarvi K, White J, Roberts M, et al. Frequency and severity of sperm DNA damage in patients with confirmed cases of male infertility of different aetiologies. Reprod Biomed Online. 2010 Jun;20(6):759–63.

51. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al.

Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. Int J Androl. 2010 Feb;33(1):e221–7.

52. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod. 1999 Apr 1;14(4):1039–49.

53. Niu Z-H, Shi H-J, Zhang H-Q, Zhang A-J, Sun Y-J, Feng Y. Sperm chromatin structure assay results after swim-up are related only to embryo quality but not to fertilization and pregnancy rates following IVF. Asian J Androl. 2011 Nov;13(6):862–6.

54. Zhang Y, Wang H, Wang L, Zhou Z, Sha J, Mao Y, et al. The clinical significance of sperm DNA damage detection combined with routine semen testing in assisted reproduction. Mol Med Rep. 2008 Oct;1(5):617–24.

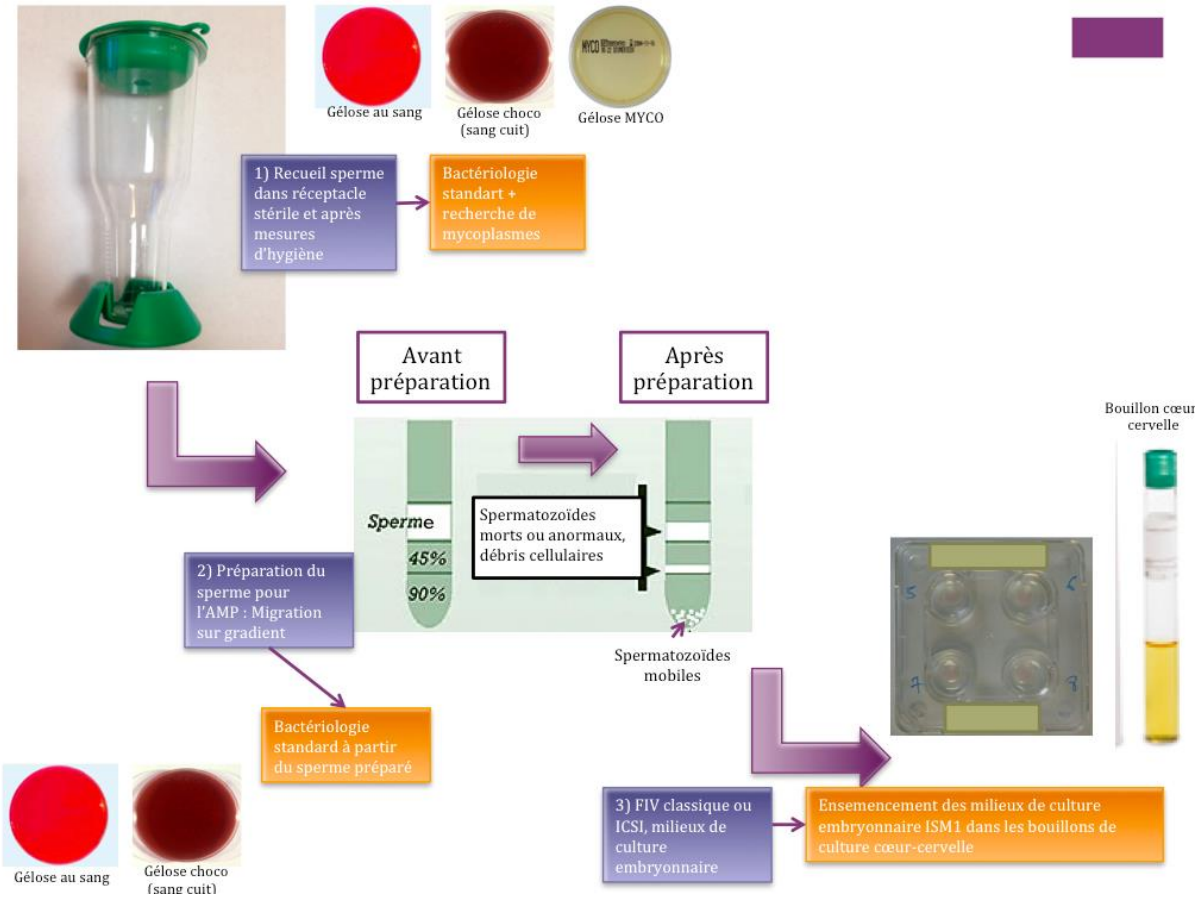
55. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum Reprod. 2004 Jun 1;19(6):1401–8.

56. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. Andrology. 2016 Mar;4(2):290–6.

57. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Int J Androl. 2003 Oct;26(5):279–85.

ANNEXES

Annexe 1. Design de l 'étude.



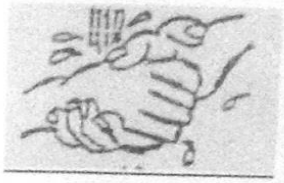
Annexe 2. Règles indispensables pour le prélèvement de sperme

REGLES INDISPENSABLES POUR LE PRELEVEMENT DE SPERME

URINER AVANT LE RECUEIL AFIN DE RINCER L'URETRE



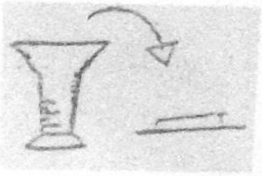
SE LAVER LES MAINS AVEC SOIN A L'EAU ET AU SAVON PENDANT 2 MINUTES



PUIS DESINFECTER LE GLAND APRES DECALLOTAGE
Avec une compresse mouillée d'Amukine



PREPARER LE FLACON :
L'ouvrir Poser le couvercle retourné sur la table



Se Laver les mains avec l'amukine :



RECUEILLIR LE SPERME DANS LE FLACON

REFERMER LE FLACON SANS TOUCHER L'INTERIEUR DU FLACON OU DU COUVERCLE

Annexe 3. Classification embryonnaire des embryons jusqu'au stade morula.

Classification Embryonnaire MEDIFIRST
des embryons jusqu'au stade morula (J4)

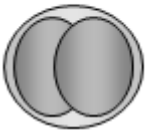
La classification utilise 3 critères d'évaluation

1er critère de la nomenclature des embryons :

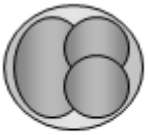
Le Nombre de blastomères (au-delà de 10 cellules : indiquer seulement >10)

2ème critère de la nomenclature des embryons :

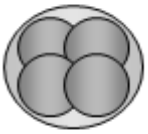
exemple d'Embryons **Typiques** (**T**)



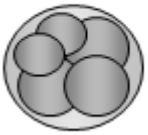
2Ta



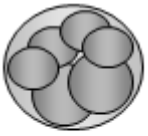
3Ta



4Ta



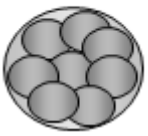
5Ta



6Ta

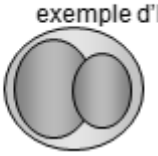


7Ta

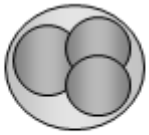


8Ta

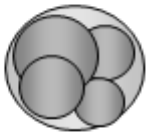
exemple d'Embryons **Atypique** (**A**)



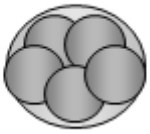
2Aa



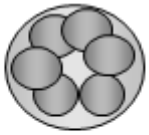
3Aa



4Aa



5Aa



6Aa … etc

3ème Critère de la nomenclature des embryons :

Le Taux de fragmentation

« **a** » : <10% d'exsudat
« **b** » : 10-30% d'exsudat
« **c** » : 30-50% d'exsudat
« **d** » : >50% d'exsudat

Titre : Spermoculture positive le jour de la tentative de Fécondation in vitro : fréquence et impact au cours de la prise en charge

L'impact d'une spermoculture positive sur la prise en charge en FIV est controversé. Nous présentons ici, les résultats de notre étude prospective dont les principaux objectifs étaient de déterminer la prévalence de spermocultures positives le jour de l'AMP, et leur impact sur l'issue de la tentative. Quatre cent quatre couples ont été inclus dans cette étude. Une spermoculture a été effectuée le jour de la tentative avant et après préparation du sperme, ainsi qu'une recherche de bactéries sur les milieux de culture embryonnaire. Soixante-cinq pourcent de spermocultures étaient positives dont 48% étaient contaminés par la flore. Quatre vingt-cinq pourcent des recherches de germes étaient négatives après préparation de sperme. Aucun milieu de culture embryonnaire n'était contaminé. Nous avons observé une diminution significative du taux de grossesse évolutive chez les couples pris en charge en FIV classique avec une spermoculture positive monomorphe ou polymorphe. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur les paramètres spermatiques, le taux de fécondation ou la qualité embryonnaire.

Mots clés : Spermoculture, contamination, fécondation *in vitro*, fécondation, qualité embryonnaire, grossesse, AMP

Title : Positive semen culture the day of the attempted on IVF : frequency and effects on IVF results

The impact of a positive semen-culture on IVF management is controversial. We present here results of our prospective study in which primary objectives were to determine positive semen-culture prevalence on the day of ART and identify impacts on IVF parameters. A semen-culture has been done the day of the IVF attempt, before and after semen preparation, as well as a bacteria embryo culture media. Sixty-five percent of semen cultures were positives of which 48% were contaminated by flora. Eighty five percent of bacteria cultures were negative after semen preparation. None of the embryo culture media were contaminated. We notice a decrease of ongoing pregnancy rate when IVF was done with positive semen culture (microbial flora or pathological bacteria). We did not highlight significat differences on spermatic parameters, fertilization rate or embryo quality.

Keywords : semen, culture, contamination, IVF, fertilization, embryo quality, pregnancy, ART

Université Paris Descartes

Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris cedex 06