

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°42

2009

Exploration de la fonction de reproduction versant masculin



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



Chère Consœur, Cher Confrère,

L'infertilité masculine n'est plus le tabou qu'elle fut pendant des siècles.

La biologie moderne et les méthodes d'exploration cliniques et biologiques actuelles permettent de mener des recherches approfondies et de pouvoir poser des diagnostics conduisant dans la plupart des cas vers des interventions rétablissant la capacité fécondante.

Pour faire écho au cahier de formation BIOFORMA N°30 qui traitait de l'exploration de la fonction de reproduction versant féminin, (toujours disponible en ligne sur www.bioforma.net) nous mettons à votre disposition ce nouvel ouvrage N°42 portant sur le versant masculin.

C'est une équipe particulièrement à la pointe de cette discipline, sous la coordination de Jacques AUGER qui propose dans ce cahier l'ensemble des techniques et méthodologies, des modes opératoires, et des tests pratiqués conduisant à rendre possible l'Aide Médicale à la Procréation.

Par ce cahier, nous souhaitons apporter à tout biologiste, dans le cadre de sa formation continue conventionnelle, une information aussi complète et détaillée que possible, et pour certains, une aide au dialogue tant avec le clinicien qu'avec, le cas échéant, le patient.

Nous rappelons qu'en matière d'Aide Médicale à la Procréation, seuls les laboratoires agréés répondant à des cahiers des charges très précis et contraignants peuvent accueillir les patients porteurs de ces pathologies, et les praticiens doivent obtenir un agrément, renouvelable tous les cinq ans auprès de l'Agence de la Biomédecine, pour la pratique d'une ou de plusieurs activités biologiques d'AMP.

Nous vous souhaitons une bonne réception de ce Cahier de Formation et vous prions d'agréer, Chère Consœur, Cher Confrère nos confraternelles et cordiales salutations.

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39
Fax : 01.56.54.39.30

site internet : www.bioforma.net
E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901
siret : 391 155 744 00025
code APE : 8040

Adrien BEDOSSA
Président

Ont collaboré à cet ouvrage :

- **Martine Albert**
*Service d'Histologie embryologie, biologie de la reproduction
cytogénétique et génétique médicale / DHI de Poissy
10, rue du Champ Gaillard, 78303 Poissy*
- **Jana Auer**
*Université Paris-Descartes, Inserm, U567 Institut Cochin
Département Génétique et Développement
Équipe 21 - 24, rue du Fg St Jacques, 75014 Paris*
- **Jacques Auger**
*Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction et CECOS / Hôpital Cochin
123, Bd de Port Royal, 75014 Paris*
- **Marta de Almeida**
*Unité Fonctionnelle d'Andrologie Biologique / Hôpital de Bicêtre
78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre*
- **Emmanuel Dulioust**
*Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction / Hôpital Cochin
123, Bd de Port Royal, 75014 Paris*
- **David Eiss**
*Service de Radiologie Adulte / Hôpital Necker Enfants Malades
149, rue de Sèvres, 75015 Paris*
- **Florence Eustache**
*Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction
Cytogénétique et CECOS / Hôpital Jean Verdier
Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy*
- **Patricia Fauque**
*Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction / Hôpital Cochin
123, Bd de Port Royal 75014 Paris*
- **Olivier Hélénou**
*Service de Radiologie Adulte / Hôpital Necker Enfants Malades
149, rue de Sèvres, 75015 Paris*
- **Pierre Jouannet**
*Service d'Histologie - Embryologie, Biologie de la Reproduction / Hôpital Cochin
123, Bd de Port Royal 75014 Paris*
- **Françoise Merlet**
*Agence de la Biomédecine
1, avenue du Stade de France, 93212 Saint-Denis La Plaine*
- **Catherine Patrat**
*Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction / Hôpital Cochin
123, Bd de Port Royal, 75014 Paris*
- **François Petit**
*Service de Biochimie-Hormonologie / Hôpital Antoine Bécclère
157, rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart*
- **Catherine Serres**
*Université Paris-Descartes, Inserm, U567 Institut Cochin
Département Génétique et Développement
Équipe 21 - 24, rue du Fg St Jacques, 75014 Paris*
- **Jean Pierre Siffroi**
*Service de Génétique et d'Embryologie médicales / Hôpital Armand Trousseau
26 av du Dr Arnold Netter, 75012 Paris*

PRÉFACE

Une définition classique et restreinte de l'andrologie (du grec *andros*, homme) en fait une spécialité médicale multiforme s'intéressant aux aspects normaux et pathologiques de la sexualité et de la reproduction masculine. Concernant ce dernier point, il s'agit d'évaluer les différents facteurs cliniques et biologiques responsables des pathologies variées du tractus génital et, d'un point de vue diagnostique et pronostique, ceux pouvant intervenir dans l'infécondité du couple pour laquelle des données convergentes impliquent le partenaire masculin dans 30% à 50% des cas.

Dans la vaste majorité des infécondités d'origine masculine, des anomalies quantitatives et qualitatives des spermatozoïdes sont en causes. Ces cellules à nulles autres pareilles, cellules terminales trouvant leur origine au niveau testiculaire, cellules au destin physiologique unique, la fécondation, cellules dont l'accomplissement fonctionnel dépend dans une large mesure de la maturation physiologique complexe qu'elles subissent dans le tractus génital de l'homme puis de la partenaire sont l'objet d'étude principal du biologiste de la reproduction.

Le contexte de la biologie de la reproduction masculine est tout à fait particulier. Au schéma classique de l'exploration biologique d'un patient pour lequel on suspecte une pathologie se substitue un schéma plus complexe à de nombreux égards, couple généralement en bonne santé versus individu malade ou suspect de maladie, recueil du sperme par masturbation versus prélèvement d'échantillon biologique fait par un tiers, analyse essentiellement subjective versus analyse standardisée par automate et, finalement, absence de normes établies de la qualité spermatique versus valeurs seuil au delà desquelles des conditions pathologiques sont suspectées. Il n'existe pas à proprement parlé de véritable traitement de l'infertilité masculine et l'aide médicale à la procréation (AMP) qui a pris un essor considérable au cours des deux dernières décennies demeure en 2009 l'approche essentielle permettant aux couples inféconds de devenir parents. La situation de détresse psychologique souvent aiguë de ces couples, dans un contexte général d'inflation des dépenses de santé, impose une prise en charge clinique et biologique optimale. De ce fait, les stratégies de prise en charge allant du diagnostic à l'AMP impliquent particulièrement le biologiste de la reproduction : la mise en commun harmonieuse des expertises cliniques et biologiques - tout d'abord dans la démarche diagnostique, rationnelle et graduée relative à chacun des partenaires, puis dans l'acte lui-même, qu'il s'agisse de préparations de spermatozoïdes pour une insémination ou de la réalisation de fécondation in vitro avec micromanipulation, véritable biologie interventionnelle (pratique soumise à autorisation) - est le principal garant du succès de l'AMP.

Les méthodes d'exploration du sperme et des spermatozoïdes reposent sur des procédures essentiellement manuelles faisant notablement intervenir le facteur humain. Ainsi, la biologie de la reproduction, à la différence de la majorité des actes de la biologie polyvalente moderne, demeure une pratique artisanale. Sa valeur et son utilité dans la prise en charge clinique de l'homme et du couple dépendent tout autant des formations spécifiques théoriques et pratiques accomplies, de l'application rigoureuse des procédures recommandées, ou encore, de l'évaluation régulière de la qualité de la phase analytique, principalement subjective par nature.

Cet ouvrage a un illustre prédécesseur en langue anglaise, le Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction de l'Organisation Mondiale de la Santé, ouvrage de référence dont les éditions successives publiées en 1980, 1987, 1992 et 1999 (une 5^{ème} édition est à paraître prochainement), n'ont malheureusement fait l'objet d'une traduction française que pour l'édition de 1992. Pour l'essentiel, les méthodes et procédures décrites dans le présent cahier sont similaires à celles recommandées dans le manuel de l'OMS. Cependant, ce cahier se distingue des précédentes éditions du manuel de l'OMS par la seule présentation des procédures et modes opératoires ayant fait la preuve de leur pertinence (evidence-based) pour le diagnostic et le pronostic. Les différents tests utiles dans le domaine, des plus usuels aux plus complexes et parfois lourds à mettre en œuvre, sont détaillés de A à Z afin d'en permettre une exécution correcte. À côté de la description pas à pas des procédures et des modes opératoires, des remarques et commentaires sont fournis chaque fois que nécessaire. Les approches « en vogue » ayant un intérêt potentiel certain mais encore insuffisamment validées sont simplement mentionnées, c'est par exemple le cas de l'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Les deux premiers chapitres de cet ouvrage rappellent brièvement les bases physiologiques et cliniques permettant de restituer le contexte des explorations en biologie de la reproduction masculine. Les trois chapitres suivants sont le « noyau dur » de l'ouvrage : Ils présentent respectivement, les examens standard de première intention, spermogramme-spermocytogramme et tests d'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical (Chapitre III), les tests utiles de seconde intention (Chapitre IV) et, les explorations plus spécialisées encore, évaluations fonctionnelles des spermatozoïdes pour la plupart, parfois lourdes à mettre en œuvre et/ou encore du domaine de recherche (Chapitre V). Le Chapitre VI traite des méthodes de préparation et de sélection des spermatozoïdes dans le cadre diagnostique (procédures réalisables par tout LABM) et thérapeutique des IJU (agrément nécessaire). Le Chapitre VII est dédié à la congélation et la conservation des spermatozoïdes (agrément nécessaire qui exclut le don). Le dernier Chapitre présente brièvement les autres approches complémentaires dans le champ de l'exploration des infertilités masculines, tests génétiques, dosages hormonaux et imagerie. Des informations complémentaires pratiques sont apportées dans une série d'annexes incluant notamment les aspects spécifiques de l'assurance qualité en biologie de la reproduction et les méthodes de contrôle de qualité de l'analyse de sperme.

Donner les outils théoriques et pratiques de cette biologie si particulière est l'objectif principal de cet ouvrage, premier du genre en français, venant compléter un précédent ouvrage portant sur la biologie de la reproduction féminine. Formons le vœu qu'il puisse contribuer à harmoniser les savoir faire dans un domaine jusqu'alors assez peu standardisé bien qu'essentiel tant pour le diagnostic des anomalies du tractus génital de l'homme que pour la prise en charge bioclinique optimale des couples inféconds.

Jacques AUGER

Liste des principales abréviations

ABCD :	Absence (Agénésie) bilatérale des canaux déférents
ABM :	Agence de la Biomédecine
ACAS :	Anticorps antispermatozoïdes
ANO :	Azoospermie non obstructive
AO :	Azoospermie obstructive
ALH :	Amplitude de déplacement latéral de la tête (amplitude of lateral head displacement)
AMP :	Aide médicale à la procréation
BCF :	Fréquence de croisement de la trajectoire moyenne (beat cross frequency)
BDR :	Biologie de la reproduction / Biologie du développement et de la reproduction
BSA :	Serum albumine bovine
BT :	Biopsie testiculaire
CASA :	Computer-aided sperm analysis (terme anglo-saxon pour désigner l'analyse du sperme par vidéomicrographie assistée par ordinateur)
CECOS :	Centre d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humain
CQ :	Contrôle de qualité
CQE :	Contrôle de qualité externe
CQI :	Contrôle de qualité interne
DHT :	Dihydrotestostérone
DNC :	Délai nécessaire à concevoir
DPI :	Diagnostic post implantatoire
DPN :	Diagnostic prénatal
EEQ :	Évaluation externe de la qualité
FISH :	Analyse en hybridation <i>in situ</i> fluorescente
FIV :	Fécondation <i>in vitro</i> sans micromanipulation
FIVD :	Fécondation <i>in vitro</i> avec sperme de donneur
HOS :	Test de gonflement hypo osmotique (hypo osmotic swelling test)
HPF :	High Power Field : champ microscopique observé au grossissement x 400 final
ICSI :	Fécondation <i>in vitro</i> avec microinjection (Intracytoplasmic Sperm Injection)
IA :	Insémination artificielle
IAC :	Insémination artificielle avec sperme du conjoint

IAD :	Insémination artificielle avec sperme de donneur
IAM :	Index d'Anomalies Multiples
IBT :	Test aux immunobilles
IBTi :	Test indirect aux immunobilles
Igs :	Immunoglobulines
IIC :	Insémination intra cervicale
IIU :	Insémination intra utérine
IMSI :	Microinjection dans l'ovocyte de spermatozoïde morphologiquement sélectionné à très fort grossissement (variante de l'ICSI)
IVG :	Interruption volontaire de grossesse
LIN :	Linéarité de trajectoire
MAR ^(-test) :	Mixed Antiglobulin Reaction
MSOME :	Motile Sperm Organelle Morphology Examination
NSMP :	Nombre de spermatozoïdes mobiles par paillette (après dégel)
OAT :	Oligo-asthéo-tératozoospermie
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	Milieu tampon phosphate
PSM :	Poste de Sécurité Microbiologique
SCSI :	Syndrome de cellules de Sertoli isolées
STR :	Rectitude de la trajectoire
TEM :	Microscopie électronique à transmission
TH :	Test de Hühner
TMS :	Test de migration-survie
TPC :	Test post-coïtal
TPCIV :	Test de pénétration croisé <i>in vitro</i>
UFC :	Unités formant colonies
VAP :	Vitesse le long de la trajectoire moyenne (Average Path Velocity)
VCL :	Vitesse curvilinéaire (Curvilinear Velocity)
VSL :	Vitesse de progression linéaire (Straight Line Velocity)
WHO :	World Health Organization
WOB :	Degré d'oscillation de part et d'autres de la trajectoire moyenne (Wobble)
ZP :	Zone pellucide

SOMMAIRE

CHAPITRE I

L'appareil génital mâle : rappels embryologiques, anatomiques et physiologiques	09
Le testicule et la voie génitale mâle	10
Maturation des spermatozoïdes	16
Mécanismes de l'éjaculation, composition de l'éjaculat	20
Les fonctions spermatiques et la fécondation	22

CHAPITRE II

L'appareil génital mâle : contexte des explorations biocliniques et stratégies thérapeutiques	29
Contexte(s) de la biologie de la reproduction et de l'analyse du sperme ; l'andrologie ; les définitions en reproduction humaine	30
Les étiologies des infécondités et hypofertilités masculines	31
Stratégies "thérapeutiques" et alternatives des infertilités masculines	35

CHAPITRE III

Méthodologie (1) : tests standard, spermogramme-spermocytogramme et tests d'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical	39
L'analyse de routine du sperme (spermogramme et spermocytogramme)	40
Les tests d'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical	94

CHAPITRE IV

Méthodologie (2) : tests complémentaires usuels portant sur le sperme	113
Spermoculture	114
Biochimie séminale	117
Explorations immunologiques	124
Recherche et caractérisation d'une éjaculation rétrograde	129

CHAPITRE V

Méthodologie (3) : autres tests évaluant structures et fonctions des spermatozoïdes	133
Microscopie électronique à transmission des spermatozoïdes	134
Analyse objective de la mobilité et du mouvement des spermatozoïdes	136
Étude de la fixation des spermatozoïdes à la ZP	141
Étude de la réaction acrosomique	145
Évaluation de la capacité fusiogénique et du pouvoir de pénétration / décondensation des spermatozoïdes : le Hamster test	151
Tests évaluant la qualité nucléaire des spermatozoïdes	155

CHAPITRE VI

Méthodologie (4) : tests de sélection/survie, préparation des spermatozoïdes,

aspects diagnostiques et thérapeutiques	159
Principes et objectifs	160
Réalisation des tests dans le cadre diagnostique	160
Préparations particulières dans le cadre diagnostique et thérapeutique	166
Sélection / préparation des spermatozoïdes dans le cadre thérapeutique (avant IIU)	168
Résultats des tests de sélection des spermatozoïdes et conduite thérapeutique (en bref)	170

CHAPITRE VII

Méthodologie (5) : congélation cryoconservation des spermatozoïdes 173 |

CHAPITRE VIII

Autres approches diagnostiques complémentaires dans le contexte de l'exploration

des infertilités masculines	181
Tests génétiques : indications, intérêt pour le diagnostic et le pronostic	182
Dosages hormonaux : indications, intérêt pour le diagnostic et le pronostic	187
Imagerie : indications, principes, iconographie sommaire	189

ANNEXES 195 |

1 - Equipement et matériel au laboratoire de BDR	196
2 - Réglage d'un microscope	197
3 - Miniquestionnaire patient	198
4 - Assurance de qualité au laboratoire de BDR	202
5 - Valeurs de référence des caractéristiques du sperme, terminologie usuelle en cas d'anomalies ...	209
6 - Compte rendus de spermogramme - spermocytogramme et de test de sélection survie	211
7 - Aspects réglementaires en BDR et AMP	216
8 - Nomenclature des actes de Biologie Médicale (NABM au 09/04/2009)	217

**L'appareil génital mâle :
rappels embryologiques,
anatomiques
et physiologiques**

CHAPITRE I

Le testicule et la voie génitale mâle

Rappels embryologiques

Le sexe du conceptus est déterminé au moment de la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde. Les différences entre mâle et femelle sont génétiquement déterminées par les chromosomes présents dans le noyau des cellules de tout individu. La détermination du sexe génétique qui dépend du chromosome sexuel transmis par le spermatozoïde, X ou Y, donnant respectivement un embryon de sexe génétique femelle ou mâle va déclencher une cascade d'événements complexes à l'échelle moléculaire et cellulaire aboutissant à la formation et la mise en place d'un appareil génital masculin ou féminin et plus généralement au développement d'un individu présentant un phénotype soit masculin soit féminin.

Pendant les huit premières semaines du développement, l'embryon se présente comme un organisme de sexe indéterminé, seul l'examen chromosomique des cellules embryonnaires permettant d'établir le sexe génétique de l'embryon. Durant cette période, les gonades en développement présentent également un caractère indifférencié. Les gonades apparaissent chez l'embryon de quatre semaines sous la forme de crêtes génitales (dues à la prolifération de l'épithélium coelomique et à la condensation du mésenchyme sous-jacent) situées de chaque côté de l'axe médian entre le mésonephros et le mésentère dorsal. Elles ne sont colonisées par des cellules germinales primordiales qu'à partir de la sixième semaine du développement. Ces cellules apparues au niveau de la paroi de la vésicule vitelline à partir de la quatrième semaine vont migrer le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur en direction des crêtes génitales. Il est à noter que la gonade, testicule ou ovaire, ne pourra se développer si ces cellules ne peuvent atteindre les crêtes génitales leur conférant ainsi une influence inductrice majeure. Au cours de cette période, l'épithélium coelomique prolifère activement et envahit le mésenchyme sous-jacent pour former les cordons sexuels primitifs dans lesquels vont venir se loger les cellules germinales primordiales. Si l'embryon a un sexe génétique mâle, les cordons sexuels primitifs vont progressivement se transformer en cordons testiculaires qui vont contribuer à la formation de la glande testiculaire primitive. Les cordons se résolvent au niveau du hile en un réseau qui deviendra plus tard le rete testis. Vers la fin de la 7^{ème} semaine, les cordons perdent leur connexion avec l'épithélium superficiel dont ils vont être séparés par une épaisse couche fibreuse, l'albuginée, qui va progressivement s'amincir pour devenir la capsule. Pendant la vie fœtale, les cellules épithéliales de soutien des cellules germinales vont progressivement se transformer pour donner les cellules de Sertoli qui se multiplieront à la fin de cette période jusqu'en période néonatale. Durant toute cette période et en postnatal jusqu'à la puberté, les cordons resteront pleins c'est à dire sans lumière visible et ce n'est que lors de l'établissement de la puberté qu'ils se creuseront d'une lumière pour former les tubes séminifères.

Enfin, les cellules interstitielles de Leydig vont particulièrement se développer entre le quatrième et le sixième mois à partir du mésenchyme situé entre les cordons.

Les embryons des deux sexes possèdent deux systèmes pairs de conduits génitaux, les canaux de Wolff et de Müller étroitement liés au système urinaire en développement. Le développement ultérieur de ces canaux dépend du sexe génétique de l'embryon qui lorsqu'il est mâle va conduire à une voie génitale principale paire (épididymes, canaux déférents, mais aussi, canaux éjaculateurs et vésicules séminales) dérivée du canal de Wolff, le canal de Müller ayant subi une involution quasi totale.

À partir de la troisième semaine, les embryons indifférenciés présentent des organes génitaux externes semblables constitués d'un pli cloacal de part et d'autre du cloaque, ces plis se rejoignant en avant de la membrane cloacale pour former le tubercule génital. Lorsque cette membrane se subdivise à partir de la sixième semaine en membrane urogénitale et en membrane anale, les plis se subdivisent de même en plis urétraux ou génitaux en avant et en plis anaux en arrière. Dans le même temps des surélévations latérales, les bourrelets génitaux apparaissent : ils seront plus tard à l'origine du scrotum chez le garçon (et des grandes lèvres chez la fille). La différenciation du tubercule génital sera à l'origine d'une partie du pénis.

À la naissance les organes sexuels bien qu'individualisés et en position anatomique ne sont pas fonctionnels. Les testicules accomplissent habituellement leur descente dans le scrotum à partir de leur situation d'origine dans la partie postérieure de la paroi abdominale à partir du septième mois jusqu'à la naissance. Le gubernaculum testis, faisceau fibreux qui relie le testicule à la paroi abdominale joue un rôle actif dans la descente testiculaire. Sa régression, étape finale du processus, est contrôlée par les androgènes. Diverses anomalies peuvent se produire à différents stades du développement des organes sexuels (hermaphrodisme, pseudo-hermaphrodisme, cryptorchidie, etc...). Certaines des anomalies du développement sont en rapport avec une anomalie chromosomique. (Chapitre VIII)

Rappels anatomiques et physiologiques

Testicules

Les testicules sont des organes pairs. Le testicule adulte normal a une forme ovoïde non symétrique avec un grand axe mesurant 4 à 5 cm, un petit axe mesurant environ 3 cm et une épaisseur d'environ 2,5 cm. Chaque testicule est recouvert par une capsule fibreuse, l'albuginée - constituée de faisceaux de collagène et renfermant des cellules musculaires lisses - tapissée à l'extérieur par la tunique vaginale, feuillet interne du repli péritonéal, et à l'intérieur par une tunique vasculaire riche en vaisseaux sanguins. L'albuginée présente des prolongements en profondeur cloisonnant partiellement la glande testiculaire (corps de Highmore traversé par des vaisseaux et le rete testis). Des cloisons incomplètes, ou septa, disposées entre ces invaginations de l'albuginée délimitent environ 250 à 300 lobules par testicule. Chaque lobule contient un à quatre tubules séminifères pelotonnés. Ces derniers, d'un diamètre de 300 à 400 µm, forment des anses, une extrémité étant aveugle, l'autre se jetant dans les tubes droits. Le tissu interstitiel situé entre les tubules comporte notamment des vaisseaux et des îlots de cellules endocrines, les cellules de Leydig produisant la testostérone. Les tubes droits s'ouvrent dans le rete testis en connexion avec les tubes efférents assurant la jonction entre testicule et épididyme. Les tubes séminifères sont constitués principalement par les cellules germinales (aux différents stades correspondant à des localisations spécifiques dans l'épithélium séminifère) et les cellules de soutien de ces dernières, les cellules de Sertoli. De l'intérieur vers l'extérieur, la paroi des tubes séminifères est composée d'une membrane basale, revêtue par plusieurs assises de cellules myoïdes surmontées d'une couche de fibres de collagène elle-même revêtue d'une assise de cellules endothéliales délimitant les capillaires lymphatiques du tissu interstitiel. Les tubes séminifères et les cellules interstitielles logées dans les espaces pérítubulaires sont baignés par le liquide interstitiel qui participe aux fonctions endocrines et paracrines du testicule.

Le testicule est localisé/suspendu dans le scrotum à l'extrémité du cordon spermatique recouvert par le muscle crémaster et dans lequel cheminent les vaisseaux, artère testiculaire, veines testiculaires et épídidymaires, le canal déférent et les artères et veines déférentielles. Les branches successives de l'artère testiculaire cheminent dans l'albuginée et les cloisons interlobulaires. Les veines testiculaires se regroupent sous la forme du plexus pampiniforme apposé à l'artère testiculaire à la partie dorsale du testicule. Les vaisseaux lymphatiques drainant le testicule et les épídidymes cheminent également dans

le cordon spermatique pour atteindre les ganglions lymphatiques périaortiques. L'innervation du testicule est réalisée par un réseau de fibres nerveuses suivant la même arborisation que celle des vaisseaux sanguins (Figure 6). À l'intérieur du scrotum, la température est inférieure de 3 à 5°C à celle du corps. La spermatogenèse ne peut se dérouler harmonieusement et complètement qu'à ces conditions thermiques. Différentes situations modifiant la thermorégulation normale, varicocèle important, exposition thermique professionnelle, etc... peuvent donc négativement influencer la spermatogenèse.

Les testicules constituent une glande présentant une double fonction, fonction gamétogène, appelée spermatogenèse, à l'origine de la formation continue de spermatozoïdes à partir de la période pubertaire et, fonction endocrine avec la sécrétion des androgènes.

L'épithélium séminifère (Figure 1)

À chacun des trois grands types de cellules germinales, spermatogonies, spermatocytes, spermatides, correspondent les trois grandes phases du processus spermatogénétique. Dans l'ordre mentionné ces cellules sont localisées de la base vers la lumière du tube. Les cellules de Sertoli assurent leur soutien et s'étendent sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Elles entourent les cellules de la lignée germinale et sont considérées comme le véritable « chef d'orchestre » de la spermatogenèse, seules cellules pouvant communiquer directement avec toutes les autres catégories cellulaires constituant le tubule séminifère. Brièvement, elles ont un rôle de soutien et de protection des cellules germinales, de nutrition des cellules germinales, elles contrôlent la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes, sont capables de phagocytose, de synthèses (inhibine B, etc...) et sont stimulées par la FSH. Leur cytoplasme présente de fins prolongements et va de la lame basale à la lumière. Il existe des systèmes de jonctions serrées différenciant le compartiment basal du compartiment adluminal. Les cellules germinales souches ou spermatogonies présentent différents types cytologiques en fonction de leur rôle (réserve ou prolifération) et des divisions successives. Ces cellules sont en relation les unes avec les autres par des ponts intercellulaires. Les spermatocytes sont les cellules issues de la dernière division des spermatogonies.

La spermatogenèse

La spermatogenèse se met en place à la puberté. Elle se définit comme un processus de multiplication et de différenciation cellulaire partant des cellules souches pour aboutir à la formation des spermatozoïdes testiculaires.

Elle comporte trois grandes étapes :

- Phase de multiplication des cellules souches
- La méiose
- La spermiogenèse

Au cours de la phase de multiplication, les cellules germinales souches ou spermatogonies se divisent par mitoses (il existe un compartiment de spermatogonies de réserve non impliquées dans ce processus et les deux types de spermatogonies présentent des caractéristiques cytologiques différentes). Au terme de ces divisions commence la méiose, processus de divisions successives des spermatocytes diploïdes aboutissant à la formation de spermatides haploïdes présentant les caractéristiques suivantes : 1) une synthèse d'ADN avec répllication des filaments chromosomiques (stade préleptotène), 2) la prophase elle-même avec ses cinq stades leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse caractérisées par

des aspects cellulaires différents et la présence dans le noyau de chromosomes appariés (il faut particulièrement noter la séparation du bivalent sexuel des 22 bivalents autosomiques lors du stade pachytène, et la formation de chiasmata à l'origine des « crossing over », échanges de matériel génétique entre chromosomes homologues paternels et maternels au stade diplotène), 3) la séparation des chromosomes homologues paternels et maternels et la formation de spermatocytes de 2ème ordre comportant des chromosomes constitués de deux chromatides, à l'issue de la première division méiotique et, 4) leur division rapide avec une répartition de chaque chromatide dans les deux cellules filles, les spermatides haploïdes.

La dernière phase appelée spermiogénèse (Figure 2) concerne la métamorphose des spermatides en spermatozoïdes. À partir de ce stade il n'y a plus de divisions cellulaires mais des processus morphogénétiques extrêmement complexes à l'échelle moléculaire et cellulaire qui vont particulièrement concerner la réorganisation du noyau, la mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi, la formation et l'assemblage des structures flagellaires et la perte de la majeure partie du cytoplasme. À l'issue de cette phase, les spermatides matures devenues spermatozoïdes testiculaires se détachent de l'épithélium séminifère (spermiation) pour être excrétées dans la lumière des tubules. Chez l'homme, la durée d'un cycle de spermatogénèse complet est d'environ 60 jours.

Figure 1 : Schéma simplifié d'une portion transversale de tube séminifère montrant les différentes étapes de la spermatogénèse. Compartiment basal (A) ; Compartiment adluminal (B)

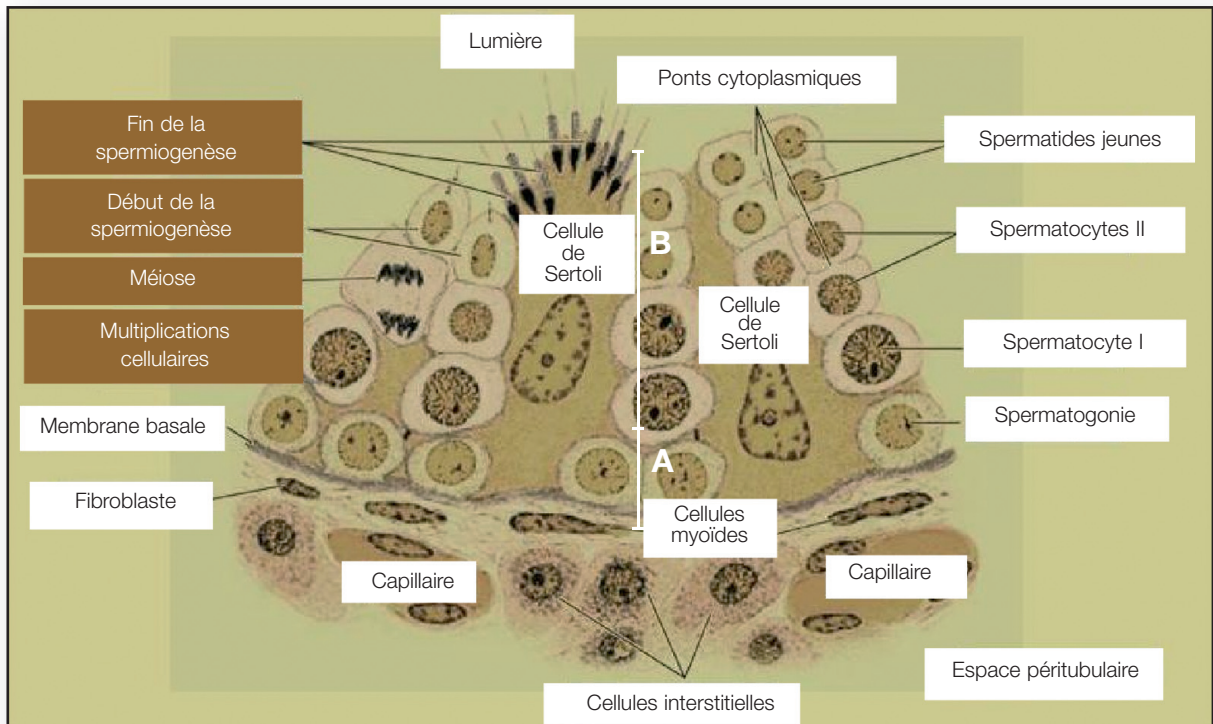
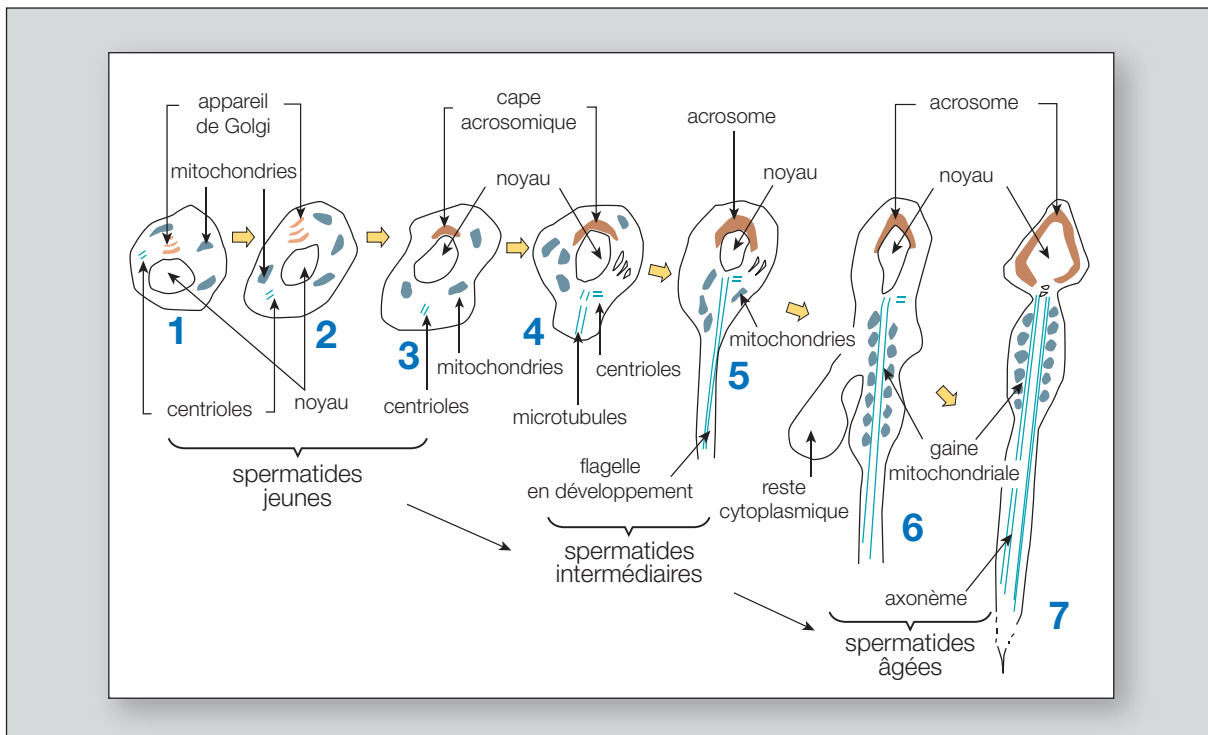


Figure 2 : Schéma simplifié de la morphogénèse du spermatozoïde au cours de la spermiogénèse



Tractus génital et urogénital

À la sortie du testicule le tractus génital comprend tout d'abord, les épидидymes puis les canaux déférents et les canaux éjaculateurs. Ces derniers confluent avec l'urètre prostatique dans la profondeur de la glande prostatique. À partir de ce niveau, le tractus devient urogénital et médian avec les différentes portions de l'urètre (prostatique, membraneux, pénien). Les glandes associées au tractus sont les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales (de Cowper). Les principales fonctions de ces différentes portions de l'appareil reproducteur mâle sont de transporter les spermatozoïdes des testicules vers l'extérieur, de permettre leur maturation au cours de leur transit, notamment épидidymaire, et de fournir certaines sécrétions contribuant à la formation du sperme.

Epididymes, canaux déférents et éjaculateurs

Les spermatozoïdes sont transportés du testicule vers le canal épидidymaire au moyen d'une vingtaine de tubes droits appelés canaux efférents qui vont venir percer la capsule fibreuse dans la région anatomique de la tête de l'épididyme. Ces canaux vont se jeter à ce niveau dans le canal épидidymaire extrêmement convolutif, l'ensemble formant macroscopiquement avec les tissus connectifs qui l'entourent un compartiment distinct, la tête de l'épididyme. Le canal épидidymaire conservera cette organisation pelotonnée jusqu'à la jonction avec le canal déférent (une fois déroulé, le canal épидidymaire mesure environ 6 mètres) et on pourra macroscopiquement distinguer une partie resserrée faisant suite à la tête de l'épididyme, le corps de l'épididyme se poursuivant par une portion anatomiquement plus large, la queue de l'épididyme au niveau de laquelle sont stockés la majorité des spermatozoïdes continuellement produits entre deux éjaculations. À la jonction avec le canal déférent, sa paroi devient épaisse. Le canal épидidymaire est bordé par un épithélium fait de cellules cylindriques comportant des

cils et des cellules basales n'atteignant pas la lumière et dénuées de cils. Ces cils aident à la progression des spermatozoïdes le long de l'épididyme. Une réabsorption des excès de fluide d'origine testiculaire a lieu dans la partie céphalique. La vascularisation de l'épididyme est assurée par une branche de l'artère testiculaire.

Les canaux déférents sont dans le prolongement de la queue de l'épididyme et cheminent vers le haut, le long de la paroi postérieure du testicule puis gagnent le cordon spermatique se prolongeant au niveau de l'anneau inguinal profond. À partir de là, les canaux déférents plongent en profondeur en direction de la prostate où dans la partie terminale, les vésicules séminales viennent se brancher juste avant les canaux éjaculateurs. La partie terminale du canal déférent dilatée et tortueuse est appelée ampoule déférentielle. Les canaux déférents sont entourés d'une tunique musculaire épaisse. Leur partie initiale intrascrotale est palpable. Les fibres musculaires disposées de manière longitudinale sont bien développées, et leurs contractions lors de l'éjaculation contribuent au déplacement des spermatozoïdes vers l'ampoule.

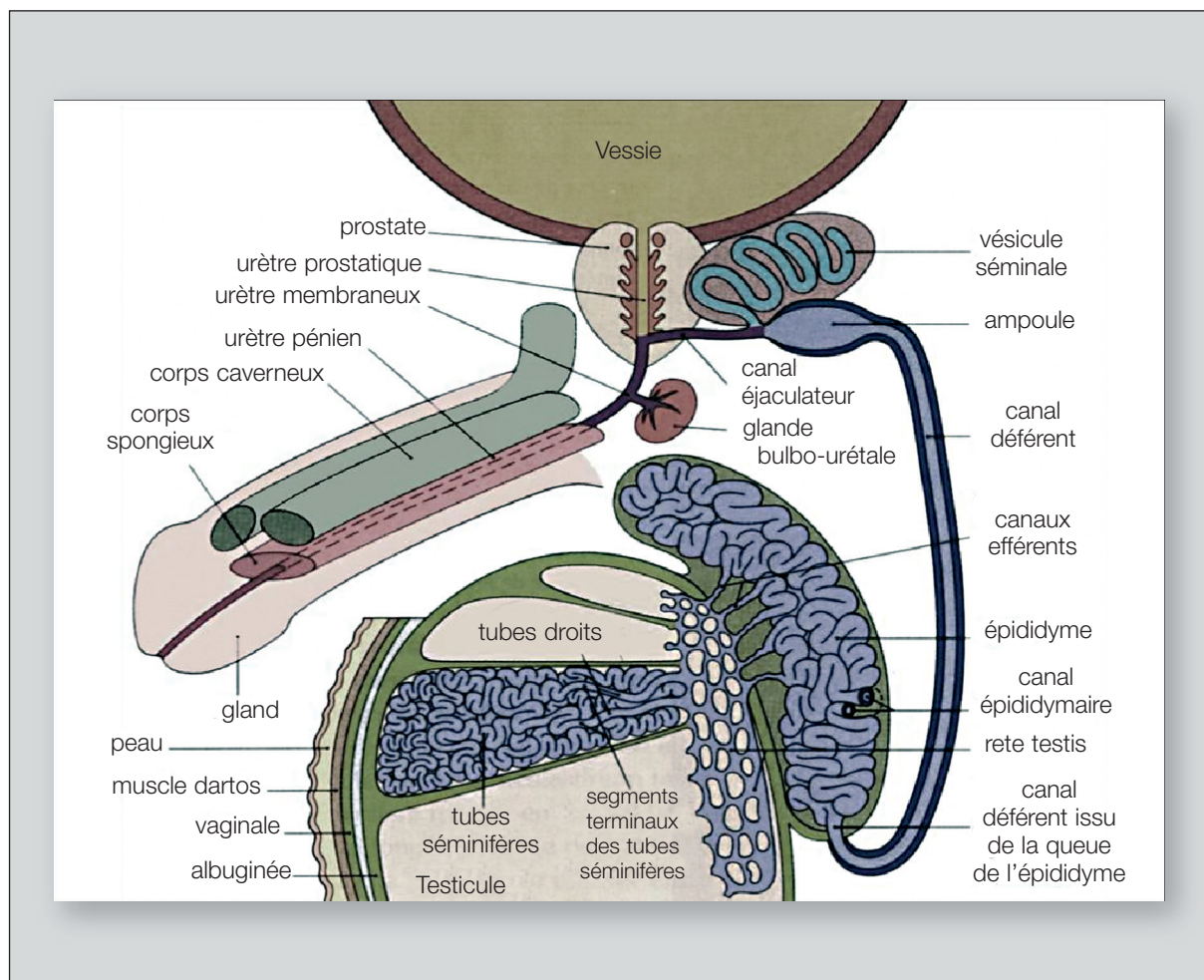
Les canaux éjaculateurs se situent de part et d'autre de l'axe médian, ils s'individualisent à la confluence du canal déférent et de la vésicule séminale. Chaque canal mesure environ deux centimètres de long et s'étend au niveau de la partie latérale du lobe médian de la prostate pour atteindre le plancher de l'urètre prostatique et s'ouvrir au niveau du mur postérieur dans une dépression située de part et d'autre de l'utricule prostatique situé au niveau de la crête urétrale.

Glandes annexes : prostate, vésicules séminales, glandes bulbo-urétrales (Figures 3 et 6)

Ces structures sécrètent la majeure partie du volume de la fraction liquidienne (plasma séminal) de l'éjaculat. La prostate située en position centrale dans le bassin, derrière la partie plus inférieure de la voûte pubienne, en avant du rectum, a une forme de pyramide inversée, son sommet étant en continuité avec le haut appareil urinaire et la vessie. L'urètre traverse sa substance. La prostate qui est entourée de muscle lisse et d'une capsule fibreuse a une consistance ferme. Elle mesure environ 4 cm de large, 3 cm de haut, et environ 2 cm de profondeur et se compose de tissu glandulaire au sein d'une coque musculaire. Elle est imparfaitement divisée en trois lobes. Ses sécrétions sont régulées par les androgènes. Les glandes de la zone externe sécrètent le fluide prostatique laiteux, et légèrement acide. Les vésicules séminales structures paires mesurent environ 5 cm de long. Chaque vésicule est essentiellement composée d'un tube extrêmement contourné et de nombreux diverticules le tout lié par le tissu connectif. Les vésicules séminales comportent des couches longitudinales et circulaires de muscle lisse, et leurs cavités sont recouvertes d'une muqueuse dont la partie épithéliale sécrète la majeure partie du liquide séminal, son excrétion étant la conséquence de contractions musculaires pendant l'éjaculation. L'activité des vésicules séminales est également sous la dépendance des androgènes.

Les glandes bulbo-urétrales, ou glandes de Cowper, sont des glandes en forme de pois mesurant environ 1 cm de diamètre situées sous la prostate au début de la partie interne du pénis. Elles sont pourvues de minces canaux s'ouvrant sur le plancher de la partie spongieuse de l'urètre. Le fluide excrété par ces glandes est clair, il a un rôle lubrificateur.

Figure 3 : Schéma anatomique de l'appareil génital mâle adulte

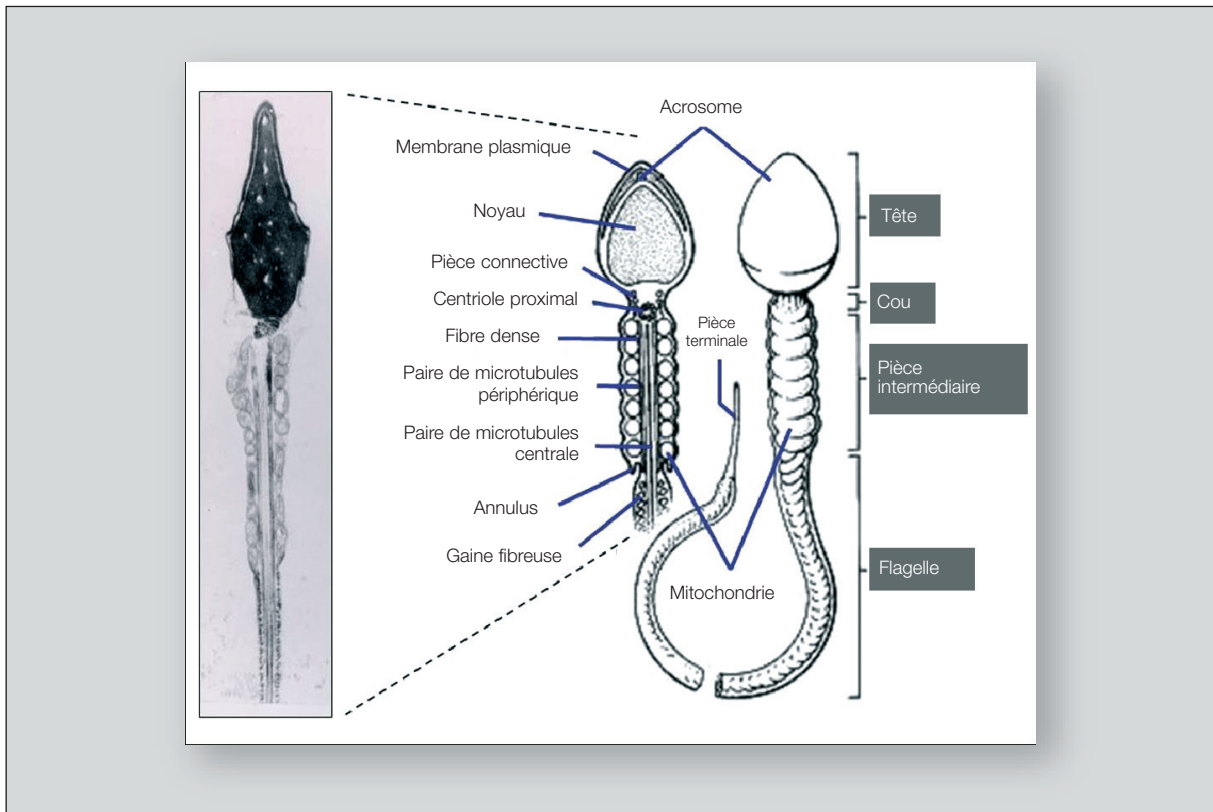


Maturation des spermatozoïdes

Le spermatozoïde, cellule terminale hautement différenciée est une cellule orientée, avec une taille, une forme et des axes de symétrie déterminés. Il ne comporte que les constituants utiles à la fécondation qui sont emboîtés les uns dans les autres, maintenant entre eux d'étroits rapports de proximité. La morphologie générale du spermatozoïde éjaculé est similaire à celle du spermatozoïde testiculaire. Le spermatozoïde humain normal mature mesure environ 60µm de long et est essentiellement constitué de trois parties : la tête, le cou et le flagelle (Figure 4). L'ultrastructure du spermatozoïde humain normal est très bien documentée, depuis de nombreuses années (Chapitre V). La figure 4 qui suit donne une représentation schématique d'ensemble de l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde humain éjaculé normal.

La maturation des spermatozoïdes lors de leur transport dans l'épididyme est un pré requis indispensable pour la fécondation. Au cours du transit épидидymaire, les spermatozoïdes rencontrent des environnements variés, notamment dans la composition en protéines.

Figure 4 : Aspect en microscopie électronique à transmission et caractéristiques ultrastructurales du spermatozoïde humain



Modifications membranaires

Dans la partie proximale (tête) de l'épididyme, les spermatozoïdes sont principalement soumis à l'action d'enzymes et exposés à des protéines susceptibles de modifier leurs membranes. Dans la partie moyenne (corps) de l'épididyme, prédominent d'autres types de protéines et d'enzymes, notamment celles associées au transport des stéroïdes, modulant la composition lipidique de leur membrane et permettant l'ancrage de protéines jouant un rôle majeur dans la liaison avec la zone pellucide. Enfin, dans la partie distale (queue) de l'épididyme, les spermatozoïdes font face à des activités antimicrobiennes croissantes, à des activités croissantes d'enzymes lytiques, sont exposés à des protéines impliquées à la fois dans la liaison à la zone pellucide et la fusion ovocytaire, et à des agents décapacitants permettant leur survie notamment avant l'éjaculation. Au terme du transport épididymaire, la localisation des protéines dans des domaines membranaires précis tout comme l'équipement membranaire final en sucres et en peptides dépendant d'enzymes modulant leur adjonction ou au contraire leur extraction conditionneront des étapes clés comme par exemple, la liaison à la zone pellucide ou encore la fixation à l'ovocyte.

Établissement de la mobilité et modifications complexes du métabolisme

La capacité à un déplacement autonome, témoin de la viabilité et de l'intégrité structurale du spermatozoïde, est initiée au cours du transit épididymaire. C'est la première condition nécessaire mais non suffisante pour qu'il puisse féconder. Il n'existe pas de modifications morphologiques du flagelle discernables lors du transport épididymaire. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles augmente

régulièrement, de la tête où ils sont très peu nombreux et présentent un mouvement pour l'essentiel non progressif jusqu'à la queue où ce pourcentage est élevé et la majorité des spermatozoïdes sont animés d'un mouvement progressif. Les mécanismes précis de l'initiation et du développement du mouvement des spermatozoïdes humains lors de leur passage dans l'épididyme ne sont que partiellement connus. La concentration en AMP cyclique, en calcium et l'effet « permissif » d'une augmentation du pH seraient les facteurs principaux de l'initiation de la mobilité des spermatozoïdes immatures.

Poursuite de la compaction du noyau

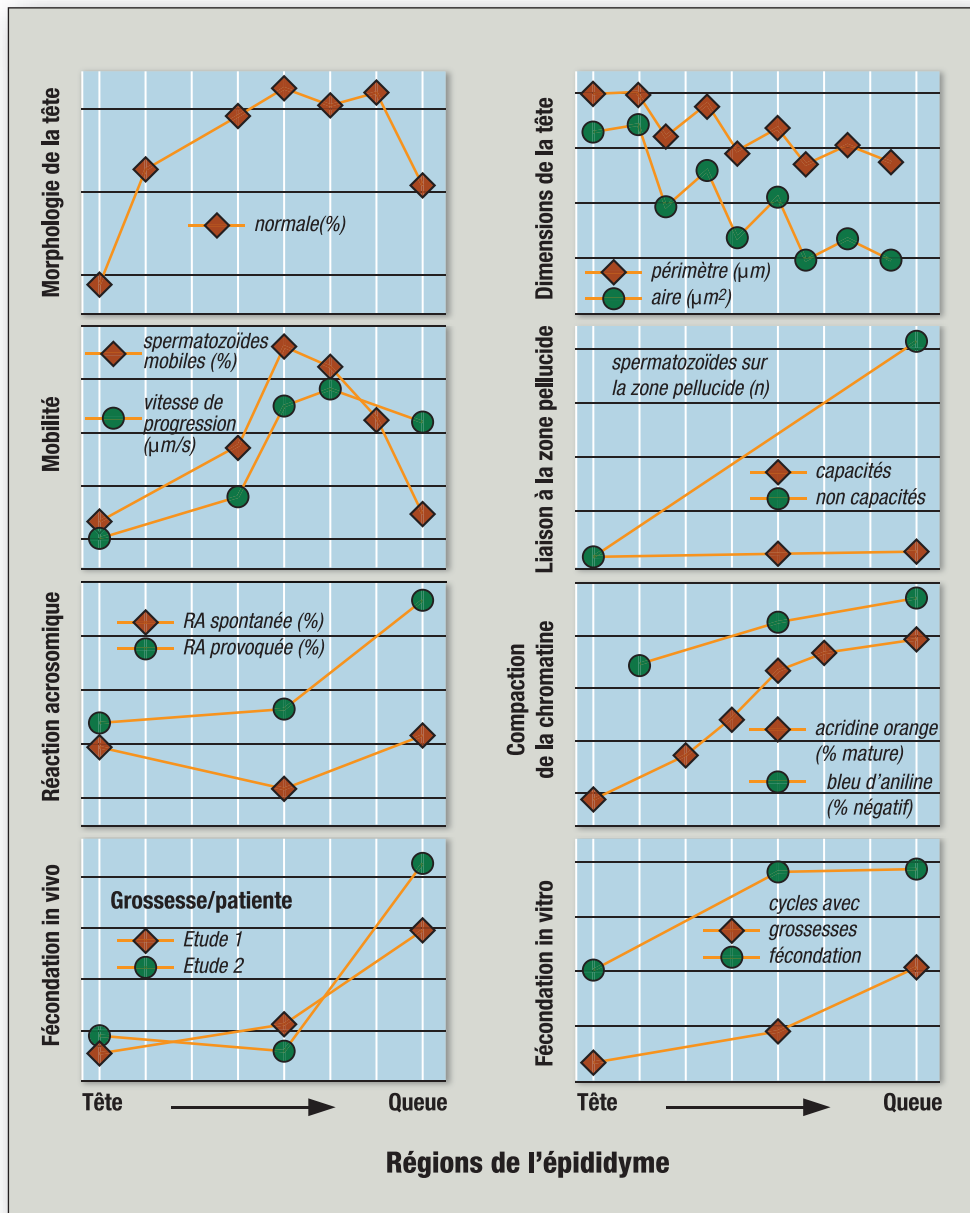
La compaction de la chromatine initiée dans les étapes finales de la spermiogénèse se poursuit lors du transit épididymaire. Cette compaction est graduelle au fur et à mesure de la progression dans l'épididyme et est en rapport avec une augmentation significative du nombre de ponts disulfure.

Dépendance aux oestrogènes et androgènes

La fonction épididymaire est contrôlée de manière complexe par plusieurs hormones et facteurs de croissance. La testostérone est le facteur principal intervenant dans son développement, son maintien et la maturation des spermatozoïdes. Elle est détectée dans la lumière de l'épididyme mais on trouve également en moindre quantité de la 5 alpha-DHT. Il ne semble pas exister de gradient tout au long de l'épididyme. Les données suggèrent que la testostérone à ce niveau provient des testicules. À côté de cela, l'épididyme adulte humain est pourvu de nombreux récepteurs aux androgènes supportant la notion que la structure et la fonction de l'épididyme humain sont principalement contrôlées par la testostérone, des données indiquant que la distribution des récepteurs est région-spécifique. L'épididyme humain comporte aussi d'assez nombreux récepteurs aux oestrogènes. L'administration d'oestrogènes résulte en une baisse significative de la testostérone et de la 5 alpha-DHT épididymaire, pouvant possiblement retentir sur la maturation normale des spermatozoïdes. Les oestrogènes régulent la contractilité de l'épididyme et modulent l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du fluide des canaux efférents et de l'épididyme.

La **figure 5** résume les nombreuses modifications structurales et fonctionnelles que subissent les spermatozoïdes lors du transit épididymaire.

Figure 5 : Modifications structurales et fonctionnelles des spermatozoïdes lors du transit épидидymaire (D'après Cooper, Andrologie, 2002)



Mécanismes de l'éjaculation, composition de l'éjaculat

L'éjaculation est l'ensemble des phénomènes neuro-musculaires conduisant à la formation du sperme et à son éjection hors de l'urètre. Lors de l'acte sexuel, l'éjaculation est généralement précédée de l'érection. Celle-ci est liée au gonflement des corps caverneux et du corps spongieux envahis par le sang amené par les artères hélicines qui font pression sur les veines et empêchent ainsi le sang de quitter le tissu érectile. L'urètre pénien devient alors un canal droit et de petit calibre.

Les phases de l'éjaculation

Au niveau de la prostate, l'urètre postérieur forme une chambre de pression. Le sphincter strié est contracté comme habituellement entre deux mictions. L'orifice uréthro-vésical se ferme grâce à la contraction du sphincter lisse interne (Figure 6), le veru montanum se déplace en avant et en haut. Ainsi la lumière de l'urètre prostatique s'ouvre pour former une cavité dans laquelle s'accumulent les sécrétions prostatiques qui se déversent à partir de 20 à 30 canaux glandulaires traversant la paroi de l'urètre. Une partie des sécrétions épидидymo-testiculaires contenant les spermatozoïdes stockés dans les anses épидидymo-déférentielles est projetée à travers les canaux déférents par une série de contractions péristaltique puissantes. Les sécrétions des vésicules séminales sont ensuite excrétées dans les canaux éjaculateurs.

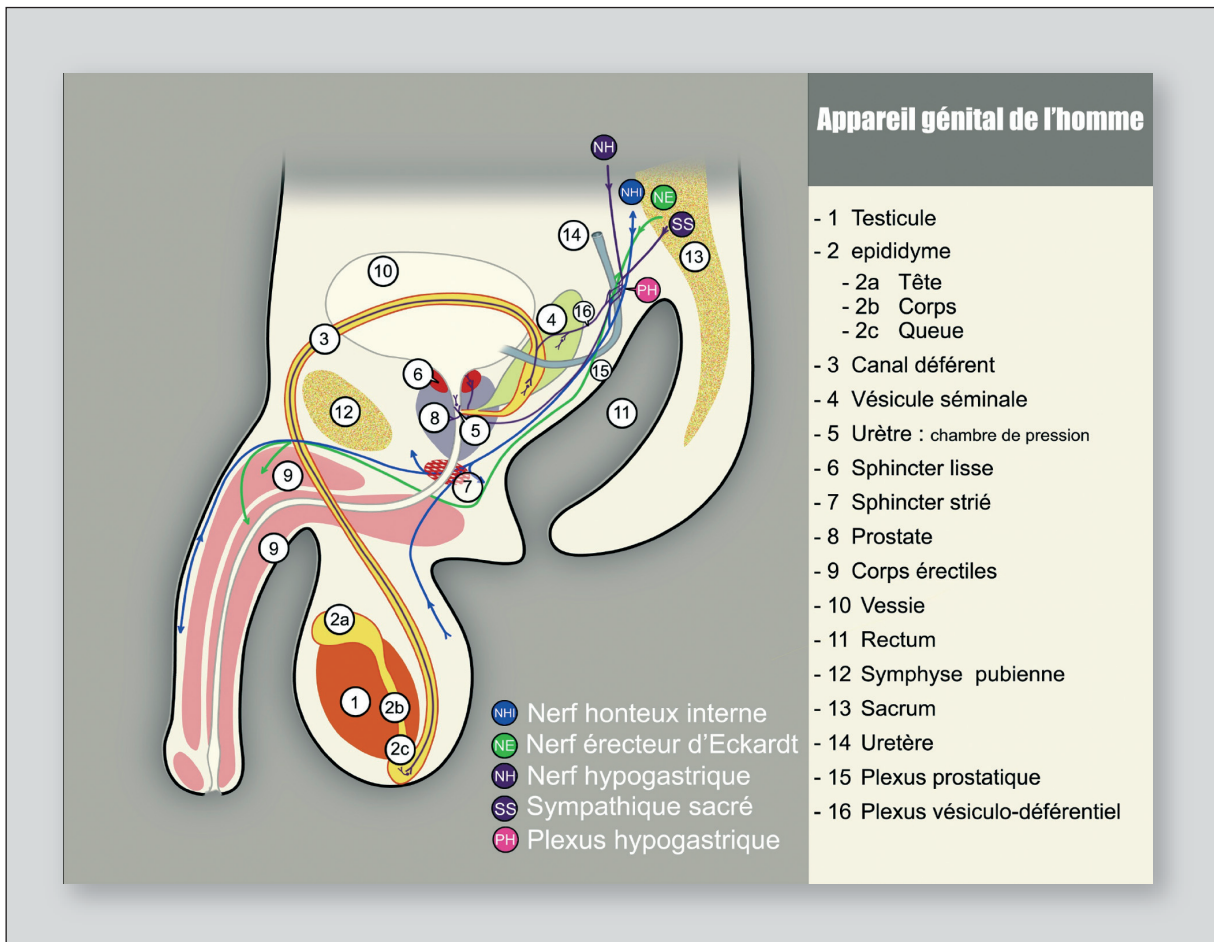
Cette première phase d'émission conduit donc à la formation du sperme, mélange de trois origines, qui va être expulsé dans un deuxième temps vers l'extérieur. L'accumulation des sécrétions dans la chambre uréthrale prostatique entraîne une augmentation de la pression sur le sphincter strié en aval qui va s'ouvrir par processus réflexe. Ensuite des contractions cloniques des muscles bulbo - et ischio-caverneux associées à des mouvements des muscles pelviens provoquent l'expulsion rythmique du sperme à travers l'urètre pénien et l'orifice urétral externe. C'est à ce moment que se manifeste l'orgasme. Le transport du sperme à travers l'urètre est facilité par les sécrétions muqueuses des glandes bulbo-urétrales qui sont excrétées avant l'éjaculation, et qui ont nettoyé et lubrifié l'épithélium urétral.

Le contrôle nerveux de l'éjaculation (Figure 6)

L'érection est contrôlée par les nerfs érecteurs d'Eckardt, rameaux para-sympathiques d'origine sacrée (S2-S4). L'éjaculation dépend d'un processus réflexe cortical dont les voies sensibles afférentes passent par le nerf honteux interne. Les fibres efférentes sympathiques émergent de la région dorso-lombaire de la moelle (D10-L2). Les fibres passent par les ganglions sympathiques au niveau du plexus mésentérique inférieur puis se prolongent dans les nerfs hypogastriques. Ces derniers participent à la formation du plexus hypogastrique qui est situé derrière la vessie autour de l'uretère avant que les fibres se dirigent vers les différents organes génitaux. La particularité de ces fibres est qu'elles traversent directement les différents ganglions, le seul relais se situant à proximité immédiate de l'organe effecteur. Les neurones post-synaptiques mettent en jeu des récepteurs alpha adrénergiques. L'action d'agents pharmacologiques alpha bloquants comme la guanéthidine inhibe l'éjaculation. La noradrénaline n'est pas toujours le seul médiateur en jeu, elle est souvent co-localisée avec le neuropeptide Y. L'innervation sympathique provoque la fermeture du col vésical, la contraction

des fibres musculaires lisses de la prostate et des vésicules séminales et la contraction des fibres musculaires de la paroi déferentielle. L'expulsion du sperme hors de l'urètre est dépendante des fibres parasympathiques contenues dans le nerf érecteur d'Eckardt qui stimulent la contraction des muscles bulbo et ischio-caverneux et des muscles striés pelviens. Le processus réflexe de l'éjaculation est enclenché par la stimulation des zones érogènes situées principalement au niveau du gland. Le message sensitif élaboré par le récepteur, est véhiculé par le nerf dorsal du pénis et les fibres sensibles du nerf honteux interne vers la moelle sacrée puis vers le cerveau où des noyaux de l'hypothalamus intègrent les informations périphériques mais aussi celles pouvant venir des centres supérieurs comme le cortex sensoriel. Les voies effectrices quittent l'hypothalamus et émergent de la moelle épinière par les nerfs sympathiques au niveau de la charnière dorso-lombaire. L'éjaculation peut aussi être induite par un arc réflexe ne mettant pas en jeu le niveau cérébral comme on le voit chez les hommes ayant des lésions médullaires complètes au niveau dorsal, mais dans ce cas, ce n'est possible que si la lésion ne touche pas les métamères D10-L2.

Figure 6 : Innervation de l'appareil génital de l'homme



Les fonctions spermatiques et la fécondation

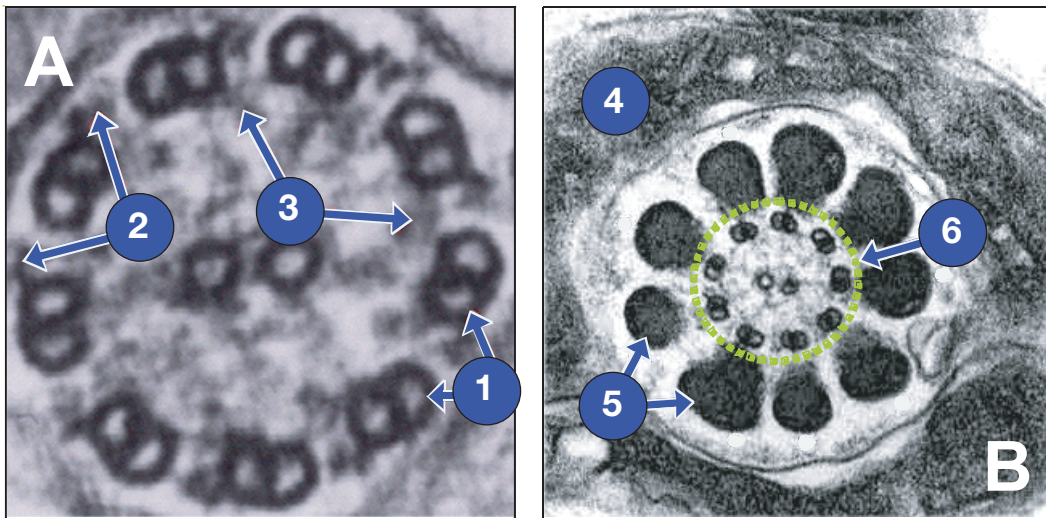
Une fois éjaculés, les différentes étapes que les spermatozoïdes doivent accomplir et les modifications morpho-fonctionnelles qu'ils doivent subir pour féconder incluent : 1) la migration et la survie dans le mucus cervical, 2) la migration jusqu'à l'ampoule tubaire, 3) la capacitation, 4) la traversée des cellules du cumulus, 5) la fixation à la zone pellucide, 6) la réaction acrosomique, 7) la traversée de la zone pellucide, 8) la fusion avec la membrane ovocytaire, et, 9) l'incorporation dans le cytoplasme suivie de la décondensation nucléaire jusqu'à la constitution du pronucleus mâle et la syngamie. La plupart de ces étapes et de ces modifications ne survient pas indépendamment les unes des autres. En d'autres termes, si on peut les résumer en deux grandes fonctions : fonction cinétique et fonction d'interaction gamétique - ou quatre capacités cruciales s'exprimant successivement : cinétique, acrosomique, fusiogène et, nucléaire - il existe de nombreuses inter-relations entre elles. Par exemple, la fusion avec la membrane ovocytaire n'est possible que si la réaction acrosomique a eu lieu, elle-même étant dépendante de la capacitation.

L'ensemble de ces étapes et de ces modifications se déroule dans les voies génitales féminines. De l'éjaculation au contact du mucus cervical, jusqu'à la fécondation, dans le tiers externe de la trompe, le spermatozoïde va rencontrer divers environnements : l'anatomie, l'histologie et l'activité sécrétoire des structures du tractus génital féminin définissant ces environnements ont toutes une contribution déterminante dans la fécondation. Le potentiel fécondant du spermatozoïde est donc modulé par les interactions qu'il a avec l'environnement des voies génitales féminines. Le succès de la fécondation dépend bien sûr du synchronisme de la rencontre entre les deux gamètes, chacun devant se trouver à un stade précis de maturation. L'ovocyte et son enveloppe glycoprotéique pellucidaire, contenue dans la masse cellulaire du cumulus oophorus, est capté lors de l'ovulation par les franges de l'ostium tubaire. À ce stade, l'ovocyte est mature, sans capacité de déplacement propre et bloqué en métaphase de deuxième division méiotique. Il est issu d'un long processus de maturation, l'ovogenèse, intimement lié à un autre phénomène, la folliculogenèse ([voir Cahier Bioforma, Exploration de la fonction de reproduction versant féminin](#)). Le spermatozoïde doit être également dans un état compatible avec l'interaction avec la zone pellucide et l'ovocyte. C'est une cellule capable d'un déplacement actif qui a subi tout d'abord dans le tractus génital masculin puis dans le tractus génital féminin une série de modifications intracellulaires et membranaires nécessaires à l'acquisition de la capacité fécondante.

Fonction de déplacement actif ou fonction cinétique

Les processus mécano-chimiques qui déterminent le déplacement du spermatozoïde sont complexes et incomplètement connus. Ils dépendent de facteurs intracellulaires, essentiellement, l'intégrité structurale du flagelle et de la membrane plasmique, l'activité métabolique et le transport membranaire et, de facteurs extracellulaires, la présence de substrats énergétiques spécifiques dans le milieu, la signalisation ionique et les propriétés physiologiques du micro-environnement spermatique. L'axonème, véritable appareil locomoteur du spermatozoïde, s'étendant tout au long du flagelle, est composé de 9 paires de microtubules disposées autour d'une paire centrale ([Figure 7](#)). Les bras de dynéine internes et externes sont des expansions s'étendant d'un doublet vers le doublet voisin. Dans la région de la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré par 9 fibres denses externes puis par les mitochondries disposées en spirale ([Figure 7](#)), ces dernières produisant l'énergie requise pour le mouvement. Au-delà de la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré par les structures périaxonémales suivantes: les fibres denses, la gaine fibreuse et deux colonnes longitudinales.

Figure 7 : Aspect en microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale d'axonème (A) et d'une coupe transversale de flagelle au niveau de la pièce intermédiaire (B)



1. Paires de microtubules 2. Bras externes de dynéine 3. Bras internes de dynéine
4. Mitochondrie 5. Fibres denses 6. Axonème

En fonction de signaux ioniques appropriés, l'ATP fourni par les mitochondries est hydrolysé par les dynéine ATPases. Le mouvement est la conséquence du glissement l'un contre l'autre des doublets périphériques adjacents. Ce glissement résulte d'un cycle mécano-chimique d'attachement et de détachement successifs des bras de dynéine sur le doublet périphérique voisin. Lorsque le glissement inter-doublets produit par les dynéines est contraint par les structures constitutives de l'axonème, il en résulte une courbure. L'activité mécano-chimique des bras de dynéine se répétant de proche en proche tout le long du flagelle, cette courbure se déplace engendrant une onde flagellaire se propageant vers l'extrémité distale du flagelle responsable du déplacement actif de la cellule. Chez l'homme, l'onde flagellaire principale, formée à la base de la tête se propage dans le plan d'aplatissement de la tête du spermatozoïde en s'accroissant progressivement. Arrivée à mi-flagelle, une autre onde, mineure, s'initie et se propage en direction opposée, tandis que l'onde principale bascule dans un plan différent. Ceci entraîne l'ensemble de la cellule dans un mouvement de rotation de 180°. Résultant de ces rotations, la tête du spermatozoïde est animée, dans le plan d'analyse, d'un mouvement pseudo-sinusoidal de part et d'autre de son axe de progression. Le mouvement pseudosinusoidal, tel qu'on l'observe dans le sperme entier au microscope, va se modifier dans les voies génitales féminines en fonction des différents microenvironnements rencontrés.

Lors de leur remontée à travers le mucus cervical, les spermatozoïdes présentent des déplacements rectilignes et homogènes. L'amplitude de débattement latéral de la tête est beaucoup plus étroite que dans le plasma séminal du fait de la propagation d'ondes flagellaires de faible amplitude et les rotations cellulaires sont moins fréquentes. Ce mouvement typique est le résultat des contraintes externes exercées sur la cellule par la structure fibrillaire du mucus. Les forces générées par l'activité flagellaire jouent un rôle déterminant pour vaincre les résistances mécaniques du mucus. Les spermatozoïdes morphologiquement normaux pénètrent mieux le mucus cervical. Cet avantage résulte de leur meilleure mobilité et /ou du fait que les spermatozoïdes présentant une tête bien régulière, n'adhèrent pas au macromolécules du mucus.

Après avoir franchi le mucus cervical, le spermatozoïde doit atteindre l'ampoule tubaire et donc franchir la cavité utérine, la jonction utéro tubaire, la région de l'isthme et les deux tiers internes de la trompe. Si la nécessité d'un déplacement autonome et vigoureux du spermatozoïde pour franchir le mucus est évidente et bien documentée, il n'en est pas de même pour la traversée de ces différents compartiments anatomiques. Une activité flagellaire vigoureuse est nécessaire pour franchir l'ampoule, bien que la contractilité des muscles du tractus génital féminin et le battement ciliaire des cellules de l'épithélium tubaire contribuent à l'ascension des spermatozoïdes vers le site de la fécondation. Durant ce transport, la mobilité pourrait être temporairement abolie par le maintien des spermatozoïdes dans des « réservoirs » anatomiques. La concentration en ions potassium du milieu pourrait jouer un rôle déterminant dans l'abolition temporaire de la mobilité. Inversement, la mobilité pourrait être stimulée à des moments précis de la remontée vers le site de la fécondation.

La progression des spermatozoïdes ou au contraire leur immobilisation temporaire serait dépendante des différents états physiologiques du tractus, eux-mêmes sous contrôle de facteurs ovariens : de tels mécanismes pourraient coordonner le moment de l'ovulation avec la présence de spermatozoïdes potentiellement fécondants dans la trompe.

Le mouvement hyperactivé

Une certaine poussée générée par l'activité flagellaire est nécessaire au spermatozoïde pour pénétrer les enveloppes périovocytaires. Au cours du transit dans les voies génitales féminines. Les spermatozoïdes subissent un ensemble de modifications morphofonctionnelles regroupé sous le terme de capacitation. Parmi celles-ci, s'opèrent des changements de leur dynamique flagellaire, changements résultant en un mouvement caractéristique de la cellule appelé mouvement hyperactivé. Le passage d'un mouvement de type progressif à un mouvement de type hyperactivé est graduel. Comme la capacitation dont il dépend, il ne survient pas à un endroit précis du tractus génital féminin. Les changements de la dynamique flagellaire concernent l'augmentation de courbure et la symétrie de battement essentiellement dans la partie proximale du flagelle. Au microscope, le déplacement d'un spermatozoïde hyperactivé dans un milieu de faible viscosité est caractéristique: sa trajectoire est manifestement très incurvée et tortueuse avec une faible progression linéaire et un degré élevé d'oscillations de la tête autour de la trajectoire moyenne. Dans l'espèce humaine, le mouvement hyperactivé *in vitro* a pu être caractérisé grâce aux systèmes de microvidéographie par ordinateur (**Chapitre V**). Le mouvement hyperactivé est probablement déterminant pour : 1) le développement des forces nécessaires pour détacher des spermatozoïdes ayant adhéré au revêtement épithélial, 2) la facilitation des échanges des métabolites et des autres facteurs stimulants par une agitation du fluide réalisant le micro-environnement local du spermatozoïde, 3) la prévention du piégeage des spermatozoïdes dans les portions étroites et contournées du tractus, par une migration facilitée, 4) l'augmentation de la probabilité de rencontre avec le complexe cumulus-ovocyte par un volume balayé plus important et, 5) la pénétration au travers de la masse du cumulus et de la zone pellucide par une poussée accrue au niveau de la tête du spermatozoïde. Il est généralement admis que le mouvement hyperactivé concerne la majorité des spermatozoïdes qui ont quitté la région de l'isthme et migrent vers le site de la fécondation.

Dans la plupart des espèces mammifères, ce mouvement se manifeste *in vitro* pour une majorité de spermatozoïdes après quelques heures d'incubation dans divers fluides du tractus génital femelle ou dans des milieux synthétiques capacitants (**Chapitre V**), de composition proche de ces fluides. Chez l'homme, dans les conditions *in vitro*, on ne voit apparaître ce mouvement que pour une faible proportion de spermatozoïdes (environ 10-20%).

La capacitation

L'état de capacitation est lié à des modifications membranaires lipidiques (principalement, un efflux de cholestérol) et protéiques, augmentant notamment la fluidité de la membrane plasmique. La capacitation résulte à la fois d'une « dérépression » par séparation des spermatozoïdes du plasma séminal et d'une modulation positive de la part d'agents environnants du tractus génital féminin. Ce processus rend les gamètes mâles aptes à interagir avec le gamète femelle par exposition de ses récepteurs à la zone pellucide (ZP) et s'accompagne de l'établissement du mouvement hyperactif. Ce phénomène est réversible car les spermatozoïdes capités peuvent être « décapités » s'ils sont incubés à nouveau dans du plasma séminal.

Chez l'homme, la capacitation est un phénomène extrêmement complexe caractérisé par une variabilité inter - et intra- individuelle importante : son caractère abouti qui peut être testé *in vitro* est variable d'un spermatozoïde à l'autre et, en moyenne, d'un échantillon de spermatozoïdes à un autre. Il a été montré que la capacité fécondante des spermatozoïdes d'hommes féconds, évaluée sur leur capacité à pénétrer des ovocytes dépellucidés de hamster ([Chapitre V](#)), nécessitait des temps variables de capacitation compris en moyenne entre 2 et 18 heures.

Fixation à la zone pellucide (ZP)

Après avoir traversé le cumulus oophorus, le spermatozoïde qui présente un acrosome intact se fixe de façon spécifique à la ZP ([Figure 8](#)). Chez la souris, la zone pellucide est composée d'un réseau de trois glycoprotéines, ZP1, ZP2 et ZP3. ZP1 forme des ponts disulfure avec des filaments composés de la répétition d'hétérodimères ZP2/ZP3. On connaît depuis une vingtaine d'années le rôle de ZP3 dans la reconnaissance, la fixation primaire du spermatozoïde à la zone pellucide et l'induction de la réaction acrosomique. ZP2 intervient dans la fixation secondaire des spermatozoïdes à la zone pellucide. La nature du ou des récepteurs spermatiques impliqués dans la liaison avec ZP3 est encore méconnue. Au moins deux douzaines de protéines différentes ont été identifiées (par exemple, le récepteur glycine couplé à un canal chlore, une β -1,4- galactosyltransferase ou la Zona Receptor Kinase) mais aucune n'a été formellement reconnue comme étant « le » récepteur à ZP3.

Réaction acrosomique (RA)

Une fois lié à la ZP, le spermatozoïde subit la RA, pré requis indispensable à la fécondation. C'est un phénomène irréversible d'exocytose et d'activation des enzymes protéolytiques contenues dans l'acrosome.

Situé dans la partie antérieure de la tête sous la membrane plasmique et recouvrant les deux tiers antérieurs du noyau, l'acrosome, organite cellulaire dérivé de l'appareil de Golgi, contient plusieurs enzymes protéo-glycolytiques telles que la hyaluronidase, la phosphatase acide ou la pro-acrosine. Classiquement, on décrit l'acrosome comme une vacuole entourée par la membrane acrosomique externe et la membrane acrosomique interne. Les deux membranes acrosomiques ont une composition antigénique différente, caractéristique importante pour la mise en évidence de la réaction acrosomique. L'analyse en microscopie électronique de spermatozoïdes a permis d'identifier plusieurs étapes morphologiques de la RA. Dans un premier temps, la matrice acrosomique diffuse. Cette première étape est suivie par une fusion en de multiples points entre les membranes acrosomiques externe et plasmique avec pour conséquence une vésiculation de la membrane et une exposition de la membrane acrosomique interne. À l'issue de la RA, la membrane plasmique du spermatozoïde ne subsistera que dans une portion appelée le segment équatorial (qui jouera un rôle dans la fusion avec la membrane ovocytaire). La RA est initiée par un influx calcique provenant du compartiment extra-cellulaire.

S'associent une augmentation du pH interne, une activation de différentes voies enzymatiques telles que celles de la phospholipase C, la protéine kinase C, l'adénylate cyclase, la phospholipase A2 ou les tyrosines kinases. Seuls les spermatozoïdes ayant effectué la RA sont capables de traverser la ZP, de se lier à la membrane ovocytaire et de fusionner avec l'ovocyte. Après avoir effectué la RA, le spermatozoïde se fixe plus solidement à la ZP (fixation secondaire ; rôle de ZP2 chez la souris) et la pénètre. La fixation secondaire ferait intervenir des protéines transmembranaires spermatiques appartenant à la famille ADAM et des récepteurs de type intégrine sur le versant ovocytaire.

Fusion avec la membrane ovocytaire

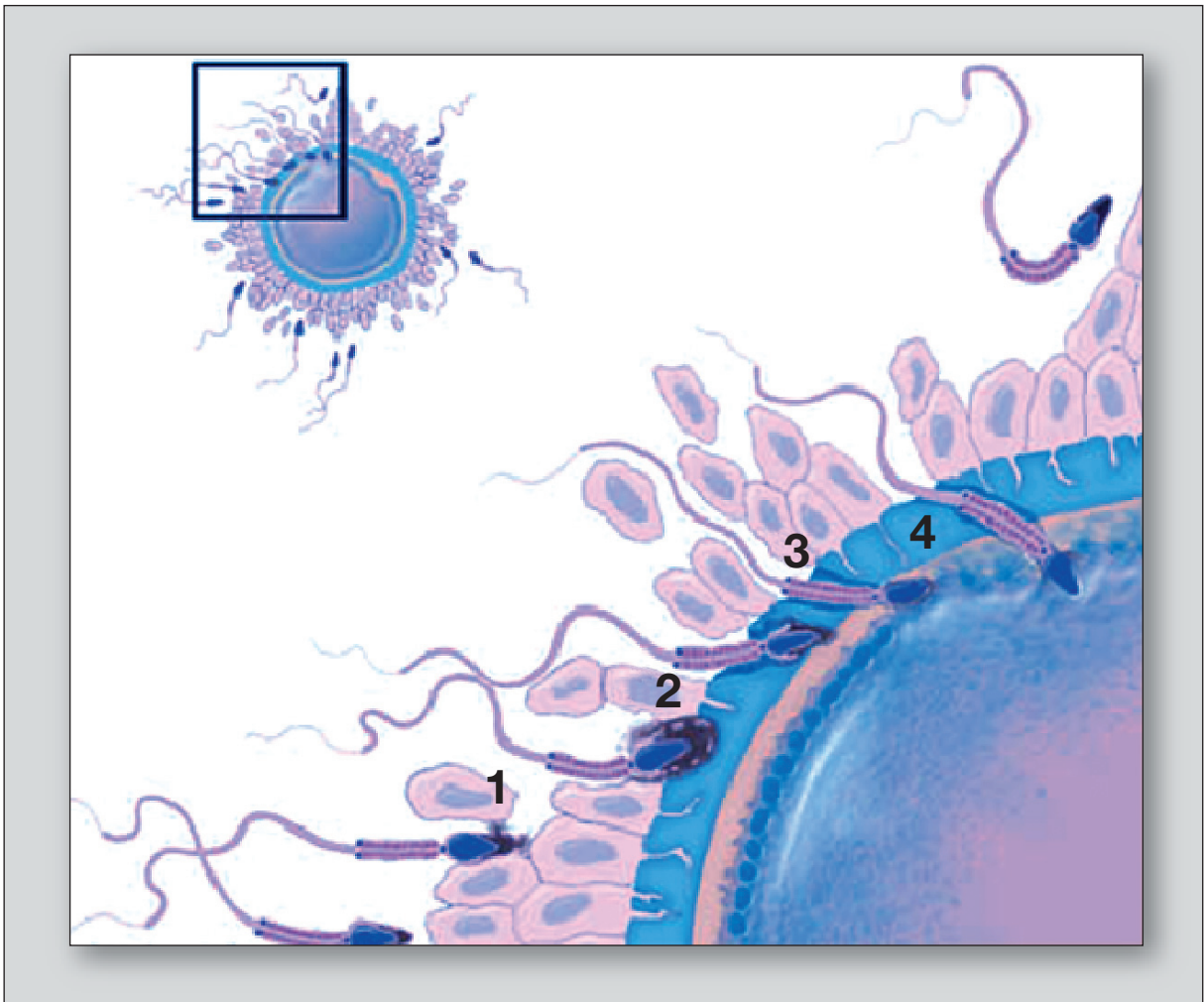
L'espace périvitellin atteint, le spermatozoïde acrosome-réagi se lie à la membrane ovocytaire avec laquelle il fusionne (en position tangentielle au niveau des régions sous-équatoriale et équatoriale de la tête) (Figure 8). Les mécanismes moléculaires impliqués sont des mécanismes généraux intervenant dans la fusion des cellules (myoblastes, virus-cellules hôtes par exemple).

De la pénétration dans l'ovocyte à la première division embryonnaire

La membrane plasmique du spermatozoïde sera intégrée à celle de l'ovocyte au cours de la fusion, la membrane acrosomique interne, le noyau et le flagelle du spermatozoïde seront incorporés dans l'ovocyte. La fusion du spermatozoïde induit l'exocytose des granules corticaux qui modifie la ZP (réaction zonale) de façon à empêcher la liaison et la pénétration d'autres spermatozoïdes : c'est un véritable blocage à la polyspermie.

Après la fusion avec l'ovocyte le spermatozoïde doit pénétrer dans l'ovocyte (Figure 8) et subir une dernière modification : la transformation de son noyau en pronucleus. Chez l'homme et les mammifères en général, on ne dispose que très peu de données sur ce sujet. L'ovocyte semble jouer un rôle majeur. La membrane nucléaire est éliminée, la chromatine se disperse. Les facteurs connus de cette dispersion, tels la réduction des ponts disulfure, la dégradation protéolytique des nucléoprotéines ou, la modification de la charge des nucléoprotéines, résultent d'une interaction de la chromatine avec différents composants de l'ooplasmе dépendant elle-même de l'état de maturité de l'ovocyte. Les conséquences principales de cette interaction sont le remplacement des nucléoprotéines basiques par des histones, la transformation de la chromatine inactivée d'origine paternelle en une chromatine de type somatique présentant une activité transcriptionnelle et la formation du pronucleus après reconstitution d'une membrane. L'étape ultime est la syngamie ou fusion des deux pronuclei mâle et femelle, prélude à la première division embryonnaire.

Figure 7 : Etapes initiales de l'interaction gamétique : traversée du cumulus (1) ; fixation à la zone pellucide et induction de la réaction acrosomique (2) ; pénétration de la zone pellucide (3) et fusion avec membrane ovocytaire (4)



Bibliographie

- M. Catala. Embryologie : Développement précoce chez l'humain, 2006, 3^{ème} ed. Abrégé Masson éditeur.
- C. Thibault, M.C. Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle édition entièrement refondue et mise à jour, 2001, Ellipses Marketing Editions.
- E. Knobil E, J.D. Neill, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press ; 1994
- Perreault S.D. and Rogers B.J. (1982) Capacitation pattern of human spermatozoa. Fertil. Steril., 38, 258-260.
- C. Patrat, C. Serres and P. Jouannet. The acrosome reaction in human spermatozoa. Biology of the Cell 2000, 92, 255–266
- Wassarman PM. (1999) Mammalian fertilization : Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. Cell 96 : 175-183

**L'appareil génital mâle :
contexte des explorations
biocliniques
et stratégies thérapeutiques**

CHAPITRE II

Contexte(s) de la biologie de la reproduction et de l'analyse du sperme ; l'andrologie ; les définitions en reproduction humaine ; les étiologies des infécondités et hypofertilités masculines

Dans les pays développés, la réalisation des procédures/tests/actes de biologie de la reproduction est étroitement associée au diagnostic et au pronostic des infécondités du couple avec des aspects interventionnels dans le cadre de l'aide médicale à la procréation (AMP). Il faut cependant noter qu'un certain nombre des tests décrits dans le présent cahier sont appliqués dans d'autres domaines qui sont ceux de la médecine vétérinaire, de la toxicologie de la reproduction ou encore de la recherche humaine ou animale.

L'andrologie et l'évaluation clinique des hypofertilités masculines

Avant l'avènement de l'AMP et des approches modernes de biologie de la reproduction, lors de l'exploration des infécondités, la femme était souvent implicitement mise en cause en premier lieu dans cet état de fait : il n'était pas rare de voir ainsi des bilans d'infécondité débiter par des explorations lourdes, coûteuses et comportant parfois un risque, bien que faible. Par la suite, des études épidémiologiques ont indiqué que les facteurs en cause concernent chacun des partenaires pratiquement dans les mêmes proportions, des facteurs d'infécondité étant retrouvés chez les deux partenaires pour un nombre important de situations (Tableau 1).

Tableau 1 : Part respectives des facteurs masculins et féminins dans les infécondités du couple (n=1318, d'après Thonneau et al., 1991)

		Partenaire Féminin	
		+ ♂	- ♀
Partenaire Masculin	+ ♂	38 %	20 %
	- ♀	34 %	8 %

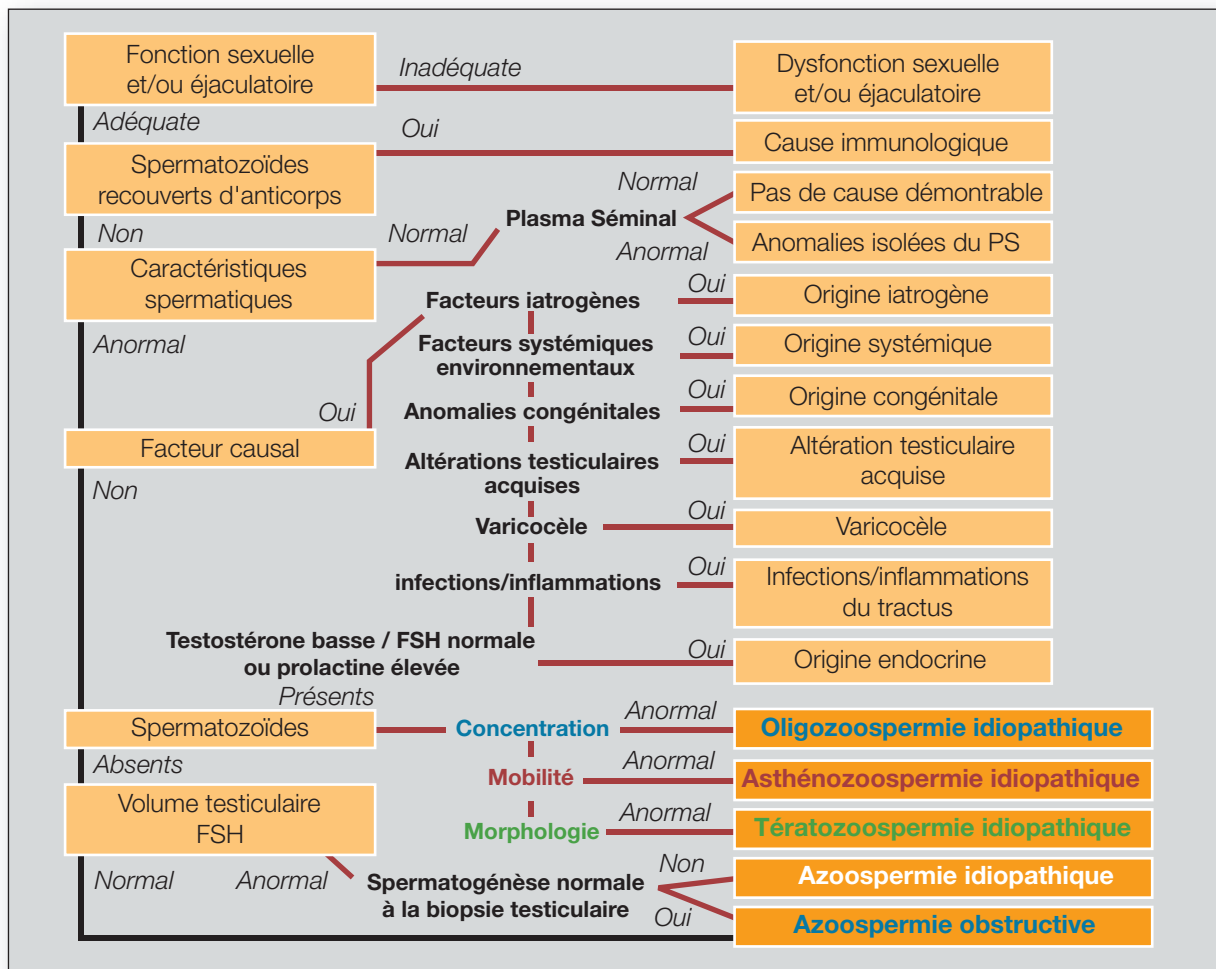
Aussi, l'exploration de l'homme devrait donc être entreprise pour tout couple consultant pour une infécondité et cela dès le début des investigations. En effet, l'exploration de l'homme, facile à mettre en oeuvre, relativement peu coûteuse et sans risque notable, permet souvent d'arriver rapidement au diagnostic d'une des différentes étiologies des hypofertilités et infécondités masculines (Figure 1).

Dans le champ clinique et s'agissant de l'infécondité du couple, il ne fait aucun doute qu'une prise en charge efficace nécessite la compétence de médecins spécialisés dans le domaine de la reproduction pour ce qui est de la partenaire et de médecins compétents sur les aspects relatifs au partenaire masculin. Ces derniers souvent qualifiés d'andrologue peuvent à l'origine être des gynécologues,

urologues, endocrinologues, médecins biologistes, etc... qui ont suivi des formations spécifiques en andrologie, cette « discipline » n'étant pas officiellement reconnue en France comme une spécialité à part entière à la différence d'autres pays (même s'il existe des formations qualifiantes, DESC, DU, etc...). L'andrologie (du grec *andros*, homme) est un domaine de la médecine s'intéressant à la santé masculine, son champ concernant principalement deux aspects connexes, la sexualité, la fertilité et leurs pathologies. En général, les pratiques des andrologues sont le plus souvent axées sur l'un ou l'autre de ces domaines. S'agissant de l'exploration, du suivi et du traitement des hypofertilités masculines, il ne faut pas perdre de vue que la plupart des procédures décrites dans ce manuel correspondent à des « examens complémentaires » qui tout comme dans les autres champs de la médecine font partie de stratégies diagnostiques ou thérapeutiques où de nombreux facteurs entrent en jeu.

Il existe des facteurs, physiologiques, cliniques, liés au style de vie, à la psychologie qui peuvent concerner chaque partenaire isolément, souvent les deux et qui vont moduler plus ou moins la santé reproductive. On comprend ainsi la difficulté qu'il peut y avoir à déterminer des valeurs de références de la qualité du sperme dans un système fondamentalement multifactoriel et qu'à l'opposé, les résultats de l'analyse de sperme ne doivent pas faire l'objet d'une surinterprétation : bien qu'existante, leur corrélation avec des indices de fertilité - tels la probabilité d'observer la grossesse en un temps donné ou bien le délai nécessaire à concevoir est relativement faible.

Figure 1 : Différentes étiologies des infécondités et hypofertilités masculines : arbre diagnostique, d'après l'OMS (1992)



La stratégie de l'exploration andrologique de l'homme infécond (**Tableau 2**) se fonde sur un interrogatoire, notamment à la recherche d'antécédents médicaux, chirurgicaux ou génito-urinaires. Le schéma étiologique et diagnostique proposé par l'OMS, (**Figure 1**), résume les informations d'intérêt. Un examen clinique, notamment l'examen des bourses, l'appréciation de l'imprégnation androgénique, etc..., des examens de laboratoire variés, principal objet de ce cahier de formation, éventuellement divers autres explorations paracliniques telles que des échographies du contenu scrotal et du carrefour prostatique sont parfois utiles.

Il est important que les deux membres du couple soient présents lors de la consultation andrologique et particulièrement lorsque les conclusions des approches diagnostiques font envisager un probable recours à l'aide médicale à la procréation.

Définitions

Fécondité/Infécondité

Le concept est celui d'un état : avoir été impliqué (ou non) à un moment donné dans l'obtention d'une grossesse/ la naissance d'un enfant (fécondité/infécondité). Selon l'OMS, l'infécondité (infertility en anglais) est définie comme l'absence de survenue d'une grossesse après un an au moins de rapports sexuels non protégés. Cette définition demeure controversée pour ce qui est de la durée. En tout cas, il faut revenir sur le rôle du facteur temps. Il faut aussi souligner que l'infécondité touchant le couple en cours d'exploration peut avoir concerné lors d'union(s) passée(s) l'un ou l'autre des partenaires : cette information (ou son contraire : grossesses, enfants, fausses couches, IVG, etc...) est particulièrement importante à noter.

Fertilité/Infertilité/Hypofertilité

Le concept est celui de la capacité : les facteurs cliniques et biocliniques considérés comme nécessaires pour parvenir à une grossesse sont-ils réunis chez l'un et l'autre des partenaires ? On emploie souvent à tort ces termes pour faire référence à la fécondité/infécondité, une des causes probables étant la non correspondance des termes en français et en anglais : en anglais, unfecundity = infertilité et infertility = infécondité !

On ne devrait employer le terme d'infertilité que si l'on a l'assurance qu'un facteur ou un ensemble de facteurs compromettent très fortement la probabilité de grossesse. En dehors de cas extrêmes comme l'azoospermie ou l'obstruction bilatérale des trompes, il n'est pas possible d'assurer que la grossesse ne pourra survenir. Le facteur temps importe beaucoup. Il est clair aussi que la mise en évidence de plusieurs facteurs négatifs diminue d'autant la probabilité d'observer la grossesse dans un délai acceptable, une année par exemple. Pour ces raisons, il est donc plus logique d'utiliser le terme d'hypofertilité plutôt que celui d'infertilité.

Lorsque le partenaire masculin a déjà été responsable d'une grossesse, avec la partenaire présente ou une autre partenaire et quel que soit le temps écoulé depuis cette grossesse, on emploie généralement le terme d'infertilité secondaire, même chose pour la partenaire ayant antérieurement été enceinte au sein de ce couple ou d'une union précédente.

Concernant l'homme dans cette situation (fécond mais secondairement hypofertile), la chance d'obtention d'une grossesse est statistiquement plus importante qu'en cas d'infécondité primaire, certaines étiologies comme des anomalies congénitales, étant moins probables. Au contraire l'examen retrouvera plus souvent une étiologie acquise telle une obstruction épидидymaire ou les séquelles d'une orchite, pouvant conduire à des anomalies spermatiques quantitatives et/ou qualitatives sévères.

Stérilité

Ce terme souvent employé à tort définit les rares situations où l'obtention d'une grossesse naturelle est impossible, par exemple, les deux cas cités ci-dessus de l'azoospermie (vérifiée sur plusieurs examens) ou de l'obstruction bilatérale des trompes.

Délai d'infécondité

Nombre total de cycles (qu'on approxime généralement en mois) écoulés - à un instant T, généralement le moment où le couple consulte - dans la situation de non survenue de la grossesse après tout arrêt de mesures anticonceptionnelles (pilule, stérilet, préservatif, rapports programmés, etc...).

Remarque

La détermination la plus précise du temps $T=0$, moment de l'arrêt des mesures anticonceptionnelles est cruciale pour estimer précisément ce délai. De ce point de vue, il est particulièrement important de rechercher si les deux partenaires du couple ont été en présence l'un de l'autre durant toute cette période, ce qui n'est pas toujours le cas (séparation ponctuelle, motifs professionnels, etc...) : dans la négative il faudra corriger le délai d'infécondité.

Délai nécessaire à concevoir, DNC

Nombre de cycles (qu'on approxime généralement en mois) nécessaires pour parvenir à une grossesse après tout arrêt de mesures anticonceptionnelles (pilule, stérilet, préservatif, rapports programmés, etc...). Les remarques concernant le délai d'infécondité, importance de déterminer précisément le T0 et d'éventuellement soustraire les périodes où les deux membres du couple n'ont pas été en présence, s'appliquent.

Fécondabilité

Fécondabilité, $f = 1/\text{DNC}$. Elle s'exprime en pourcentage. Dans les pays développés et chez des couples en bonne santé, elle est de l'ordre de 20 à 25 % : en d'autres termes, il faut en moyenne 4-5 cycles pour concevoir.

Remarque : importance du facteur temps

Le facteur temps joue un rôle important : 60 % des couples conçoivent dans les six mois suivant l'arrêt de toute mesure anticonceptionnelle, 90 % dans les 18 mois. Ces chiffres indiquent que la non survenue de la grossesse dans la première année n'est pas forcément liée à des facteurs notables d'hypofertilité : lors d'une première évaluation globale, il faut tenter d'estimer les situations qui ne nécessitent pas la mise en route d'un bilan rapide afin de laisser la chance de l'obtention d'une grossesse naturelle. Au contraire, passé le délai de 18 mois d'infécondité, la fécondabilité étant alors de 5% (par cycle), le facteur temps joue comme un facteur de "sélection des inféconds" et il y a très vraisemblablement un ou des facteurs masculins et/ou féminins responsable de ce délai, il est donc impératif de mettre en œuvre les explorations. Il est important de tenir compte de ces données mais aussi de l'âge de la partenaire ou encore du degré de détresse psychologique généré par l'infécondité, pour décider du moment le plus opportun pour débiter les explorations.

Tableau 2 : Évaluation andrologique de l'homme infécond : Aspects cliniques, paracliniques et biologiques à explorer

A. Interrogatoire	Fertilité / sexualité	<ul style="list-style-type: none"> - Évaluation de la durée d'infécondité - Antécédents fécondité/fertilité : couple / homme auparavant / femme auparavant - Antécédents d'AMP - Sexualité du couple
	Style de vie / profession	<ul style="list-style-type: none"> - Risques professionnels - Risques liés au style de vie (alcool, tabagisme, sédentarité, sommeil, stress, etc...)
	Antécédents médicaux et chirurgicaux généraux	<ul style="list-style-type: none"> - Diabète, hypertension, dépression, etc...
	Prise de médicaments	<ul style="list-style-type: none"> - Importante à une période cruciale du développement et/ou prolongée dans le temps - Lesquels ? À quel âge ? Pendant combien de temps ? À quelle dose ?
	Antécédents génito-urinaires	<ul style="list-style-type: none"> - Ectopie testiculaire uni ou bilatérale, traitée ou non, antécédant de lithiases, cure de varicocèle, hydrocèle, hernie inguinale, etc... - Infections urinaires et génitales, etc...
	Fertilité dans la famille de l'homme	
B. Examen clinique	Examen général	<ul style="list-style-type: none"> - Taille, Poids - Gynécomastie, évaluation du degré d'imprégnation androgénique, pilosité - Recherche de cicatrices (orchidopexie, cure de hernie, etc...)
	Examen des bourses	<ul style="list-style-type: none"> - Position et axe, évaluation du volume testiculaire, consistance - Palpation des épидидymes, des canaux déférents - Recherche d'un varicocèle, etc...
	Examen du pénis	<ul style="list-style-type: none"> - Taille, - Hypospadias, etc...
C. Examens biologiques et autres explorations (antérieurs ou à prescrire)	Analyse de sperme	<ul style="list-style-type: none"> - Spermogrammes antérieurs ?
	Autres explorations de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Test post coïtal - Recherche d'anticorps antispermatozoïdes - Caryotype, Sérologies, Tests fonctionnels - Biochimie du plasma séminal - Spermoculture, etc...
	Examens paracliniques additionnels	<ul style="list-style-type: none"> - Dosage hormonaux - Echographies, etc...

Stratégies « thérapeutiques » et alternatives des infertilités masculines

Dans l'immense majorité des situations d'infécondité d'origine masculine, il n'existe pas de traitement médical ou chirurgical classique permettant d'améliorer la fertilité. En dehors des situations exceptionnelles où l'andrologue détecte un (ou plusieurs) cofacteur(s) modifiable(s) (bains chauds répétitifs prolongés nuisant à la thermorégulation testiculaire, par exemple), ou une étiologie accessible à un traitement médical (hypogonadisme hypogonadotrope) ou chirurgical (anastomose épидидymo-déférentielle), l'arsenal thérapeutique se limite aux approches de l'AMP. Comme son nom l'indique l'AMP ne vise pas à traiter les facteurs en cause afin de restaurer les conditions de l'expression de la fertilité naturelle mais contribue par contre à augmenter très significativement les chances qu'un couple a de mener à bien un projet d'enfant. À cet égard, des approches alternatives fondées sur l'association des techniques d'AMP et du don de gamète, peuvent constituer une approche acceptable chez des couples présentant une cause majeure d'infertilité (don de sperme pour stérilité masculine par azoospermie sécrétoire par exemple ou encore, don d'ovocyte pour insuffisance ovarienne primitive, en cas de syndrome de Turner, par exemple). Ces approches alternatives peuvent aussi s'appliquer à la situation de couples naturellement fertiles mais où la grossesse naturelle fait courir un risque majeur de pathologie génétique grave chez le conceptus du fait d'une anomalie génétique transmissible dans la descendance *via* les gamètes de l'un ou l'autre des partenaires.

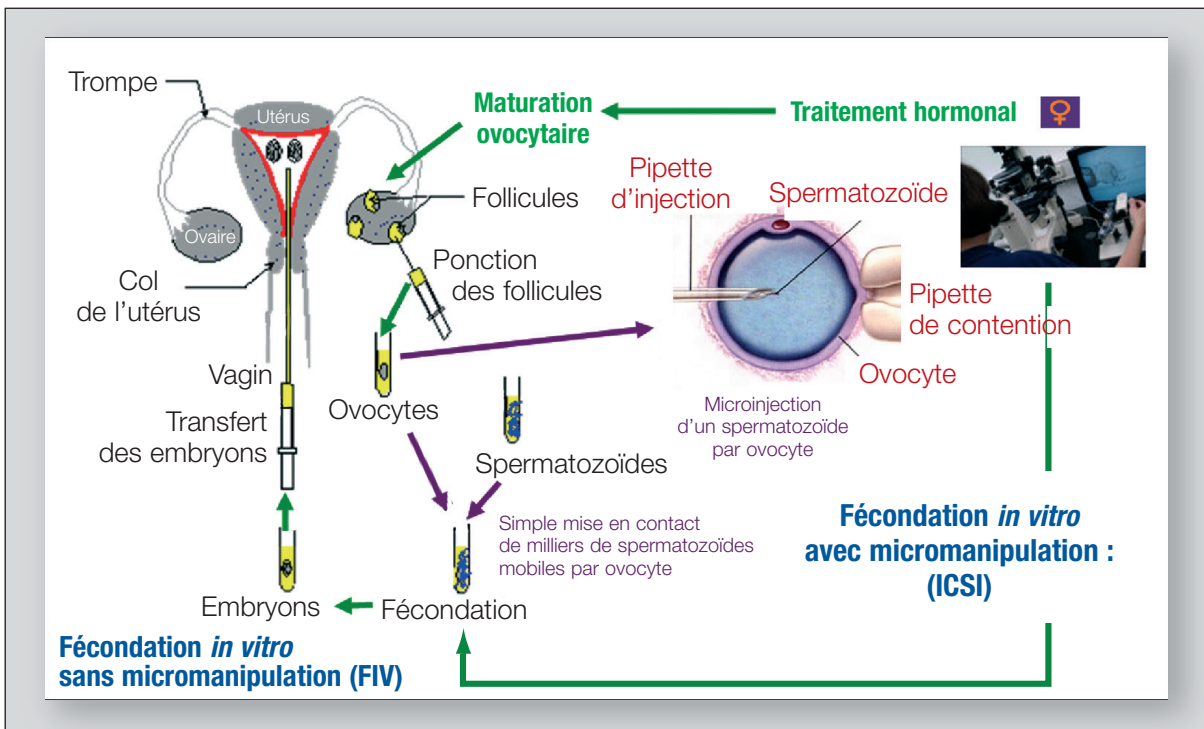
Toutes les approches développées dans le domaine de l'AMP intra conjugale et de l'AMP par don (gérée en France principalement en partenariat avec les CECOS), reposent - en dehors de l'accueil d'embryon qui en théorie s'adresse à des couples où les facteurs majeurs d'infertilité existent chez les deux partenaires - sur deux grandes modalités techniques :

- les inséminations, se caractérisant principalement par l'obtention d'une grossesse *in vivo* et
- la fécondation *in vitro* sans (FIV) ou avec micromanipulation (ICSI) se caractérisant, comme son nom l'indique, par l'obtention de la fécondation en dehors de l'organisme, après mise en culture des ovocytes et des spermatozoïdes dans des milieux synthétiques aboutissant à la génération d'embryons transférables dans la cavité utérine.

Des textes réglementaires encadrent aussi bien les pratiques d'AMP intra conjugale que les AMP par don. L'Agence de BioMédecine (ABM) a pour mission notamment de veiller au respect de ces règlements ([Annexe 7](#)).

L'insémination est la plus ancienne des techniques d'AMP. C'est en 1791 qu'a été rapportée la première naissance d'un enfant après insémination artificielle. John Hunter, chirurgien anglais, avait introduit dans les voies génitales d'une femme le sperme de son époux porteur d'une malformation du pénis et de l'urètre. Par la suite, de nombreuses controverses ont opposé les praticiens, en général assez favorables à cette thérapeutique, aux juges et aux représentants religieux, scandalisés par cette « création d'enfant sans l'approche des deux sexes ». Dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, avec le développement des techniques de préparation du sperme et la meilleure maîtrise de l'ovulation, l'insémination intra-utérine est devenue la méthode d'AMP la plus largement pratiquée. Ses indications, en ont été précisées : l'impossibilité du transport des spermatozoïdes dans la cavité utérine du fait d'un problème au niveau du col de l'utérus, le plus souvent dû à un mucus cervical de mauvaise qualité et ne pouvant être amélioré et certaines anomalies quantitatives et qualitatives du sperme.

Figure 2 : Différentes étapes de la FIV classique et avec micromanipulation (ICSI)



À la fin des années 70 sont réalisées les premières FIV dans l'espèce humaine. C'est en 1978 que naît Louise Brown, premier bébé conçu par FIV. La première indication de la FIV est l'obstruction bilatérale des trompes. Les insuffisances quantitatives et qualitatives du sperme deviendront rapidement l'autre indication majeure.

À partir du début des années 90, l'ICSI, technique dérivée de la FIV, voit le jour. Les indications majeures en sont toutes les situations d'insuffisance spermatique quantitative et/ou qualitative ne permettant pas d'espérer un succès en FIV ou les échecs répétés de la FIV.

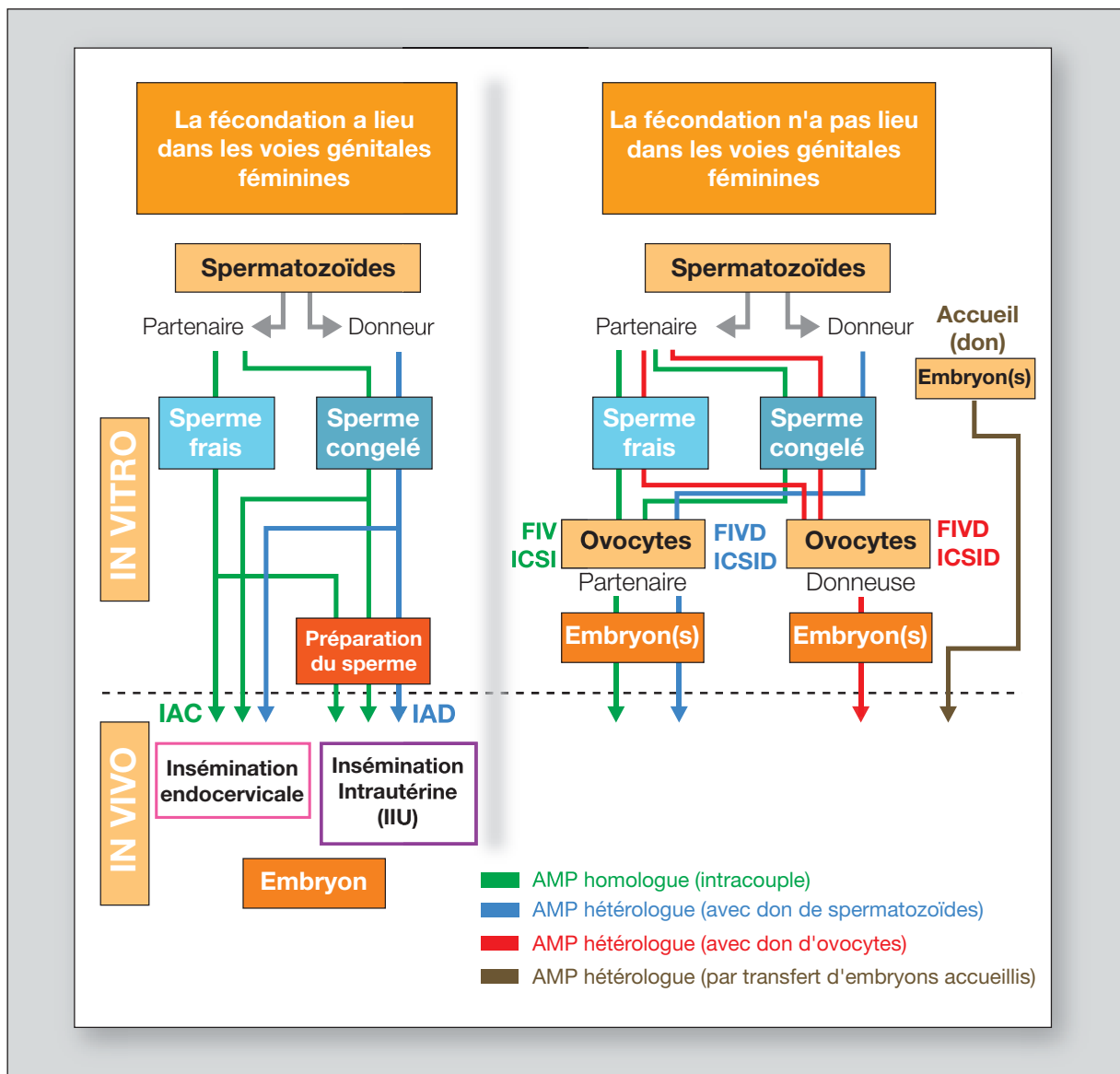
Une variante de l'ICSI, l'IMSI (microinjection de spermatozoïde morphologiquement sélectionné dans le cytoplasme de l'ovocyte) a récemment été proposée pour tenter de pallier aux échecs répétés de grossesse en ICSI, dans des situations où il y a des raisons de penser que la constitution du spermatozoïde pourrait être en cause. Dans cette technique, le spermatozoïde est grossi d'un facteur x6000 environ et ne sont retenus pour la microinjection que les spermatozoïdes présentant une morphologie céphalique normale ou subnormale. Cette approche qui semble prometteuse est en cours d'évaluation.

Enfin, depuis la moitié des années 1990, la micro-injection peut être aussi pratiquée avec des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement au niveau du testicule ou de l'épididyme en cas d'azoospermie obstructive ou non obstructive.

La FIV et l'ICSI ont subi un développement considérable et en Europe, plus de 300 000 tentatives sont pratiquées chaque année, aboutissant à la naissance de milliers d'enfants.

Pour plus de détails, sur les aspects techniques et organisationnels qui sortent du cadre de cet ouvrage, on se référera aux nombreuses sources documentaires disponibles sur Internet, notamment celles de l'Agence de la Biomédecine.

Figure 3 : Les différentes modalités d'AMP intracouple et avec don



IAC : Insémination avec sperme du conjoint ; IAD : Insémination avec spermatozoïdes de donneur ;

FIVD : Fécondation in vitro sans micromanipulation avec don ; ICSID : Fécondation in vitro avec micromanipulation avec don

Bibliographie

- Schill, W.-B. ; Comhaire, F.H. ; Hargreave, T.B. (Réd.) Traité d'andrologie à l'usage des cliniciens. Traduction française, R. Mieusset, 2008. Springer, Paris
- Sites thématiques de l'Agence de la Biomédecine :
 - procreationmedicale.fr
 - dondovocytes.fr
 - dondespermatozoides.fr

**Méthodologie (1)
tests standard :
spermogramme-
spermocytogramme
et tests d'interaction
des spermatozoïdes
avec le mucus cervical**

CHAPITRE III

L'analyse de routine du sperme (spermogramme et spermocytogramme)

L'infertilité masculine se présente initialement comme une infécondité du couple. Aussi la question qui se pose est : quelle est la part respective des facteurs féminins et masculins contribuant à cette infécondité ? C'est pourquoi les deux partenaires doivent être explorés de manière rationnelle et progressive. En pratique, l'examen du sperme communément appelé spermogramme-spermocytogramme est l'un des deux examens de base (l'autre étant le test post-coïtal ou test de Hühner) qui s'impose en l'absence de grossesse après un à deux ans de rapports sexuels normaux, réguliers et non protégés). Le mot spermogramme désigne tous les tests réalisés à l'état frais. Le mot spermocytogramme désigne l'analyse cytologique faite dans un second temps à partir d'un frottis coloré.

Le spermogramme-spermocytogramme reflète, entre autre, les étapes de production, formation et maturation des spermatozoïdes dans les deux mois et demi précédant l'examen, période correspondant approximativement à un cycle complet de la spermatogenèse suivi de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme.

Cet examen (Figure 1) fournit :

- Des informations indirectes sur l'état de la voie génitale et des glandes associées, prostate et vésicules séminales (leurs sécrétions constituent le plasma séminal auquel viennent s'ajouter les spermatozoïdes au moment de l'éjaculation)
- Une évaluation globale sur les aspects qualitatifs et quantitatifs concernant les spermatozoïdes et les autres cellules présentes dans le sperme, très importante pour le diagnostic, parfois décisive pour la conduite à tenir (par exemple, absence de spermatozoïdes, immobilité de l'ensemble des spermatozoïdes ou, anomalie morphologique touchant la majorité des spermatozoïdes examinés).

Il faut cependant considérer que cet examen ne peut en aucun cas définir la capacité fécondante des spermatozoïdes d'un individu puisqu'il mesure un ensemble de caractéristique globales du sperme et n'évalue en aucun cas les capacités fonctionnelles de la sous population de spermatozoïdes susceptible d'atteindre le site de la fécondation.

Il est évident que la qualité d'un échantillon de sperme dépend des conditions dans lesquelles il a été produit. La collecte du sperme dans une pièce dédiée dans le laboratoire ou au voisinage du laboratoire est une recommandation de l'OMS. Un stress important peut être associé à la production d'un éjaculat par masturbation notamment dans les situations où cette pratique est rare ou exceptionnelle ou encore lorsque un contexte culturel ou religieux peut faire barrage à la masturbation.

Dans des conditions données, la qualité du sperme dépend de facteurs ne pouvant être modifiés, par exemple le niveau de production de spermatozoïdes par les testicules (ou rendement de la spermatogenèse) ou encore, le niveau de sécrétion des glandes associées contribuant au volume de l'éjaculat, un épisode fébrile récent, etc...

Il est par contre clair que les caractéristiques de l'éjaculat sont influencées par une série de facteurs qui doivent retenir l'attention du clinicien et/ou du biologiste, par exemple :

- L'activité des glandes associées qui contribue à diluer plus ou moins les spermatozoïdes produits, la concentration spermatique étant ainsi un assez mauvais reflet du rendement de la spermatogenèse
- Le temps écoulé depuis la dernière éjaculation, habituellement qualifié de « délai d'abstinence sexuelle » influençant, volume de l'éjaculat, concentration de spermatozoïdes, vitalité et mobilité des spermatozoïdes
- La notion que l'éjaculat produit n'est peut être pas complet (perte d'une partie de l'éjaculat lors du recueil), ou encore
- Des erreurs analytiques, etc...

Figure 1 : Compte rendu type d'un spermogramme-spermocytogramme

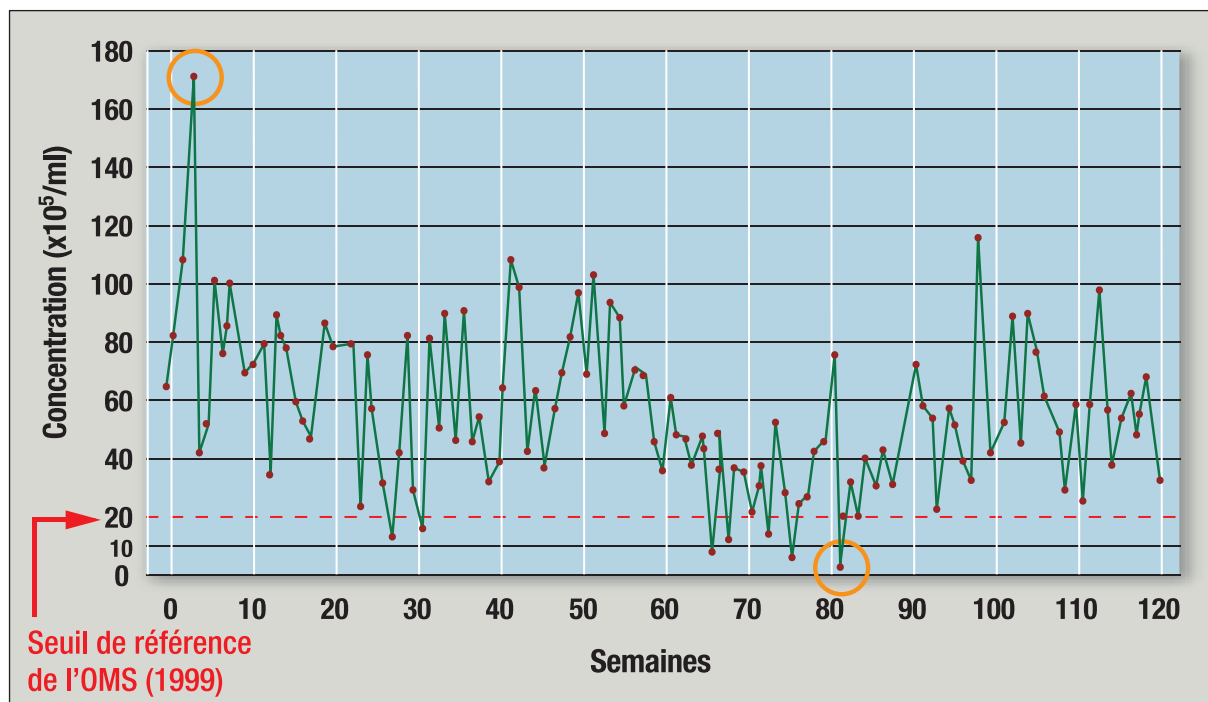
INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées			
Nom :	Prénom :	N° Dossier :	Prescripteur :
Date de naissance :	Date :	Délai d'abstinence (j) :	Lieu de recueil :
SPERMOGRAMME			
VOLUME :	ml	pH :	Viscosité : normale <input type="checkbox"/> augmentée <input type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/>
CONCENTRATION :		x 10 ⁶ spermatozoïdes/ml	x 10 ⁶ cellules rondes/ml
NUMÉRATION TOTALE :		x 10 ⁶ spermatozoïdes	
MOBILITÉ:		à heure	à heure
		Sur x spermatozoïdes	Sur x spermatozoïdes
Progressifs (P)	Rapide et progressif (a)	%	} a + b : %
Non progressifs (NP)	Lent et progressif (b)	%	
Immobilés (I)	Mobile sur place (c)	%	
	Immobilé (d)	%	
VITALITÉ :	%	Présence d'agglutinats : <input type="checkbox"/>	
SPERMOCYTOGRAMME			
Sur x spermatozoïdes observés	SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES :		%
	TÊTE	PIÈCE INTERMÉDIAIRE	FLAGELLE
	Allongée :	Reste cytoplasmique :	Absent :
	Amincie :	Grêle :	Écourté :
	Microcéphale :	Angulée / désaxée :	Calibre irrégulier :
	Macrocéphale :		Enroulé :
	Tête multiple :		Multiple :
	Région post-acrosomique anormale :		
	Région acrosomique anormale :	INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) :	
	Flagelles isolés :	Polynucléaires :	
	Spermatozoïdes en lyse :	Autres cellules :	
	Cellules de la lignée germinale :		
Remarques :			

CONCLUSIONS			

La Figure 2 ci dessous présentée dans plusieurs éditions successives du Manuel de l’OMS pour l’exploration du sperme et de l’interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical se rapporte aux variations enregistrées de la concentration de spermatozoïdes chez un même individu à raison de prélèvements effectués plusieurs fois par mois sur une longue période. Elle montre des écarts qui peuvent être très importants et notamment des prélèvements pour lesquels une concentration très basse a été trouvée. Cette figure illustre parfaitement le fait qu’une partie importante de la grande variabilité intra individuelle des caractéristiques du sperme dépend sans aucun doute de facteurs incontrôlables (parfois incontrôlés !). Il en résulte une conséquence majeure pour l’interprétation d’une analyse de sperme : il est impossible de caractériser le sperme d’un patient à partir d’une seule analyse de sperme, le corollaire étant qu’il est nécessaire de disposer d’au moins deux analyses, parfois plus (Figure 2), pour se fonder une opinion sur les valeurs moyennes des caractéristiques quantitatives et qualitatives du sperme.

Dans le but de fournir des informations précises, complètes et valides pour le diagnostic et le pronostic, tous les aspects pré analytiques, analytiques et post analytiques de l’analyse du sperme nécessitent d’être optimisés et notamment les actes techniques non accessibles à l’automatisation et reposant essentiellement sur le facteur humain.

Figure 2 : Variations intra-individuelles de la concentration de spermatozoïdes avec des intervalles quasi constants entre prélèvements (d’après C.A. Paulsen, données non publiées)



Le spermogramme

Aspects préanalytiques

Lors de la prise de rendez-vous :

- Le sujet doit recevoir des informations claires, par écrit ou par oral, sur les modalités du recueil et éventuellement du transport du prélèvement
- Il est impératif de recommander un délai d’abstinence sexuelle de 48h minimum à huit jours maximum, soit deux à huit jours sans éjaculation, avant tout examen de sperme car les caractéristiques du sperme varient en fonction du délai d’abstinence sexuelle.

Le jour de l'examen, s'il a lieu au laboratoire :

- Noter le nom et le prénom de l'homme, le numéro du dossier et le délai d'abstinence exact sur le dossier patient et sur le cahier de paillasse, et faire remplir un mini questionnaire utile pour l'interprétation des résultats et le dialogue éventuel avec le clinicien ([Exemple en Annexe 3](#))
- Identifier le réceptacle (dédié à l'analyse du sperme, [Annexe 1](#)), nom, prénom, date de naissance, jour de l'analyse, n° de dossier éventuel
- Conduire l'homme dans la pièce de prélèvement et donner oralement l'ensemble des instructions ([Tableau 1](#)) pour que l'éjaculat soit collecté dans de bonnes conditions (l'ensemble de ces instructions doit être affiché de manière bien visible sur l'un des murs de la pièce de prélèvement)
- Une fois le prélèvement fait, noter sur le cahier de paillasse l'heure exacte du prélèvement
- Placer le prélèvement à l'étuve à 37°C, sauf en cas de spermoculture, ([Chapitre IV](#))

Remarque

Il est recommandé de disposer d'une pièce dédiée au prélèvement de sperme dans le laboratoire.

Sur une période de quelques heures à 10-15 jours d'abstinence, la production spermatique augmente pour atteindre un plateau à partir de quatre à cinq jours selon les hommes tandis que la vitalité des spermatozoïdes (et donc la mobilité qui en dépend) décroissent à partir d'une semaine environ.

La recommandation d'un délai sans éjaculation avant l'examen compris entre 48h et huit jours est donc un compromis pour avoir une image optimale de la production et de la qualité spermatique. D'autre part, cette recommandation constitue un pré requis indispensable pour la comparaison des caractéristiques du sperme lors d'examens répétés chez le même homme ou pour des comparaisons interindividuelles.

Tableau 1 : Conditions de recueil du sperme

1. Uriner
2. Se laver très soigneusement les mains avec un savon liquide
3. Se rincer les mains
4. Se laver très soigneusement le gland avec les mains et le savon liquide
5. Se rincer abondamment le sexe et plus particulièrement le gland à l'aide d'une compresse imbibée d'eau
6. Parfaire la désinfection du gland à l'aide d'une compresse imbibée de solution désinfectante (petit flacon dose à usage unique de chlorhexidine, par exemple)
7. Ouvrir le réceptacle
8. Pratiquer la masturbation
9. Effectuer le recueil du sperme dans le réceptacle
10. Bien boucher le réceptacle
11. Déposer le prélèvement et prévenir le personnel concerné ou apporter directement le prélèvement au personnel concerné selon les directives du laboratoire

Remarque

Dans les cas d'échec de recueil répétés au laboratoire, et uniquement dans ces cas, le prélèvement pourra être fait à domicile si les conditions suivantes peuvent être respectées : a) le prélèvement doit être fait dans un réceptacle identifié fourni par le laboratoire avec le nécessaire pour la préparation et une notice sur les conditions de recueil, b) le prélèvement de sperme doit parvenir au laboratoire impérativement dans l'heure suivant le prélèvement sans être soumis à des températures inférieures à 20°C ou supérieures à 37°C durant le transport (réceptacle enrobé dans du coton et transporté au contact du corps), le patient doit avoir noté l'heure du recueil, c) le petit questionnaire sera rempli lors de la réception du prélèvement et d) l'heure du prélèvement et l'heure d'arrivée du prélèvement seront notées sur le cahier de paillasse.

Le recueil par coït interrompu est à proscrire car la première partie de l'éjaculat, généralement la plus concentrée en spermatozoïdes, peut être perdue. De plus, une contamination cellulaire et bactérienne peut affecter le prélèvement et le pH acide du liquide vaginal nuit à la mobilité des spermatozoïdes.

S'il existe un obstacle culturel ou religieux au prélèvement de sperme par masturbation, le prélèvement pourra être collecté lors d'un rapport sexuel dans un préservatif spécial non enduit de spermicides fourni par le laboratoire (on essaiera toujours au préalable d'obtenir un éjaculat dans les meilleurs conditions de prélèvement, c'est à dire par masturbation au laboratoire).

Les textes réglementaires français imposent que les prélèvements de sperme pratiqués dans le but d'AMP soient collectés exclusivement au laboratoire en charge de cette AMP.

Cas particulier : le fractionnement de l'éjaculat

- Lorsque le prélèvement est collecté dans la perspective - ou lors de la réalisation - d'une AMP de type insémination, ou dans le cadre de la congélation du sperme afin d'optimiser qualité et nombre de paillettes conservées ([Chapitre VII](#)) un prélèvement en deux fractions peut être utile.
- Il doit être prescrit (« Faire pratiquer après une abstinence sexuelle de ... un spermogramme-spermocytogramme à partir d'un prélèvement fractionné... », cet examen est à la nomenclature.
- Il s'applique aux situations où le volume de l'éjaculat est assez important (4ml et plus) et où la concentration est relativement faible, sur la base d'un examen précédent.
- Le but du fractionnement de l'éjaculat, généralement limité à deux fractions, est d'obtenir un sperme plus concentré en recourant seulement à la première fraction dans laquelle est émise la majorité des spermatozoïdes.
- On prépare deux réceptacles dûment étiquetés et identifiés, « Fraction 1 », « Fraction 2 » et l'on demande au patient qu'il tienne les deux tubes à proximité du méat et que lors de l'éjaculation il mette approximativement la première moitié dans le premier tube et la fin de l'éjaculat dans le second tube.
- L'analyse microscopique vérifiera aisément que le fractionnement a été efficace en objectivant une plus forte concentration dans la première que dans la deuxième fraction.
- Les différentes étapes du spermogramme et notamment l'évaluation du volume, de la concentration, de la vitalité et de la mobilité doivent être effectuées sur chaque fraction.
- Il faut noter que le fractionnement peut échouer (volume de la fraction 1 >> volume de la fraction 2, ou insuffisant, par exemple)

Ordre des procédures et modes opératoires du spermogramme

- L'heure du prélèvement est notée sur le cahier de paillasse.
- L'analyse du sperme est effectuée une fois la liquéfaction du prélèvement obtenue normalement dans un délai d'une dizaine de minutes jusqu'à une heure après l'éjaculation.
- Si la liquéfaction ne survient pas dans ce délai, cela doit être noté.
- Il faut noter l'heure du début de l'analyse sur le cahier de paillasse.
- Si une spermoculture est prévue, les échantillons doivent dès réception être mis en attente des examens microbiologiques ([Chapitre IV](#)).

Le tableau qui suit ([Tableau 2](#)) donne une idée de la séquence de l'ensemble des procédures du spermogramme-spermocytogramme.

Tableau 2 : Ordre des procédures

0 - 5 minutes	Placer le prélèvement à l'étuve à 37°C
20 à 60 minutes	<ul style="list-style-type: none">• Évaluation de la liquéfaction/de l'aspect macroscopique• Mesure du volume et évaluation de la viscosité• Mesure du pH• Confection d'une préparation fraîche entre lame et lamelle dans le but d'une évaluation microscopique initiale globale :<ul style="list-style-type: none">- de la concentration (utile pour dilution ultérieure)- de l'homogénéité cellulaire- de la mobilité- des éventuels agrégats, agglutinats- de la présence et importance d'autres cellules et débris• Évaluation de la mobilité• Confection de frottis pour la vitalité et la morphologie• Évaluation de la vitalité• Évaluation de la concentration de spermatozoïdes et de cellules
Ultérieurement	<ul style="list-style-type: none">• Analyse microbiologique éventuelle (le plus rapidement possible)• Évaluation de la morphologie• Édition du compte rendu final

On évalue tout d'abord les caractéristiques physiques de l'éjaculat : il s'agit du volume, de la viscosité et du pH.

Mesure du volume

Procédure

- Le volume de l'éjaculat est déterminé en utilisant une pipette graduée
- La mesure doit être faite à 0,1ml près
- Noter la valeur du volume dans le cahier de paillasse
- Alternativement, le volume peut être estimé par pesée (balance avec 2 décimales), la densité étant voisine de 1 (1ml = 1g); afin d'être précise, cette procédure implique de disposer de réceptacles de prélèvement pré-pesés ; son intérêt principal est de disposer de données plus précises essentiellement lorsqu'il s'agit d'échantillons visqueux.

Viscosité de l'éjaculat

Procédure

La viscosité est évaluée semi-quantitativement en observant la manière dont le sperme s'écoule à l'extrémité de la pipette :

- 0 : normale, gouttes séparées
- + : augmentée, gouttes non séparées (filament plus ou moins long)
- ++ : forte, éjaculat très visqueux, s'écoule mal ou pas, reste en bloc
- Noter sur le cahier de paillasse la viscosité de l'éjaculat.

Note : Procédures possibles en cas de sperme visqueux

- Addition d'un volume égal de milieu physiologique suivi de pipetage répété. OU,
- Effectuez 6 à 10 passages au travers d'une aiguille de seringue de calibre 19 (diamètre d'un millimètre environ). OU,
- Digestion par la broméline (enzyme protéolytique de large spécificité, EC 3.4.22.32, Sigma) : préparez 10 UI de broméline/ml dans du PBS (se dissout difficilement mais en mélangeant vigoureusement devrait se dissoudre en 15-20 minutes) ; diluez le sperme v:v avec la solution de broméline, remuez avec l'extrémité d'une pipette et incubez à 37°C pendant 10 minutes ; quand la liquéfaction est complète, centrifugez à 2000 g pendant 10 minutes et employez le surnageant

Remarque importante

Toutes ces manipulations peuvent affecter la biochimie séminale, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes

Mesure du pH

Procédure

- Le pH doit être mesuré toujours au même moment, dans l'heure qui suit l'éjaculation
- Déposer une goutte de sperme bien homogénéisé sur la bandelette de papier pH (gamme large, Merck 6,5-10, par exemple)
- Attendre 20 à 30 secondes (la couleur doit être uniforme)
- Comparer la couleur obtenue à la gamme étalon
- Noter la valeur du pH sur le cahier de paillasse.

Note

Pour tout nouveau lot de bandelettes, il faut faire un contrôle du pH avec des solutions étalons.

Évaluation microscopique initiale

Evaluation globale à faible grossissement

L'évaluation microscopique initiale de l'échantillon fournit une vue d'ensemble permettant de noter la présence éventuelle d'agglutinats et/ou d'agrégats de spermatozoïdes, la présence éventuelle et l'importance d'éléments cellulaires autres que les spermatozoïdes, la présence éventuelle de filaments muqueux pouvant gêner l'analyse du sperme, la présence de grains gélatineux sans signification pathologique, l'homogénéité de la préparation, etc... Elle permet également d'évaluer le facteur de dilution nécessaire pour la mesure de la concentration en fonction du nombre de spermatozoïdes observés par champ.

Procédure

- Cette évaluation initiale est faite en déposant une goutte de sperme bien homogénéisé sur une lame propre
- La préparation est recouverte avec une lamelle 22mm x 22mm
- Elle est observée à faible grossissement, grossissement final x100 (objectif x10 et oculaire x10) ou x 200 sur 5 à 10 champs, plus en cas d'inhomogénéité.

Agglutination

L'agglutination des spermatozoïdes est définie par l'attachement de spermatozoïdes mobiles entre eux par la tête, par la pièce intermédiaire, ou par le flagelle ; ou de manière mixte, par exemple, agglutination tête-flagelle. Cet attachement est spécifique ([Figure 3A et Chapitre IV](#)).

Procédure

- L'agglutination doit être évaluée sur au moins 10 champs pris au hasard
- Le degré d'agglutination doit être noté (1 à 3 croix) ainsi que le type d'agglutination (par exemple, par la tête, par la pièce intermédiaire ou le flagelle ou encore mixte quand différents types sont présents).

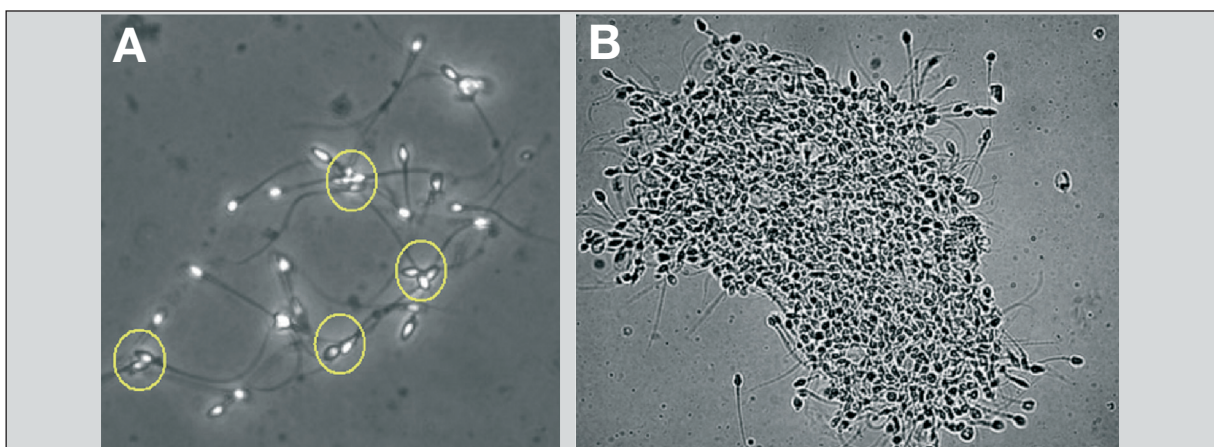
Note

La présence d'agglutinats incite à faire des tests immunologiques ([Chapitre IV](#))

Agrégats

L'attachement de spermatozoïdes immobiles entre eux ou de spermatozoïdes mobiles à des filaments de substances mucineuses, à d'autres cellules ou à des débris constitue une agrégation non spécifique (et non une agglutination ; [Figure 3B](#)) qui doit être notée comme telle (« agrégats », 1 à 3 croix).

Figure 3 : Agglutination spécifique de spermatozoïdes mobiles par la tête (A) ; Agrégation non spécifique +++ de spermatozoïdes immobiles (B).



La préparation est ensuite examinée au grossissement final x400 pour évaluer :

- la mobilité des spermatozoïdes et la concentration des spermatozoïdes

Évaluation de la mobilité

Plusieurs études ont montré que la mobilité des spermatozoïdes est une des caractéristiques du sperme les mieux corrélées à la fertilité. D'un point de vue diagnostic, une anomalie de la mobilité peut correspondre à une anomalie de structure des spermatozoïdes ou à des anomalies de leur maturation lors de leur transport dans la voie génitale. Aussi, une évaluation précise de la mobilité revêt un caractère particulièrement important pour le diagnostic et le pronostic (**Chapitres I, II et V**). Si l'évaluation microscopique le permettait, il serait très utile de décrire objectivement les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes à côté de la simple évaluation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Malheureusement, les mécanismes de la vision ne permettent cette évaluation objective au microscope. Afin de fournir une approche semi-quantifiée de la qualité du mouvement, l'OMS dans les éditions successives du Manuel d'analyse du sperme, jusqu'à la dernière édition de 1999, a recommandé de distinguer, à côté des spermatozoïdes immobiles et non progressifs, deux catégories de mobilité progressive, mobilité progressive rapide avec trajectoire globalement rectiligne et mobilité progressive lente, à trajectoire globalement rectiligne ou bien progressive mais peu efficace (c'est-à-dire l'association d'une vitesse de progression rapide et d'une trajectoire globalement non linéaire). Pour cela il était recommandé de faire l'évaluation à 37°C (microscope muni d'une platine thermostatée) - soit dans des conditions s'approchant de la physiologie - sachant que la proportion des spermatozoïdes observés dans chacune des deux catégories de mobilité progressive est dépendante de la température.

Le mouvement des spermatozoïdes humains est très hétérogène et cette caractéristique peut être illustrée à partir de l'aspect des « traces » de spermatozoïdes observés pendant un intervalle de temps Δt l'équivalent du résultat d'une pose photographique (**Figure 4**).

La distinction des spermatozoïdes de type « a » et « b » semble intéressante en pratique par exemple lorsque la proportion de spermatozoïde « b » est prédominante : si la vitalité est conservée, cela peut être un signe d'appel d'une dyskinésie flagellaire (**Chapitre V**). Plusieurs publications ont fait état d'anomalies de la répartition de ces catégories « a » et « b » dans différents contextes pathologiques. Cependant, l'expérience et les contrôles de qualité indiquent qu'il est assez difficile de classer de manière reproductible et sans grande différence d'un observateur à l'autre les mobilités « a » et « b » ce qui n'est pas le cas lorsque on demande aux observateurs d'évaluer l'ensemble des spermatozoïdes progressifs (« a » + « b »).

Aussi l'OMS recommande maintenant de ne classer qu'en une seule catégorie les spermatozoïdes progressifs (P). Cette recommandation présente de plus l'avantage de pouvoir utiliser un microscope non muni d'une platine thermostatée car avec cette évaluation simplifiée il ne doit pas exister de variation dans les trois catégories, progressif, non progressif et immobile quelle que soit la température de l'analyse. Cette recommandation ne doit cependant pas empêcher que des laboratoires bien entraînés et impliqués dans la recherche poursuivent l'évaluation en quatre catégories si les résultats des contrôles de qualité indiquent une variabilité acceptable (**Annexe 4**).

Procédure

- Déposer 2 gouttes de sperme d'un volume fixe de 10 μ l sur une lame propre avec une pipette à déplacement positif et recouvrir chaque goutte d'une lamelle 22mm x 22mm (le poids de la lamelle étale l'échantillon permettant une observation optimale ; il faut absolument éviter de former des bulles d'air)
- Laisser stabiliser la préparation
- Commencer à faire l'évaluation sur 5 à 10 champs de la première préparation
- Répéter l'évaluation sur la seconde préparation.

Remarque

Ces conditions volumiques et de taille de lamelle permettent une épaisseur de préparation d'environ 20µm présentant l'intérêt de donner une image nette de l'ensemble des spermatozoïdes sans contrainte de leur mouvement (une épaisseur de préparation inférieure à 20µm peut contraindre le mouvement de rotation des spermatozoïdes)

Evaluation selon les trois catégories simplifiées

- Dans chaque champ observé, chaque spermatozoïde est évalué comme étant :
- Immobile « I » : aucun déplacement, tête et flagelle immobiles
- Non progressif « NP » : déplacement de moins de deux longueurs de tête en une seconde ou, aucun déplacement avec des oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaires
- Progressif « P » : tous les autres spermatozoïdes (non immobile et non mobile sur place).

Evaluation selon les 4 catégories de l'OMS (1999)

Dans chaque champ observé, la mobilité de chaque spermatozoïde est évaluée « a », « b », « c » ou « d », selon les critères suivants :

- « a » rapide et progressif : trajectoires rectilignes, mouvement dit fléchant, >25µm/s à 37°C ou >20µm/s à 20°C (25µm correspond à peu près à cinq longueurs de tête ou à la moitié de la longueur du flagelle)
- « b » lent ou faiblement progressif : trajectoires rectilignes mais faible vitesse ou faiblement progressif (trajectoires non rectilignes ou sinueuses avec vitesse plus ou moins grande)
- « c » mobile et non progressif : déplacement de moins de deux longueurs de tête en une seconde ou, aucun déplacement avec des oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaires
- « d » immobile : aucun déplacement, tête et flagelle immobiles.

En fonction de la concentration et de la mobilité évaluées grossièrement lors de l'examen initial, deux modalités d'évaluation de la mobilité sont possibles : 1) le comptage ou 2) l'estimation des spermatozoïdes dans les différentes catégories de mobilité.

Evaluation de la mobilité à partir d'un comptage

- On doit compter quand l'estimation préalable de la concentration entre lame et lamelle suggère une concentration inférieure à 15×10^6 /ml ou quand la mobilité progressive (P ou « a » + « b ») semble inférieure à 10%, quelque soit la concentration de spermatozoïdes
- Le compte doit être fait sur un total d'au moins 100 spermatozoïdes (200 si possible), pris dans des champs différents
- On calcule alors le pourcentage de spermatozoïdes dans chacune des catégories (trois ou quatre catégories, selon qu'il s'agit de la méthode simplifiée ou non)
- L'évaluation est poursuivie dans la seconde préparation selon les mêmes principes.

Evaluation de la mobilité à partir d'une estimation

- Dans tous les autres cas, concentration supérieure ou égale à 15×10^6 /ml et/ou mobilité progressive supérieure à 10%, un comptage précis n'est pas possible : dans ces situations on estimera le pourcentage dans chaque catégorie
- Cette estimation doit être faite dans des champs différents (5-10) afin de tenir compte de l'éventuelle hétérogénéité de la préparation
- La moyenne de l'ensemble des estimations pour la préparation est faite
- L'évaluation est poursuivie dans la seconde préparation selon les mêmes principes.

Remarque

Qu'il s'agisse d'un compte ou d'une estimation, s'il existe une différence de plus de 10% entre les évaluations des préparations 1 et 2 (différence évaluée sur les spermatozoïdes mobiles progressifs si ce sont les plus représentés ou sur les immobiles, s'il y a plus de spermatozoïdes immobiles que mobiles), l'analyse doit être refaite sur une nouvelle préparation (Tableau 3) Le résultat final est reporté sur le cahier de paillasse.

Figure 4 : Trajectoires/traces de spermatozoïdes dans un champ microscopique après un intervalle de temps Δt . Trajectoires de spermatozoïdes à progression rapide et linéaire (a) ; à progression lente ou peu linéaire (b) ; non progressifs (c) ; spermatozoïdes immobiles (d). Selon les trois catégories simplifiées, trajectoires rouges = mobilité progressive (P), trajectoires vertes = mobilité non progressive (NP), points bleus = immobilité (I).

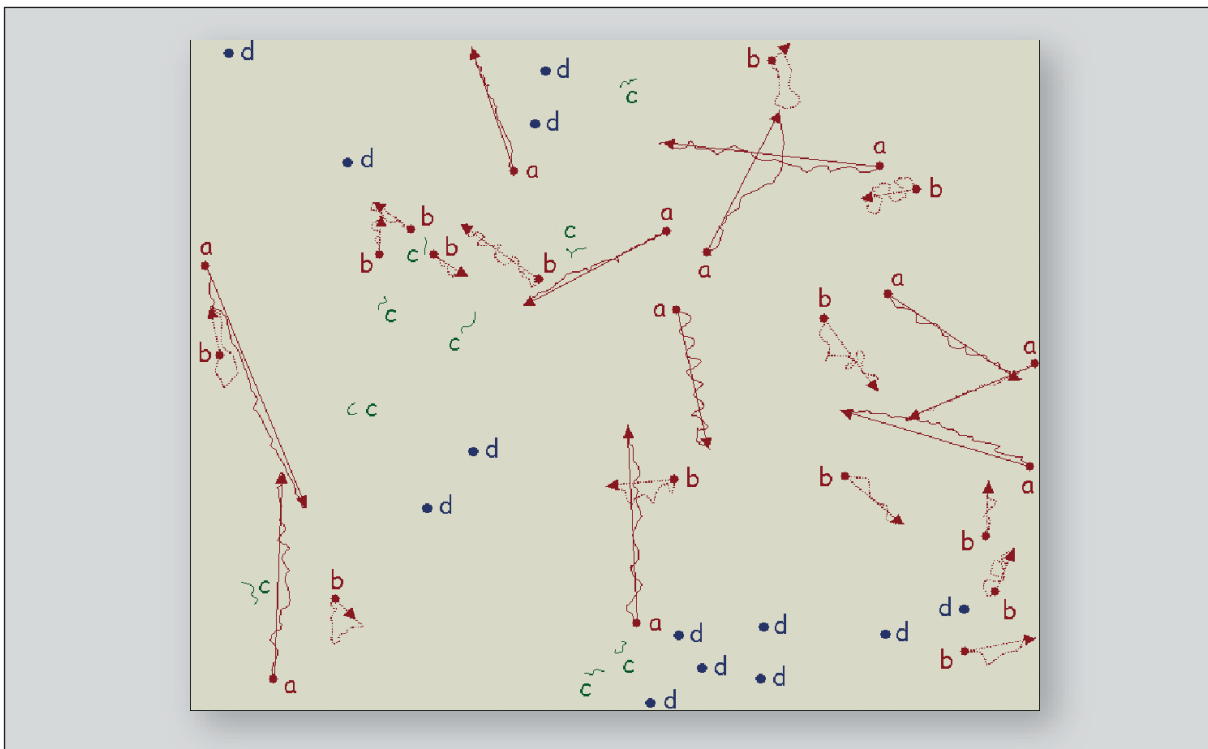


Tableau 3 : Exemples d'évaluations de mobilité

Sperme 1		Sperme 2	
Préparation 1	Préparation 2	Préparation 1	Préparation 2
a	35	10	15
b	15	10	5
c	10	10	10
d	40	70	70
Sperme 1 : Différence sur les mobiles progressifs supérieure à 10% (65-50 = 15 ; (15/50)x100= 30% → 3 ^{ème} évaluation à faire			
Sperme 2 : Différence sur les immobiles = 0 → pas de 3 ^{ème} évaluation à faire			

Confection d'un frottis pour l'évaluation de la vitalité ou de la morphologie des spermatozoïdes et principe d'observation d'un frottis coloré

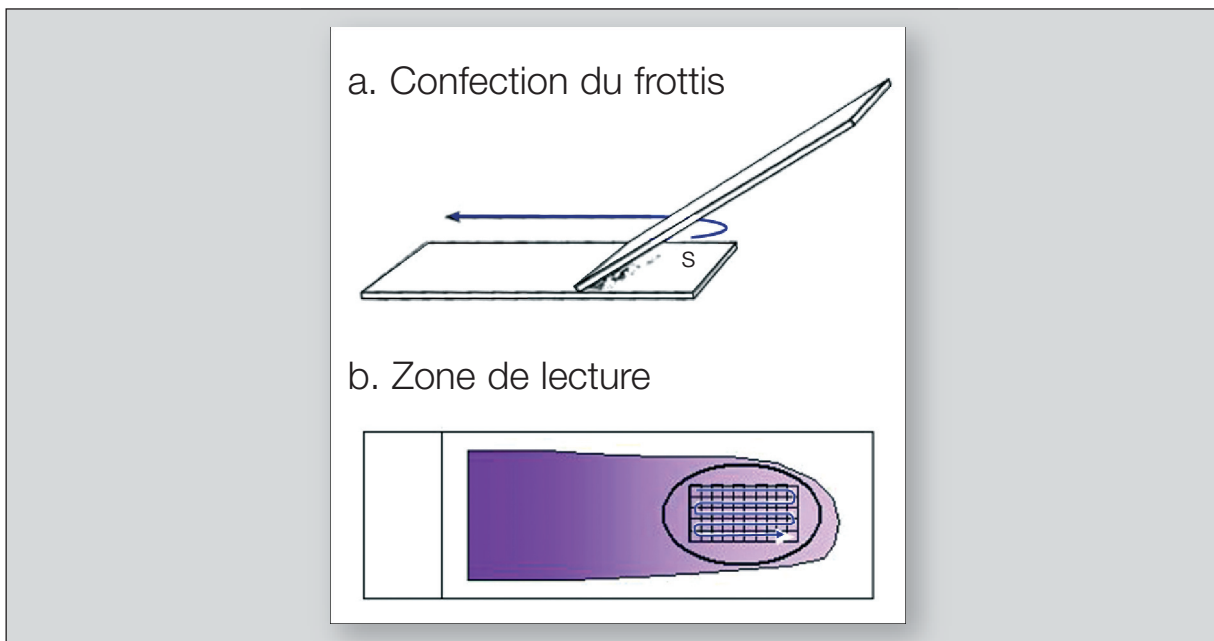
Procédure

- Déposer 10µl de sperme bien homogénéisé à l'extrémité d'une lame
- Étaler cette goutte en s'aidant d'une autre lame inclinée à 45° par rapport à la première (Figure 5); on obtient dans ces conditions un frottis très peu épais limitant de possibles artefacts de coloration du fond de la préparation et offrant un contraste optimal des cellules après coloration
- La lecture se fait usuellement sauf cas particulier en queue de frottis et selon un mode opératoire standardisé (champs jointifs, balayage en méandre) (Figure 5)

Remarque

Si le volume de la goutte n'est pas contrôlé et si la goutte est épaisse, la caractérisation et la classification des spermatozoïdes après coloration est rendue difficile voir impossible et le résultat de l'estimation de la vitalité et encore plus de la morphologie ne sera absolument pas fiable.

**Figure 5 : Confection d'un frottis de spermatozoïdes (a)
Zone habituelle d'observation et méthode de balayage de la lame après coloration (b)**



Mesure de la concentration de spermatozoïdes

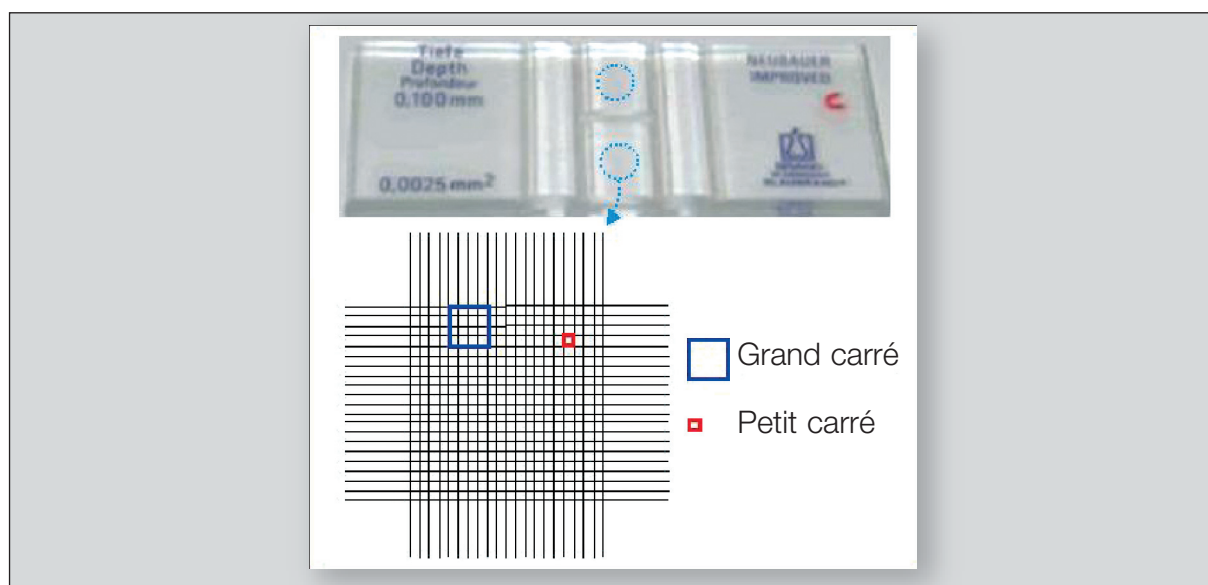
Procédure

- La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant un hémocytomètre. L'OMS recommande la cellule de Neubauer modifiée (Figure 6); la cellule de Malassez (Figure 9) qui fournit des résultats reproductibles peut aussi être utilisée
- Éteindre la platine chauffante environ 10 minutes avant de faire l'évaluation ; penser à la rallumer pour le spécimen suivant

- Préparer le milieu de dilution à partir d'eau distillée dans laquelle sont ajoutés 50g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et 10ml de formaline à 35% (v/v) pour un volume final de 1000ml
- Dilution du sperme : la dilution à utiliser dépend du nombre de spermatozoïdes observés par champ microscopique au grossissement final x400
- Pour l'étape de dilution, prélever impérativement à l'aide d'une pipette à déplacement positif (du fait de la viscosité du sperme, les pipettes basées sur le principe d'un déplacement d'air ne sont pas assez précises pour diluer un volume défini) au minimum 50 μl du sperme liquéfié bien homogénéisé (soit pour une dilution au 1/20^{ème}, par exemple, 50 μl de sperme pour 950 μl de diluant)
- Si le sperme semble contenir moins de 20 x 10⁶/ml, une dilution au 1/10^{ème} peut être utilisée tandis qu'une dilution au 1/50^{ème} sera plus appropriée quand la concentration apparaît supérieure à 100 x 10⁶/ml
- Monter la cellule choisie à l'aide d'un coton tige humecté, et utiliser impérativement les lamelles rodées adaptées à l'hémocytomètre choisi
- Bien homogénéiser le mélange sperme+diluant (vortex) et l'introduire (environ 10 μl) par capillarité dans chacune des chambres de la cellule
- Placer la cellule en chambre humide pendant 5 minutes environ afin de permettre l'immobilisation totale et la sédimentation des spermatozoïdes
- Si une observation de l'ensemble de la chambre indique une répartition relativement homogène des spermatozoïdes, compter les spermatozoïdes en utilisant l'objectif x40 en contraste de phase - seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés
- Dans le cas contraire, faire une nouvelle préparation en insistant particulièrement sur l'étape d'homogénéisation avant remplissage de la chambre
- Effectuer le compte toujours selon le même mode opératoire, balayage systématique de la chambre en méandre, de haut en bas et de gauche à droite ou de gauche à droite et de haut en bas (Figure 7)
- Répéter le compte dans l'autre chambre

Utilisation de la cellule de Neubauer modifiée ("Neubauer improved")

Figure 6 : Cellule de Neubauer modifiée. Caractéristiques de la chambre : le volume total de la chambre est de 0,9 mm³ avec une profondeur de 0,1 mm, le carré central de la chambre comporte 25 grands carrés, chacun composé de 16 petits carrés.



Procédure

- Pour les échantillons contenant moins de 10 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur l'ensemble de la grille (les 25 grands carrés)
- Pour les échantillons contenant de 10 à 40 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur 10 grands carrés
- Pour les échantillons contenant plus de 40 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur cinq grands carrés
- Le milieu des trois lignes blanches définit le grand carré ; les spermatozoïdes sont comptés si leur tête se situe entre les deux lignes les plus internes mais pas entre les deux lignes les plus externes (Figure 7)
- Si un spermatozoïde se situe sur une ligne séparant deux grands carrés adjacents, il est compté uniquement s'il se situe sur le côté supérieur ou le côté droit du carré observé (Figure 7)
- Au moins 200 spermatozoïdes dans chacune des 2 chambres de la cellule seront comptés. Pour atteindre cet objectif il faut bien ajuster la dilution
- Pour juger de la concordance des comptes dans les deux chambres, on fait la somme et la différence des deux comptes
- On se reporte à la Figure 8 ci-après pour voir la différence acceptable entre les deux comptes en fonction de la somme des deux comptes
- Si la différence trouvée est inférieure ou égale à la différence acceptable, les deux comptes trouvés sont valides et on utilise leur moyenne pour le calcul de la concentration se référant au Tableau 4 ci-dessous
- Si la différence trouvée est supérieure à la différence acceptable, les deux comptes trouvés ne sont pas valides et il faudra alors refaire la dilution ainsi que les deux comptes selon la procédure décrite ci-dessus
- Toutes les concentrations sont exprimées en millions ($\times 10^6$)/ml
- Les résultats de deux comptes et de la concentration seront reportés sur le cahier de paillasse.

Figure 7 : Spermatozoïdes ayant sédimenté dans la chambre de Neubauer ; règle à suivre pour le comptage (cercle vert : spermatozoïde compté, cercle noir : spermatozoïde non compté, étoile rouge : débris cellulaire ou cellule : non compté comme spermatozoïde)

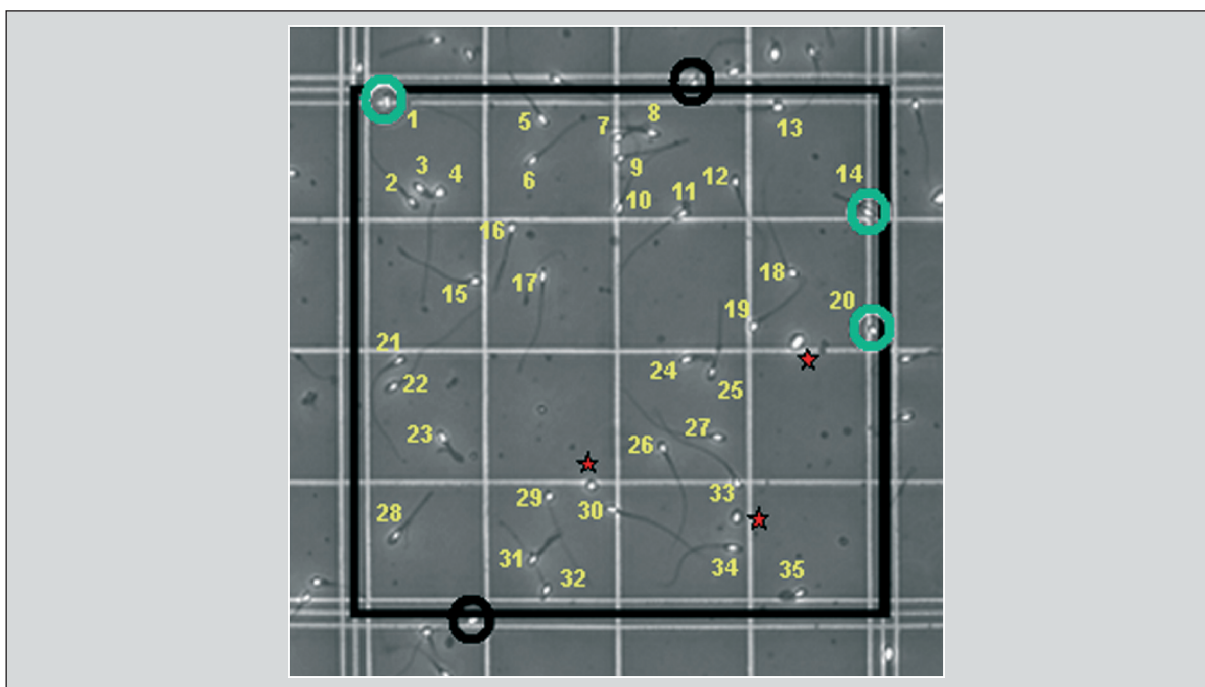


Figure 8 : Différence acceptable entre 2 comptes de spermatozoïdes en fonction du nombre total de spermatozoïdes comptés (WHO, 1999)

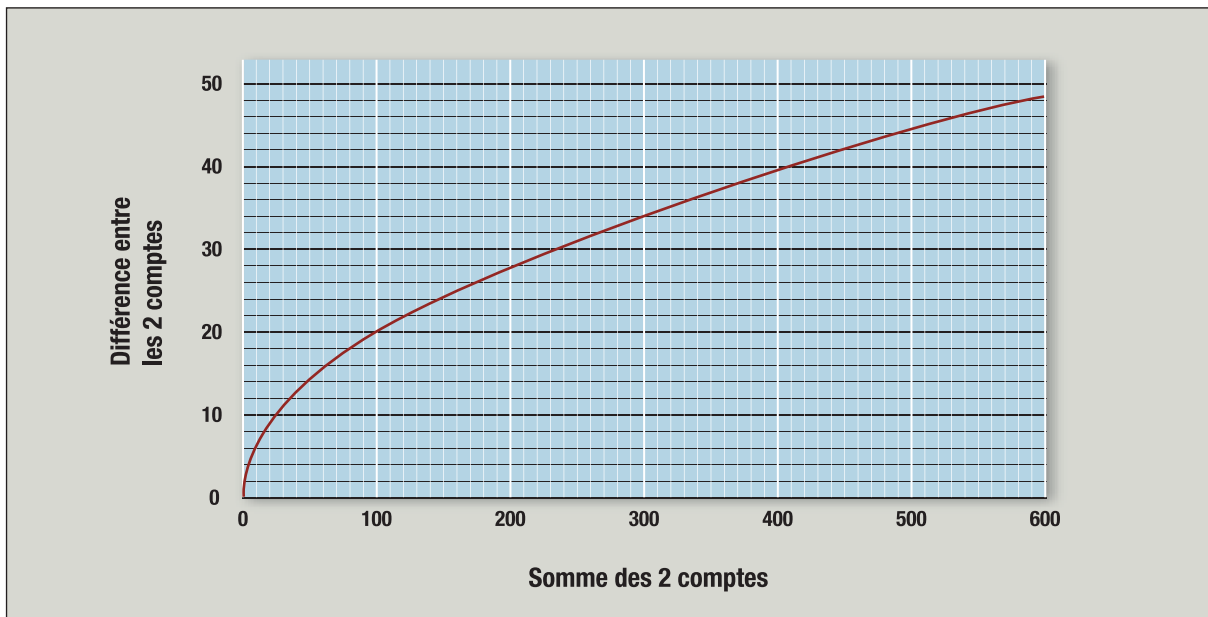


Tableau 4 : Dilutions et facteurs de conversion (en gras) pour la cellule de Neubauer modifiée

Evaluation (x400) : Nombre de spermatozoïdes /champ	Dilution (sperme+diluant)	Facteurs de conversion Nombre de grands carrés comptés		
		25	10	5
< 15	1 : 5 (1+4)	20	8	4
15-40	1 : 10 (1+9)	10	4	2
40-200	1 : 20 (1+19)	5	2	1
> 200	1 : 50 (1+49)	2	0,8	0,4

Les chiffres en gras permettent de calculer directement la concentration en millions de spermatozoïdes/ml en divisant simplement le nombre de spermatozoïdes comptés par le chiffre correspondant à la situation de l'analyse (Tableau V ; exemple 2)

Tableau 5 : Exemples de numérations avec la cellule de Neubauer modifiée

Exemple 1

Deux comptes réalisés sur 10 grands carrés donnent les résultats suivants : **250 et 198 spermatozoïdes. La somme est donc 448 et la différence 52.** Si on se reporte à la Figure 8, avec une somme de 448, la différence acceptable est de 41 : elle est inférieure à celle trouvée → **Il faut donc refaire l'analyse.**

Exemple 2

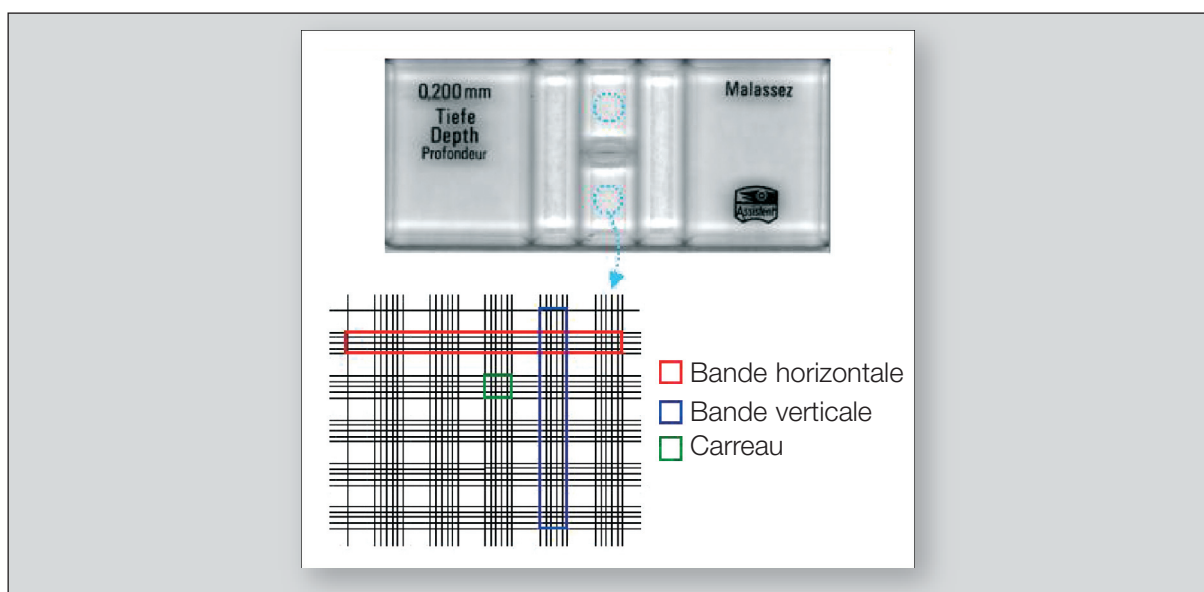
Deux comptes réalisés sur 10 grands carrés donnent les résultats suivants : **247 et 213 spermatozoïdes. La somme est donc 460 et la différence 34.** Si on se reporte à la Figure 8, avec une somme de 460, la différence acceptable est de 42 : elle est supérieure à celle trouvée → **Le résultat est valide.**

Le calcul de la concentration est le suivant :

Le compte moyen de spermatozoïdes est de 230, ce compte a été fait sur 10 grands carrés et la dilution réalisée était 1:20. (en se reportant au Tableau 4, le facteur de conversion correspondant est 2 ; la concentration est donc égale à $230/2 = 115 \times 10^6 / \text{ml}$)

Utilisation de la cellule de Malassez

Figure 9 : Cellule de Malassez. Caractéristiques de la chambre : le volume total de la chambre est de 1 mm^3 , la chambre est caractérisée par 10 bandes verticales et 10 bandes horizontales, une bande verticale sur deux est subdivisée dans sa largeur en cinq intervalles égaux et est composée de 10 carreaux, une bande horizontale sur deux est subdivisée dans sa largeur en quatre intervalles égaux et est composée de 10 carreaux, le volume d'une bande est de $1/10 \text{ mm}^3$ et le volume d'un carreau (striés ou non) est de $1/100 \text{ mm}^3$.



Procédure

- La règle à suivre pour le comptage dans la cellule de Malassez est similaire à celle précédemment décrite pour la cellule de Neubauer modifiée
- Au moins 200 spermatozoïdes dans chacune des deux chambres de la cellule sont comptés
- Seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés (tête + flagelle)
- Si les spermatozoïdes se situent sur une ligne délimitant soit un carreau soit une bande, ne compter que les spermatozoïdes présents sur la bordure droite ou gauche mais pas les deux, même remarque pour la bordure du haut et celle du bas
- Calcul de la concentration (exemples ci-dessous, pour une dilution standard au 1/20)

Faible concentration prévisible :

comptage de toute la chambre, $V = 1 \text{ mm}^3$, soit X le nombre de spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = X \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{Dilution}}}{20} \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{V en cm}^3 \text{ (ml)}}}{1000} = X \times 20000 \text{ / ml}$$

Concentration intermédiaire prévisible :

comptage des deux bandes non consécutives, $V = 1/5 \text{ mm}^3$, soit Y le nombre de spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = Y \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{Dilution}}}{20} \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{V en cm}^3 \text{ (ml)}}}{5000} = Y \times 10^5 \text{ / ml}$$

Forte concentration prévisible :

comptage de 2 carreaux non consécutifs, $V = 1/50 \text{ mm}^3$, soit Z le nombre de spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = Z \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{Dilution}}}{20} \times \underset{\substack{\uparrow \\ \text{V en cm}^3 \text{ (ml)}}}{50000} = Z \times 10^6 \text{ / ml}$$

- Toutes les concentrations sont exprimées en millions ($\times 10^6$)/ml
- Pour juger de la concordance des comptes dans les deux chambres, on calcule la différence entre les deux concentrations obtenues
- Si la différence entre les deux comptes est supérieure à 10%, refaire l'analyse.

Le [Tableau 6](#) donne deux exemples de calculs de concentration avec la cellule de Malassez.

Tableau 6 : Exemples de calculs de concentration avec la cellule de Malassez

Exemple 1

Dans la première chambre, 229 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 bandes non consécutives.

Dans la deuxième chambre, 241 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 bandes non consécutives.

La dilution est 1: 20.

La concentration en spermatozoïdes est $22,9 \times 10^6/\text{ml}$ pour le premier compte, et $24,1 \times 10^6/\text{ml}$ pour le deuxième.

La différence est $< 10\%$ → **La moyenne est utilisée soit $23,5 \times 10^6$ spermatozoïdes/ml.**

Exemple 2

Dans la première chambre, 216 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 carreaux non consécutifs.

Dans la deuxième chambre, 251 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 carreaux non consécutifs.

La dilution est 1: 20.

La concentration en spermatozoïdes est $216 \times 10^6/\text{ml}$ pour le premier compte, et $251 \times 10^6/\text{ml}$ pour le deuxième.

La différence est $> 10\%$ → **Il faut refaire l'analyse.**

Cas particulier des très faibles concentrations et des azoospermies

Si aucun spermatozoïde n'est observé dans chacune des deux préparations fraîches lors de l'observation initiale, une azoospermie, c'est à dire l'absence de spermatozoïde dans le sperme, quelle qu'en soit la cause, peut être suspectée. Il est généralement considéré que le terme d'azoospermie doit être employé lorsque l'on n'a observé aucun spermatozoïde ni à l'examen direct, ni après examen du culot de centrifugation. Cependant le fait d'observer ou de ne pas observer de spermatozoïdes peut dépendre de la quantité de culot examinée et des durées et vitesses de centrifugation: il a été montré qu'une vitesse de centrifugation de 3000g pendant 15 minutes ne permet pas forcément de récupérer l'ensemble des spermatozoïdes présents dans un éjaculat. Il faut aussi noter que si l'on trouve des spermatozoïdes après cette étape, on ne pourra faire une évaluation pertinente ni du nombre ni de la mobilité des spermatozoïdes. Généralement dans le cadre du diagnostic, il n'est pas nécessaire d'avoir une estimation exhaustive du nombre de spermatozoïdes présents dans le sperme lorsque la production de spermatozoïdes est extrêmement faible. Si lors de l'examen d'une préparation au grossissement final x400 (objectif x40 et oculaires x10), on a en moyenne moins de 4 spermatozoïdes par champ, on peut conclure à une concentration très probablement inférieure à $1 \times 10^6/\text{ml}$. Pour la plupart des évaluations cliniques, il peut être suffisant de conclure : « moins de 2×10^6 spermatozoïdes/ml » gardant à l'esprit que de toutes façons, le nombre de spermatozoïdes comptés dans les chambres de l'hémocytomètre est tellement faible dans ces situations que l'erreur autour de la valeur calculée sera par essence très importante. (Annexe 4)

Procédure

- Centrifuger, dans plusieurs tubes à fond conique, le maximum du volume de l'éjaculat, à 3000g pendant 15 minutes
- Examiner au grossissement final x400 de manière standardisée (champs jointifs, balayage en méandre) dans chacun des tubes au moins deux aliquots de 10µl placés entre lame et lamelle 22mm x 22mm.

La présence d'un spermatozoïde ou plus dans au moins l'une des préparations conduit à conclure : « cryptozoospermie » ou « X spermatozoïdes observés après concentration du prélèvement ».

L'absence de spermatozoïdes sur l'ensemble des préparations faites après centrifugation conduit à conclure : « absence de spermatozoïde à l'examen direct et après concentration » ou « azoospermie vérifiée sur le culot de centrifugation ».

Mesure de la concentration de cellules rondes

L'éjaculat contient généralement d'autres cellules que les spermatozoïdes. À l'état frais, et au grossissement final x 400, ces cellules sont regroupées sous le terme général de cellules rondes (par opposition aux cellules orientées et dotées d'un flagelle que sont les spermatozoïdes) car on ne peut en faire le typage.

Ces cellules peuvent être :

- Des cellules épithéliales desquamées du tractus génital
- Des cellules de la lignée germinale
- Des cellules de la lignée blanche.

Il est normal qu'un certain nombre de cellules rondes soit présent dans l'éjaculat. Lorsque ces cellules sont en forte quantité, il est important d'évaluer la quantité et ultérieurement le type des cellules présentes lors du spermocytogramme, car cela peut avoir une signification pathologique :

- Une concentration notablement augmentée de cellules de la lignée germinale peut signifier une desquamation anormale de l'épithélium séminifère, souvent d'origine toxique
- Une concentration notablement augmentée de leucocytes (leucospermie) peut signifier un processus inflammatoire au niveau du tractus génital (surtout si elle est associée à une baisse du volume de l'éjaculat et de la mobilité des spermatozoïdes). Elle peut aussi retentir sur la qualité fonctionnelle des spermatozoïdes car les leucocytes sont capables d'initier des phénomènes oxydatifs importants et les spermatozoïdes sont des cellules très sensibles au stress oxydatif.

Remarque

Ces chiffres ont une valeur toute relative parce que :

- *Il existe une erreur d'échantillonnage très importante dans l'évaluation de la concentration de cellules rondes du fait de la dilution importante appliquée pour le comptage des spermatozoïdes ne permettant de compter qu'un nombre très limité de cellules dans la chambre de l'hémocytomètre. 5×10^6 cellules exfoliées de l'épithélium séminifère, cinq millions de cellules de la lignée blanches ou $2,5 \times 10^6$ cellules dans chaque grande catégorie, n'a bien sûr pas la même signification pour le diagnostic (et le pronostic)*
- *Beaucoup de cellules observées dans le sperme sont en partie dénaturées rendant difficile leur comptage et même leur typage ultérieur sur un frottis coloré*

- La concentration est une variable ne rendant pas vraiment compte de la quantité de cellules totales (1×10^6 leucocytes/ml pour un volume de 1ml ou pour un volume de 8ml n'a pas une signification équivalente)
- Lorsque l'on parle de leucocytes, c'est à partir d'un typage de ces cellules sur frottis après coloration ; en réalité le typage concerne essentiellement les polynucléaires, seule catégorie de leucocytes réellement facile à identifier dans le sperme.

Des études en cytométrie en flux suggèrent que les concentrations de cellules dans le sperme sont beaucoup plus importantes que celles rapportées sur la base d'une évaluation à l'hémocytomètre et que les polynucléaires ne sont pas la population de globules blancs forcément toujours la plus représentée.

Procédure

- Le principe de la détermination de la concentration en cellules rondes est le même que celui de la concentration en spermatozoïdes
- Il repose sur le compte de toutes les cellules autres que les spermatozoïdes ayant sédimenté dans la chambre de la cellule de Neubauer modifiée ou de la cellule de Malassez avec le même principe de comptage et de calcul pour déterminer la concentration en millions/ml
- Ce compte est fait dans le même temps que celui des spermatozoïdes
- Les cellules seront ensuite classées sur frottis après coloration afin d'évaluer leurs proportions respectives (voir spermocytogramme).

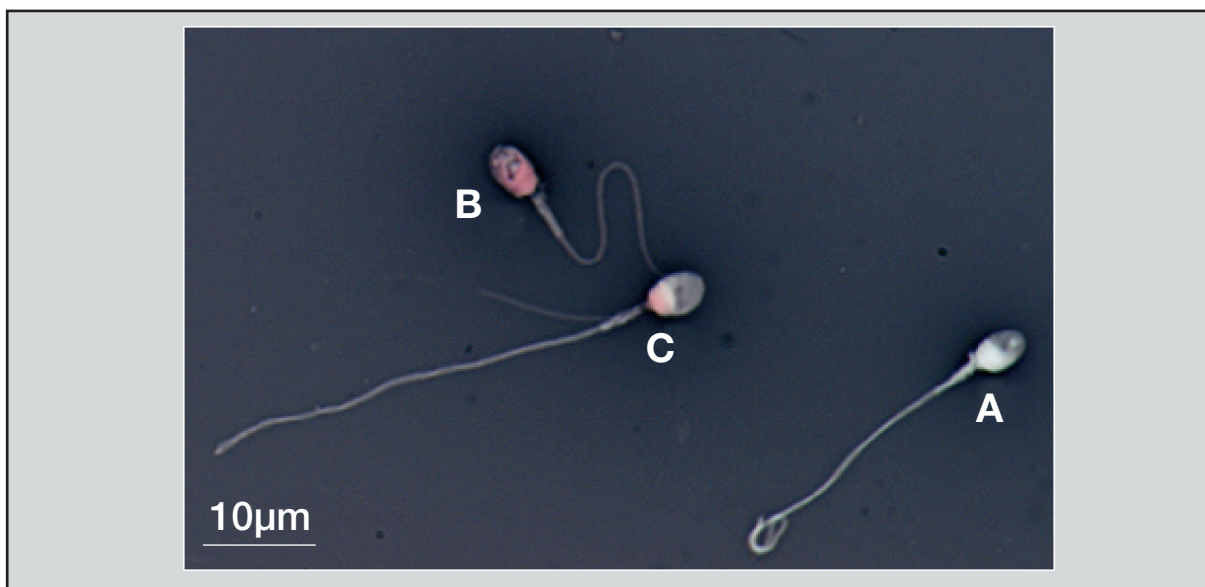
Évaluation de la vitalité par le test à l'Éosine-Nigrosine

La méthode d'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est basée sur l'exclusion d'un colorant vital par les spermatozoïdes vivants ; à l'opposé, le colorant pénètre les spermatozoïdes morts ou moribonds (spermatozoïdes présentant une membrane altérée).

Procédure

- Préparer des lames dégraissées
- Homogénéiser le sperme au vortex
- Mettre dans un tube à hémolyse 10 μ l de sperme (pipette à cône jaune)
- Ajouter 20 μ l d'éosine
- Bien mélanger
- Attendre 30 secondes et ajouter 30 μ l de nigrosine
- Bien mélanger
- Faire un frottis à partir de cette préparation (Figure 5); le frottis ne doit pas être trop épais : prendre 10 μ l du mélange
- Laisser sécher à l'air
- Lire à l'objectif x100 à immersion en lumière transmise (grossissement x 1000 final)
- Classer un minimum de 200 spermatozoïdes pour déterminer le pourcentage de spermatozoïdes vivants :
 - Il est important de balayer la préparation de manière systématique (Figure 5)
 - Les spermatozoïdes vivants ne sont pas colorés
 - Les spermatozoïdes morts ont la tête colorée en rouge violacé
 - S'il existe une faible coloration ne concernant qu'une partie de la tête, le spermatozoïde est classé « mort » (Figure 10)
 - les têtes isolées ne sont pas comptées.

Figure 10 : Aspect des spermatozoïdes sur frottis après coloration à l'éosine nigrosine



Spermatozoïde non coloré = spermatozoïde compté vivant (A) ; spermatozoïde coloré en rose au niveau de la tête = spermatozoïde mort (B) ; spermatozoïde faiblement et partiellement coloré en rose = spermatozoïde mort (C)

Évaluation de la vitalité par le test hypo-osmotique (HOS-test)

C'est un test de vitalité simple basé sur le fait que la membrane de la cellule intacte est semi-perméable. En conséquence, si le spermatozoïde est placé en milieu hypo-osmotique, il se produit un influx d'eau, le spermatozoïde "gonfle" et le signe le plus manifeste de son augmentation de volume est un enroulement assez serré de son flagelle, sur une portion plus ou moins longue de celui-ci. Au contraire, si la cellule est morte, sa morphologie ne se modifie pas. Le test est d'un emploi facile, sa quantification est aisée et il apporte des informations utiles sur la viabilité cellulaire et la fonctionnalité de la membrane plasmique au niveau du flagelle, informations qui seront capitales par exemple en cas d'immobilité totale des spermatozoïdes après congélation-décongélation : Les spermatozoïdes sont-ils morts ou simplement immobilisés ?

Procédure

Préparation

- Dissoudre 735 mg de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 1351 mg de fructose dans 100 ml d'eau distillée
- Aliquoter et conserver à -20°C
- Après dégel, bien mélanger la solution avant usage.

Réalisation du test

- Pendant 5 minutes environ, réchauffer à 37°C 1ml de la solution dans un tube Eppendorf fermé
- Ajouter 0,1 ml de sperme liquéfié et mélanger doucement à l'aide d'une pipette
- Laisser incubé à 37°C pendant 30 min à 2 h puis
- Observer les spermatozoïdes en contraste de phase au grossissement final x400 : les spermatozoïdes ayant réagi (donc vivants) sont ceux qui présentent des flagelles enroulés comme décrit ci-dessus
- Calculer le pourcentage de spermatozoïdes présentant des enroulements flagellaires sur un total de 100 spermatozoïdes comptés
- Répéter l'analyse sur 100 autres spermatozoïdes et calculer le pourcentage moyen.

Le spermocytogramme

À la différence de la plupart des autres espèces mammifères, à l'issue de la spermiogenèse, des spermatozoïdes présentant des aspects morphologiques variés sont produits chez l'homme. Au sein d'un éjaculat, les spermatozoïdes qualifiés de morphologiquement normaux et supposés féconds sont en minorité si l'on se réfère aux valeurs de référence de l'OMS (seuil de 15% à 30% de spermatozoïdes qualifiés de morphologiquement normaux en fonction de la méthode de classification utilisée). Les spermatozoïdes morphologiquement anormaux ont un potentiel fécondant réduit (voire aboli dans le cas des spermatozoïdes sans acrosome) et ce d'autant plus qu'ils cumulent des anomalies.

Il est maintenant bien établi que le pourcentage de spermatozoïdes normaux a une valeur pronostique *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, il a été rapporté que la proportion de certaines anomalies spécifiques des spermatozoïdes et le nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde atypique, l'index d'anomalies multiples, IAM avaient un intérêt pronostique *in vivo* ou *in vitro*. Enfin, la vulnérabilité du testicule humain à de nombreux facteurs physiques et chimiques ou à des facteurs plus complexes tels que le stress a suggéré que l'analyse des anomalies morphologiques des spermatozoïdes, pouvait constituer un indicateur utile des facteurs du macro-environnement de l'homme pouvant moduler ou endommager la spermatogenèse.

Ainsi, le spermocytogramme, appellation usuelle pour l'analyse morphologique des spermatozoïdes humains - comprenant l'évaluation du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux et la détermination de la fréquence des diverses anomalies morphologiques - représente plus que jamais un temps indispensable de l'analyse du sperme humain. Malheureusement, cette analyse, simple à première vue, présente de réelles difficultés avec pour conséquence une fiabilité relative des résultats d'un laboratoire à l'autre.

Ces difficultés tiennent :

- à l'utilisation de systèmes de classification multiples: une dizaine de systèmes de classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains ont été proposés depuis la fin des années 50 sans consensus encore actuellement sur une méthode de classification universelle,
- à l'absence de définitions précises et détaillées dans la plupart des systèmes de classification et à l'absence de règles pour le classement des spermatozoïdes présentant plus d'une anomalie morphologique,
- au caractère subjectif de l'analyse microscopique de la morphologie des spermatozoïdes humains qui dépend principalement des mécanismes de la vision et de son intégration au niveau cérébral.

Lors de l'analyse des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains, l'observateur doit estimer les tailles respectives des différents spermatozoïdes ou de leurs constituants (têtes des spermatozoïdes trop petites ou trop grandes, longueur du flagelle, par exemple) et reconnaître des formes (spermatozoïdes à flagelle multiple, à flagelle enroulé ou sans flagelle, par exemple). Le couple œil-cerveau est très efficace pour la reconnaissance des formes mais il est peu performant et beaucoup moins efficace que la vision assistée par ordinateur pour l'évaluation de tailles respectives d'éléments microscopiques. C'est la raison pour laquelle des systèmes de classification comme la classification de Tygerberg basée essentiellement sur une évaluation des seuls spermatozoïdes normaux peuvent apparaître à première vue d'une utilisation plus aisée bien qu'une meilleure reproductibilité ou un plus grand intérêt clinique avec cette méthode n'ait encore été démontré. C'est aussi la raison pour laquelle des méthodes d'analyse semi-automatisées à l'aide de logiciels spécifiques de vision par ordinateur ont été proposées pour tenter de pallier à la subjectivité de l'analyse visuelle pour l'analyse de la morphologie spermatique. Malheureusement, dans leur état actuel de développement, ces méthodes ne sont pas recommandées.

L'étape analytique de reconnaissance visuelle et de classification des spermatozoïdes humains normaux et anormaux doit donc impérativement faire l'objet d'une standardisation. Les phases importantes de la standardisation sont d'une part, l'optimisation de la préparation et de l'observation microscopique, afin d'avoir les meilleures conditions possibles de contraste des cellules, et d'autre part, la définition précise de chaque atypie afin que les critères de décision pour la classification soient les mêmes d'un observateur à l'autre.

Aspects préanalytiques : confection des frottis, fixation, coloration, grossissement, méthode pour la lecture

La technique de confection du frottis a été décrite précédemment ([Chapitre III](#)). Si le volume de la goutte n'est pas contrôlé et si la goutte est épaisse, la caractérisation et la classification des spermatozoïdes après coloration est quasi impossible, car le frottis est trop épais et les cellules insuffisamment contrastées.

Fixation

Procédure

- Les frottis une fois séchés à l'air sont fixés dans un mélange 3/4 éthanol, 1/4 acide acétique pendant 1 heure, si coloration de Shorr, 5 à 15 minutes, si coloration de Papanicolaou modifiée, voir plus loin.

Coloration

Il y a quelques années, une enquête du groupe de travail national sur l'assurance de qualité en biologie de la reproduction auprès de 214 laboratoires français avait montré que plus de cinq techniques différentes étaient utilisées pour la coloration des spermatozoïdes ! L'OMS dans son manuel pour l'analyse du sperme ne s'est pas prononcée sur une technique de coloration unique pour les spermatozoïdes humains. La coloration de Papanicolaou modifiée est recommandée comme méthode de référence en l'absence de données établies démontrant sa supériorité. La coloration de Shorr est présentée comme une alternative acceptable. L'expérience du laboratoire de l'hôpital Cochin sur plus de trois décennies indique que la coloration de Shorr, qui est simple à réaliser, donne de bons résultats pour une évaluation en routine de la morphologie des spermatozoïdes. En particulier, elle semble supérieure à la méthode de Papanicolaou modifiée pour la reconnaissance des pièces intermédiaires et des flagelles. Nous présentons successivement les deux techniques.

A. Coloration de Papanicolaou modifiée

La coloration de Papanicolaou distingue sans ambiguïté les composants basophiles et acidophiles des cellules et donne une image détaillée de la texture de la chromatine nucléaire. Aussi cette méthode de coloration est largement employée pour le diagnostic cytologique de routine. Cependant la méthode usuelle utilisée pour la cytologie vaginale donne des résultats médiocres lorsqu'elle est appliquée aux spermatozoïdes. La technique modifiée décrite ci-après donne par contre de bons résultats pour l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes et des cellules germinales immatures.

Procédure

Préparation des échantillons

- Le frottis doit être séché à l'air puis fixé pendant 5 à 15 minutes dans une solution contenant de l'alcool à 95% (950 ml/l) et de l'éther à parts égales.

Méthode de coloration

Les frottis fixés sont colorés selon les étapes successives suivantes :

- | | |
|--|-------------------------------|
| - Alcool à 80% ^a (800 ml/l) | immerger 10 fois ^b |
| - Alcool à 70% (700 ml/l) | idem |
| - Alcool à 50% (500 ml/l) | idem |
| - Eau distillée | idem |
| - Hématoxyline d'Harris ou de Mayer | 3 minutes exactement |
| - Eau courante | 3 à 5 minutes |
| - Ethanol acide | immerger 2 fois |
| - Eau courante | 3 à 5 minutes |
| - Solution de Scott ^c | 4 minutes |
| - Eau distillée | immerger 1 fois |
| - Alcool à 50% | immerger 10 fois |
| - Alcool à 70% | idem |
| - Alcool à 80% | idem |
| - Alcool à 90% | idem |
| - Orange G6 ^d | 2 minutes |
| - Alcool à 95% | immerger 10 fois |
| - Alcool à 95% | idem |
| - EA-50 ^d | 5 minutes |
| - Alcool à 95% | immerger 5 fois |
| - Alcool à 95% | idem |
| - Alcool à 95% | idem |
| - Alcool à 99,5% (995 ml/l) | 2 minutes |
| - Xylol (3 bains) | Environ 1 minute dans chacun |

(changer le xylol s'il prend un aspect laiteux)

- Vérifier l'acidité de l'eau avant de préparer les différentes dilutions d'alcool. Le pH doit être égal à 7,0.
- Chaque immersion doit durer 1 seconde environ.
- La solution de Scott est utilisée lorsque l'eau du robinet est dure.
- Les colorants de la technique de Papanicolaou (EA-50 et Orange G6) sont disponibles tout préparés chez différents fabricants. Les mêmes fabricants commercialisent également l'hématoxyline.

Montage des lames (optionnel)

Si l'on choisit de monter les lames, monter immédiatement avec tout milieu de montage

Procédure

- Au sortir de la coloration, plonger les lames dans un bain d'une solution de type Histosol plus
- Prendre une lamelle 60 mm x 24 mm
- Y déposer une goutte du milieu de montage (Depex, Pertex, Eukitt, etc...)
- Déposer la lamelle sur le frottis
- Appuyer fortement la lamelle afin de bien répartir le milieu de montage et de chasser les éventuelles bulles d'air

- Bien essuyer les bords à l'aide d'un papier essuie-tout
- Laisser sécher environ 12 heures à plat

Remarque

Le montage des lames est un avantage pour la lecture et bien sûr il est indispensable si l'on désire conserver les lames (échantillons de CQ par exemple)

Préparation des colorants

Les colorants disponibles dans le commerce donnent généralement de très bons résultats, mais on peut également réaliser une économie non négligeable en préparant ces colorants au laboratoire, de la façon suivante :

Composants de l'EA-36 équivalent de l'EA-50 :

- Eosine Y (C.I.45380)	10 g
- Brun Bismarck Y (C.I.21000)	10 g
- Vert Lumière SF, jaunâtre (C.I.42095)	10 g
- Eau distillée	300 ml
- Alcool à 95%	2000 ml
- Acide phosphotungstique	4 g
- Carbonate de lithium saturé	0,5 ml

(en solution dans l'eau distillée)

Méthode de préparation des solutions mères

1- Préparer des solutions mères à 10% (100 ml/l) de chacun des colorants de la façon suivante :

- 10 g d' Eosine Y dans 100 ml d' eau distillée.
- 10 g de Brun Bismarck dans 100 ml d' eau distillée.
- 10 g de Vert Lumière dans 100 ml d' eau distillée.

2. Pour préparer 2000 ml du colorant final, mélanger les solutions mères précédentes dans les proportions suivantes :

- 50 ml d' Eosine Y
- 10 ml de Brun Bismarck Y
- 12,5 ml de Vert Lumière SF

3. Compléter à 2000 ml avec de l' alcool à 95%; ajouter 4 g d' acide phosphotungstique et 0,5 ml de la solution de carbonate de lithium saturée.

4. Bien mélanger et conserver cette solution à température ambiante dans des flacons en verre teinté brun foncé soigneusement bouchés. La solution du colorant final est stable pendant deux à trois mois. Il est nécessaire de la filtrer avant utilisation.

Constituants de l'Orange G6

- Cristaux d' Orange G (C.I.16230)	10 g
- Eau distillée	100 ml
- Alcool à 95%	1000 ml
- Acide phosphotungstique	0,15 g

Préparation des solutions mères

- Solution mère No. 1

Préparer une solution aqueuse à 10% (100 ml/l) de la façon suivante :

1. 10 g de cristaux d' Orange G dans 100 ml d'eau distillée.
2. bien mélanger et conserver à température ambiante une semaine avant utilisation, dans un flacon en verre teinté brun foncé soigneusement bouché.

- Solution mère No. 2 (Solution d' Orange G6 à 0,5% (5 ml/l))

Préparer cette solution comme suit :

1. 50 ml de la solution mère No. 1.
2. Compléter à 1000 ml avec de l'alcool à 95%.

Pour préparer une solution finale de 1000 ml du colorant :

1. Ajouter 0,15 g d'acide phosphotungstique à 1000 ml de la solution mère No. 2.
2. Mélanger soigneusement et conserver à température ambiante, dans des flacons en verre teinté brun foncé soigneusement bouchés.
3. Filtrer avant usage.

Cette solution est stable pendant deux à trois mois.

Constituants de l' hématoxyline de Harris sans acide acétique

- Hématoxyline (cristaux; C.I.75290)	8 g
- Alcool à 95%	80 ml
- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	160 g
- Eau distillée	1600 ml
- HgO	6 g

Méthode de préparation de la solution finale de colorant

1. Dissoudre par chauffage le sulfate d'aluminium ammoniacal dans de l'eau distillée.
2. Dissoudre les cristaux d' hématoxyline dans l'alcool à 95% (950 ml/l).
3. Ajouter la solution d'hématoxyline à la solution de sulfate d' aluminium ammoniacal.
4. Chauffer le mélange à 95°C.
5. Retirer le mélange de la source de chauffage et ajouter lentement l'oxyde de mercure tout en agitant. La couleur de la solution doit être violet foncé.
6. Plonger immédiatement le récipient contenant la solution dans un bain d'eau froide et filtrer lorsque la solution est froide.
7. Laisser reposer 48 heures et conserver à température ambiante dans des flacons en verre teinté brun foncé.
8. Diluer la quantité requise avec un volume égal d'eau distillée et filtrer à nouveau.

Constituants de la solution de Scott

- NaHCO_3	3,5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,0 g
- Eau distillée	1000 ml

La solution de Scott doit être utilisée seulement lorsque l'eau du robinet présente une certaine dureté. Elle doit être changée fréquemment, en moyenne après 20 à 25 rinçages de lame.

Constituants de la solution d'éthanol acide

- Alcool à 99,5%	300 ml
- HCl concentré	2,0 ml
- Eau distillée	100 ml

B. Coloration de Shorr

Les frottis une fois fixés (dans un mélange 3/4 ethanol, 1/4 acide acétique pendant 1 heure, après avoir été séchés à l'air) sont colorés selon les étapes successives suivantes :

- eau courante	12-15 immersions
- hématoxyline	1-2 minutes
- eau courante	12-15 immersions
- alcool ammoniacqué	5 passages de 5 minutes chacun
- eau courante	12-15 immersions
- alcool à 50% (500 ml/l)	5 minutes
- colorant de Shorr	3-5 minutes
- alcool à 50%	5 minutes
- alcool à 75% (750 ml/l)	5 minutes
- alcool à 95% (950 ml/l)	5 minutes
- alcool absolu	2 passages de 5 minutes chacun
- xylol	2 passages de 5 minutes chacun

Chaque immersion doit durer 1 seconde environ.

Réactifs

(1) Hématoxyline de Papanicolaou No. 1 (Merck, Darmstadt, Allemagne, Référence 9253).

(2) Alcool ammoniacqué

95 ml d'éthanol à 75% + 5 ml d'hydroxyde d'ammonium à 25% (250 ml/l).

(3) Solution Shorr de Merck (Référence 9275)

ou Shorr de BDH en poudre	4g
alcool à 50%	220 ml
acide acétique glacial	2,0 ml

- Dissoudre la poudre dans l'alcool préchauffé et laisser refroidir
- Dans une sorbonne, ajouter l'acide acétique et filtrer.

Montage des lames (optionnel)

La procédure précédemment décrite de montage des lames après coloration au Papanicolaou modifié est utilisée après coloration de Shorr.

Principe d'observation et de lecture

Procédure

- La lecture des lames colorées est faite à l'objectif x100 à immersion (soit un grossissement final de x1000 avec des oculaires de x10)

- L'un des oculaires est muni d'un réticule gradué nécessaire pour prendre une décision de classification à chaque fois que l'on hésitera sur un critère de taille (tête amincie par rapport à tête normale, par exemple)
- La lecture doit être faite en queue de frottis sur des champs microscopiques jointifs, avec un balayage en "méandre" de la lame et des champs (Figure 5). Si l'échantillon est très concentré, on ne doit pas lire sur un seul champ
- Les têtes des spermatozoïdes plus ou moins normaux présentent une face et un profil: elles se couchent donc lors de la réalisation du frottis, se présentant ainsi de face pour l'observation ; cependant, dans certains spermatozoïdes avec des anomalies de la viscosité, des spermatozoïdes en nombre plus ou moins important peuvent se présenter de profil. L'aspect de profil est assez caractéristique, en "flamme de bougie" et la texture est homogène sans distinction d'une région acrosomique : ces spermatozoïdes doivent être reconnus comme tels et ne pas être confondus avec des spermatozoïdes avec une tête amincie. Il ne faut pas les classer car il est impossible de faire une description morphologique à partir d'un profil.

Méthode de classification : la classification de David modifiée, la plus largement utilisée en France

(Pour la classification préconisée par l'OMS, le lecteur se référera au Manuel de l'OMS, édition de 1999, une nouvelle édition est en préparation)

La méthode de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité du mâle et publiée en 1975. La classification initiale comportait 13 types d'anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. L'originalité de la méthode de classification repose sur la prise en compte de toutes les anomalies observées grâce à un système de classification à entrées multiples : un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est défini par l'ensemble de ces anomalies c'est à dire qu'il figure plusieurs fois dans la grille de classement à chacune des anomalies concernées.

Depuis les années soixante dix, de nombreux laboratoires français, publics et privés ont adopté cette classification et, à l'initiative de plusieurs biologistes l'utilisant très régulièrement, elle a été modifiée au début des années quatre vingt dix par une redéfinition des catégories d'anomalies et l'adjonction de deux nouvelles catégories d'anomalies. Cette modification correspondait à un souci accru des biologistes de la reproduction de voir figurer dans la grille toute atypie morphologique reflétant un possible défaut ultra structural susceptible d'avoir un retentissement fonctionnel. Ainsi la catégorie "têtes irrégulières" a-t-elle été scindée en deux catégories distinguant d'une part les atypies de la région acrosomique et, d'autre part, les atypies de la région postacrosomique (anomalies de forme et/ou de contour et/ou de texture, dans les deux cas) pouvant toutes deux être à l'origine de perturbations de l'interaction gamétique.

La classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

- 7 anomalies de la tête : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, anomalies de la région acrosomique, anomalies de la base (région postacrosomique)
- 3 anomalies de la pièce intermédiaire (PI) : reste cytoplasmique, PI grêle, PI angulée et
- 5 anomalies de la pièce principale : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée et multiple.

Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 spermatozoïdes au minimum (200 de préférence) doivent être classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir de 50 spermatozoïdes mais le résultat pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée des fréquences des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares.

Les flagelles isolés ou les spermatozoïdes en lyse ne sont pas classés dans la grille de lecture modifiée mais leur fréquence est évaluée parallèlement au compte des spermatozoïdes normaux et anormaux. Il en est de même pour la fréquence des cellules de la lignée blanche, des autres cellules (cellules du tractus urogénital) et des fragments cellulaires.

Lors de la refonte de la grille de lecture, il a été décidé de faire figurer systématiquement l'index d'anomalies multiple ou IAM proposé en 1988 à côté du pourcentage de spermatozoïdes normaux et du détail des anomalies recensées. Cet index est en fait une application directe du système original à entrée multiples de la méthode : l'IAM n'est autre que le rapport du nombre total d'anomalies recensées au nombre total de spermatozoïdes anormaux. L'IAM est donc un indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal.

Critères de définition des spermatozoïdes morphologiquement normaux, des différentes catégories d'anomalie morphologiques et exemples d'anomalies associées

Spermatozoïdes morphologiquement normaux

L'étude des spermatozoïdes récupérés après migration dans le mucus cervical préovulatoire a aidé à définir les caractéristiques du spermatozoïde normal. En effet, un nombre important de spermatozoïdes présentant des anomalies de structure diverses sont retenus par le filtre naturel que constitue le mucus cervical préovulatoire.

Définition :

la tête a un contour régulier ovalaire avec un grand axe mesurant environ 5 µm et un petit axe mesurant environ 3 µm (rapport grand axe/petit axe = 1,66). La longueur et/ou la largeur de la tête peuvent être légèrement diminuées sans que celle-ci soit pour autant considérée comme anormale. Le rapport possible grand axe/petit axe peut donc fluctuer entre 1,33 et 2. La région acrosomique (plus claire) représente 40 à 70 % de la surface de la tête, elle a un contour régulier et une texture homogène.

La pièce intermédiaire normale peu visible en microscopie conventionnelle mesure de 1,5 à 2 fois la longueur de la tête, a un diamètre de 0,6 à 0,8 µm, son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête, présente un contour régulier, une texture homogène et un reste cytoplasmique de taille minimale à son niveau n'est pas considéré comme anormal.

Enfin, la pièce principale, c'est à dire le reste du flagelle, mesure environ 45 µm (soit environ 10 fois la longueur de la tête), a un diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,5 µm, est développée avec un contour régulier et un aspect homogène.

Figure 11 : Aspect schématique du spermatozoïde morphologiquement normal et définitions

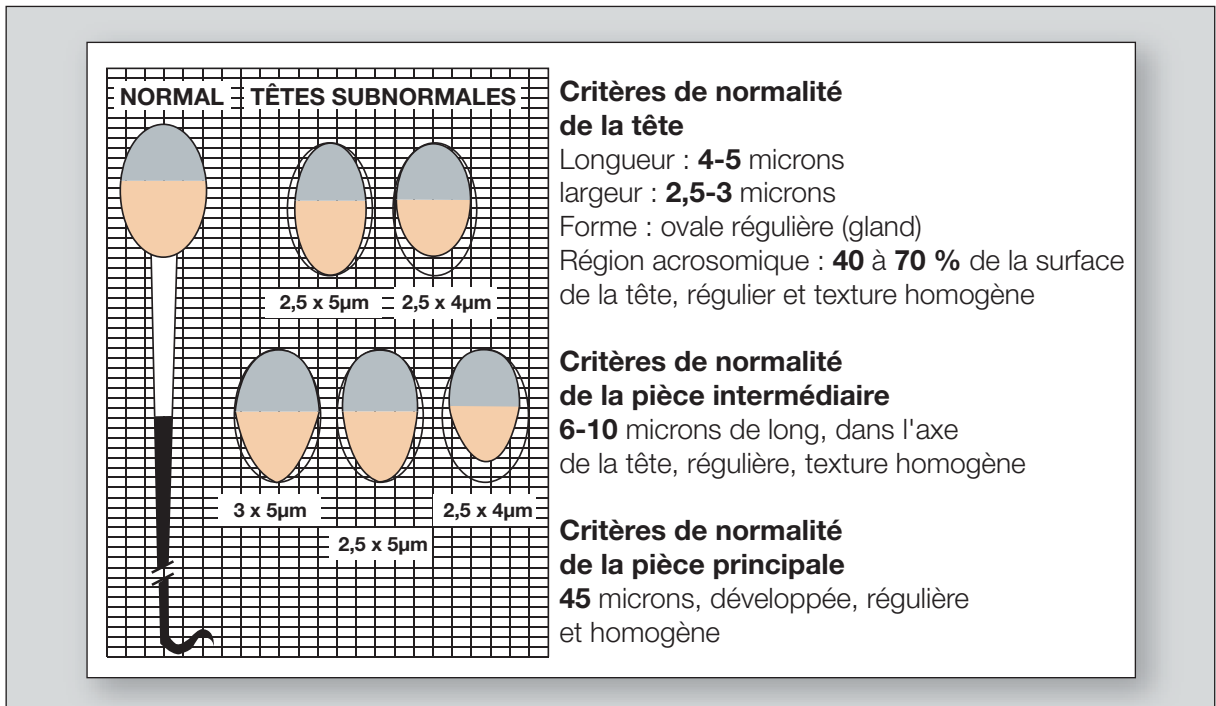
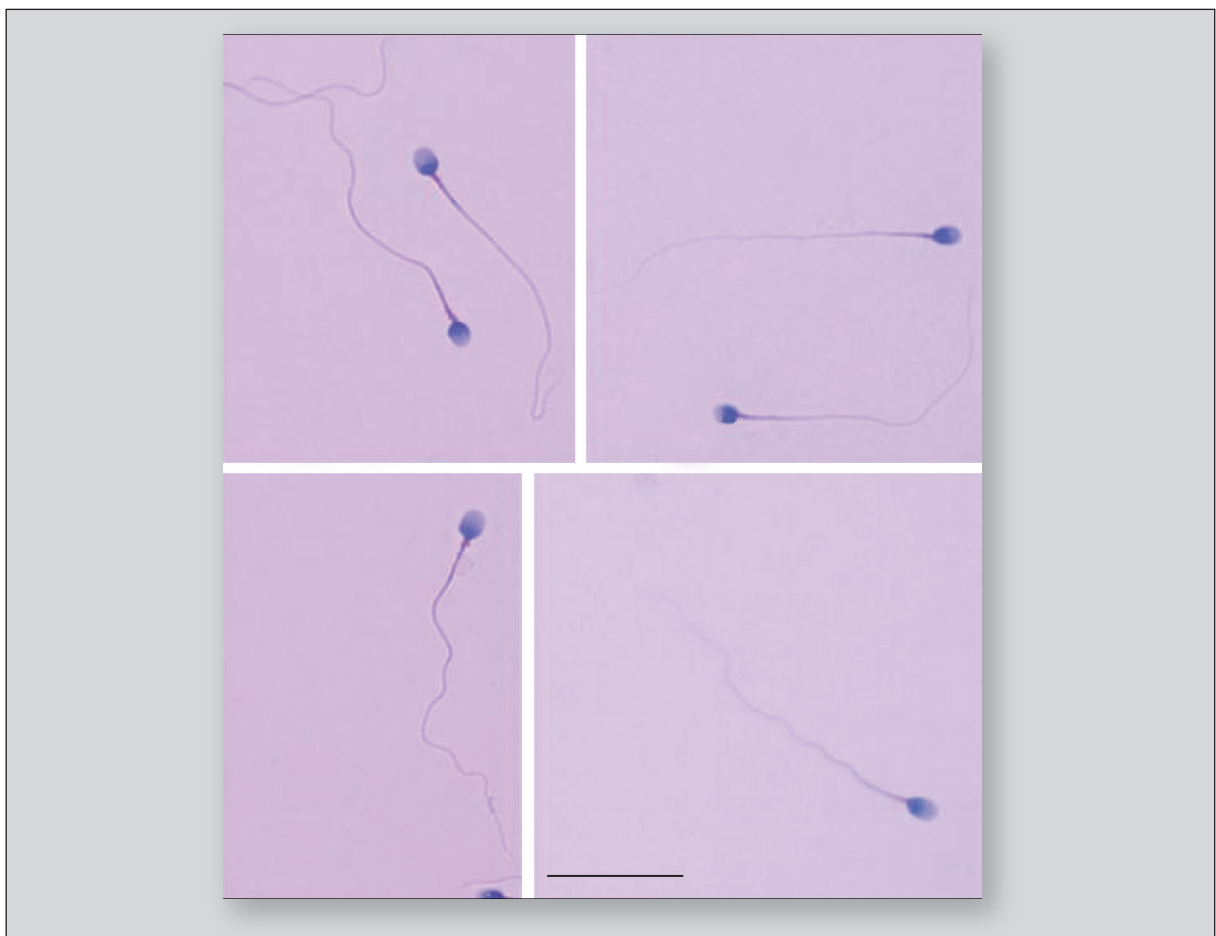


Figure 12 : Spermatozoïdes typiques (la barre représente 20µm)



Spermatozoïdes morphologiquement anormaux

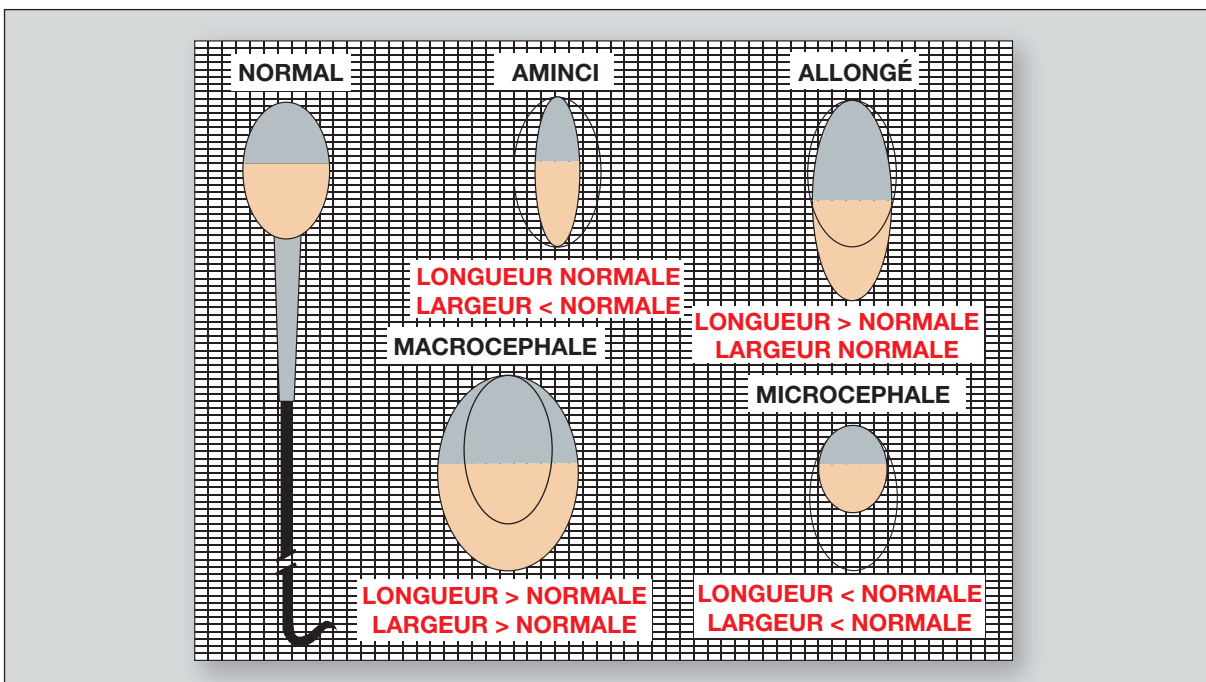
Les catégories d'anomalies définies dans la classification en microscopie optique découlent des observations faites en microscopie électronique à transmission et des possibles implications fonctionnelles. Pour chacune d'entre elles, une définition précise est donnée avec l'illustration correspondante et, le lien entre l'aspect en microscopie conventionnelle et le substratum ultrastructural est brièvement exposé. En pratique, à chaque fois que possible, on utilise les spermatozoïdes normaux comme "comparateur visuel" pour classer les différentes atypies et notamment les atypies de taille de la tête ou du flagelle. Ce travail de comparaison est facilité lorsque les spermatozoïdes jugés normaux sont suffisamment nombreux pour que des spermatozoïdes normaux et anormaux se situent dans le même champ microscopique. Sinon il faut balayer la préparation à la recherche de spermatozoïdes typiques à chaque fois que l'on a un doute sur la taille de la tête ou du flagelle du spermatozoïde en cours d'observation. L'utilisation du réticule gradué est recommandée pour l'aide à la décision dans ces situations et encore plus lorsqu'aucun spermatozoïde de la préparation ne semble normal : dans ce cas on doit se référer aux critères de taille du spermatozoïde normal (voir plus haut) en s'aidant du micromètre oculaire.

Anomalies de la tête

Taille / forme de la tête anormale: têtes allongées, amincies, microcéphalie et macrocéphalie

Toutes ces anomalies morphologiques sont en rapport avec un défaut de la morphogénèse de la tête et/ou du noyau. Il existe une assez bonne concordance entre l'aspect des anomalies de forme observées en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission. Pour ces spermatozoïdes, les anomalies du matériel nucléaire mises en évidence par cytométrie d'image en microscopie électronique à transmission sont beaucoup plus fréquentes que parmi les spermatozoïdes normaux. Il en est de même lorsqu'on utilise des colorations spécifiques du noyau, bleu d'aniline pour l'évaluation de la maturité nucléaire, acridine orange pour l'évaluation de l'intégrité de l'ADN, Feulgen pour l'évaluation de la ploïdie (les spermatozoïdes macrocéphales sont le plus souvent diploïdes). Pour toutes ces anomalies, le réticule gradué ou micromètre oculaire sera utilisé à chaque fois que l'on a un doute sur la taille.

Figure 13 : Schéma des anomalies de taille et/ou de forme de la tête



Ces anomalies concernent des modifications de longueur du grand axe et /ou du petit axe de la tête.

Tête allongée

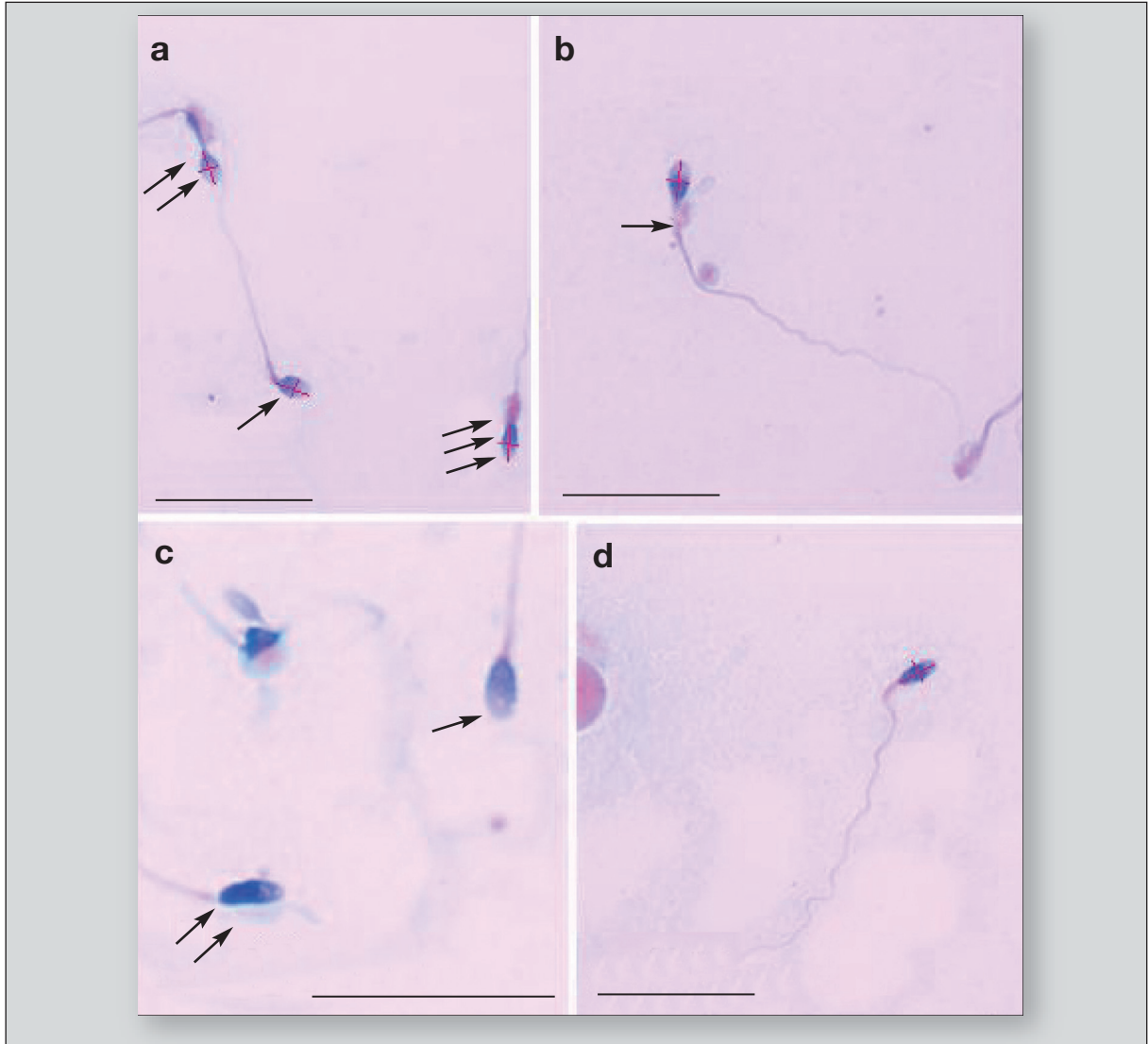
Définition : le grand axe est plus long que la normale et le petit axe présente une longueur normale.

Tête amincie

Définition : le petit axe a une longueur plus petite que la normale et le grand axe présente une longueur normale.

Figure 14 : Anomalies de taille de la tête : têtes allongées et têtes amincies

(la barre représente 20µm)



a) Spermatozoïdes présentant une tête de taille normale (1 flèche), une tête allongée (2 flèches) et une tête amincie (3 flèches) (la croix rouge indique les critères de taille d'une tête normale, grand axe ~5 µm, petit axe ~3 µm) **b)** Le spermatozoïde présentant une tête allongée est unique dans ce champ : si l'on a un doute sur la taille on s'efforce de trouver un spermatozoïde présentant une tête normale dans un autre champ afin de disposer d'un élément de comparaison ; une autre alternative pour classer ce spermatozoïde à tête allongée - notamment lorsqu'il n'existe pas de spermatozoïde avec une tête de taille normale dans la préparation - consiste à s'aider du réticule gradué de l'objectif et des critères de taille d'une tête normale (noter que la tête débute au niveau de la flèche) **c)** Spermatozoïde avec une taille de tête normale (1 flèche) et spermatozoïde avec une tête amincie (2 flèches) **d)** Spermatozoïde isolé à tête amincie : même remarque que pour b)

Microcéphale

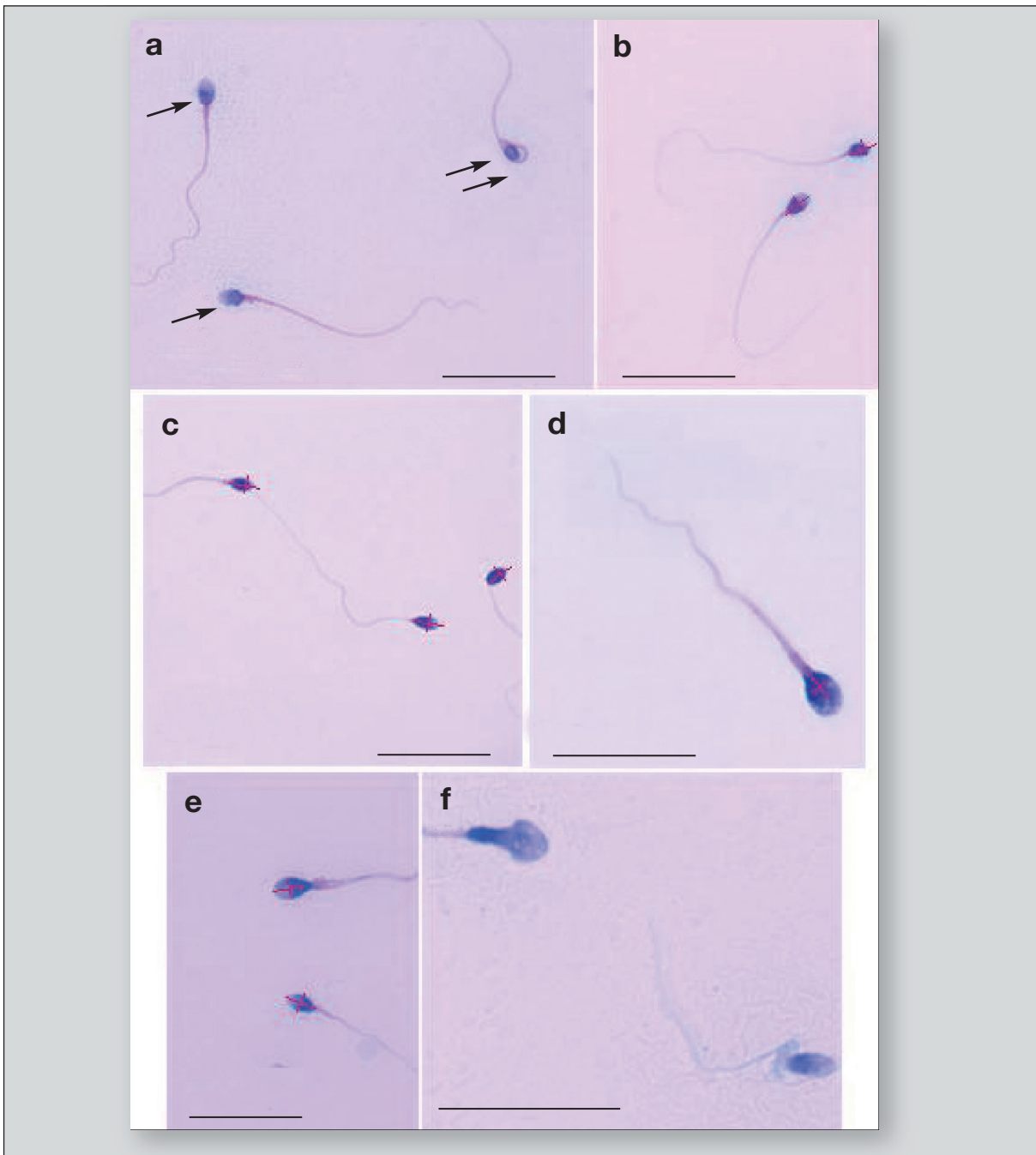
Définition : le grand axe et le petit axe ont des longueurs plus petites que la normale.

Dans cette catégorie entrent les têtes rondes le plus souvent dépourvues d'un acrosome, mais il existe d'autres aspects de spermatozoïdes microcéphales avec un acrosome plus ou moins normal.

Macrocéphale

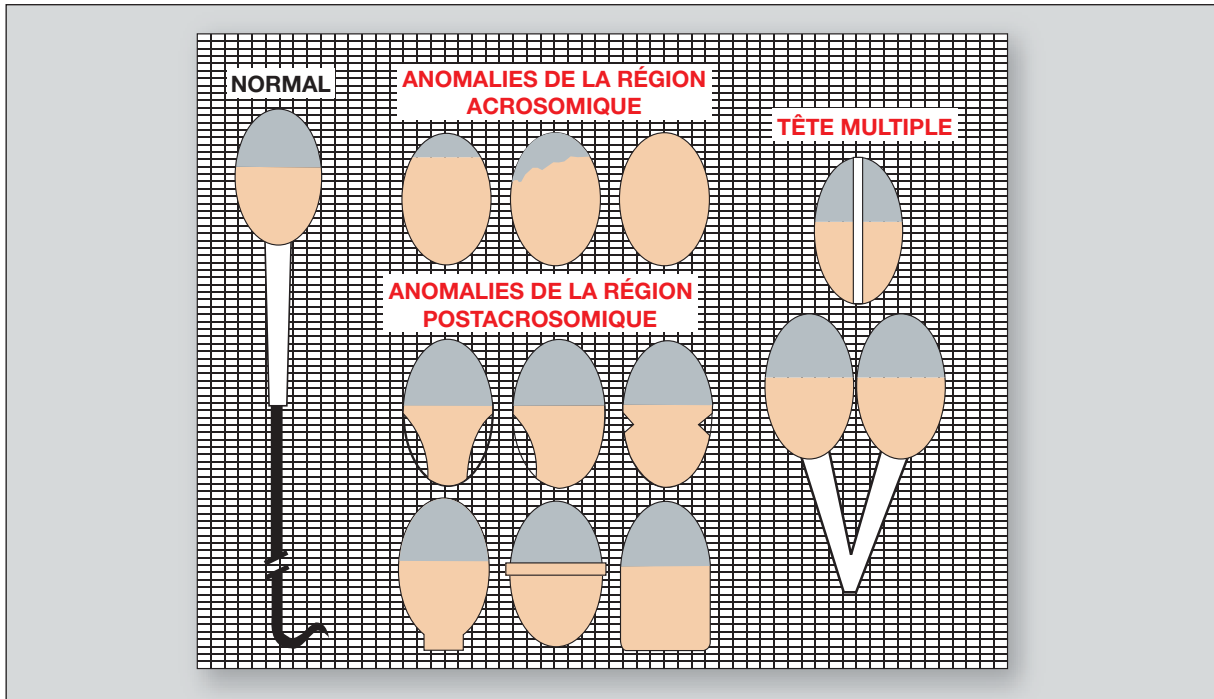
Définition : le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale.

Figure 15 : Anomalies de taille de la tête : têtes microcéphales et macrocéphales
(la barre représente 20µm)



- a)** Spermatozoïdes présentant une tête de taille normale (1 flèche) et une tête microcéphale arrondie (2 flèches). **b)** Spermatozoïdes présentant une tête de taille normale et une tête microcéphale arrondie (la croix rouge indique les critères de taille d'une tête normale, grand axe ~5 µm, petit axe ~3 µm). **c)** 3 spermatozoïdes microcéphales avec un rapport grand axe / petit axe conservé. **d)** Spermatozoïde macrocéphale avec un rapport grand axe / petit axe conservé. **e)** Spermatozoïdes présentant une tête de taille normale et une tête macrocéphale. **f)** Spermatozoïde macrocéphale avec une forme inusuelle

Figure 16 : Schéma des anomalies de forme et ou de texture des régions acrosomique et postacrosomique et têtes multiples



Têtes multiples

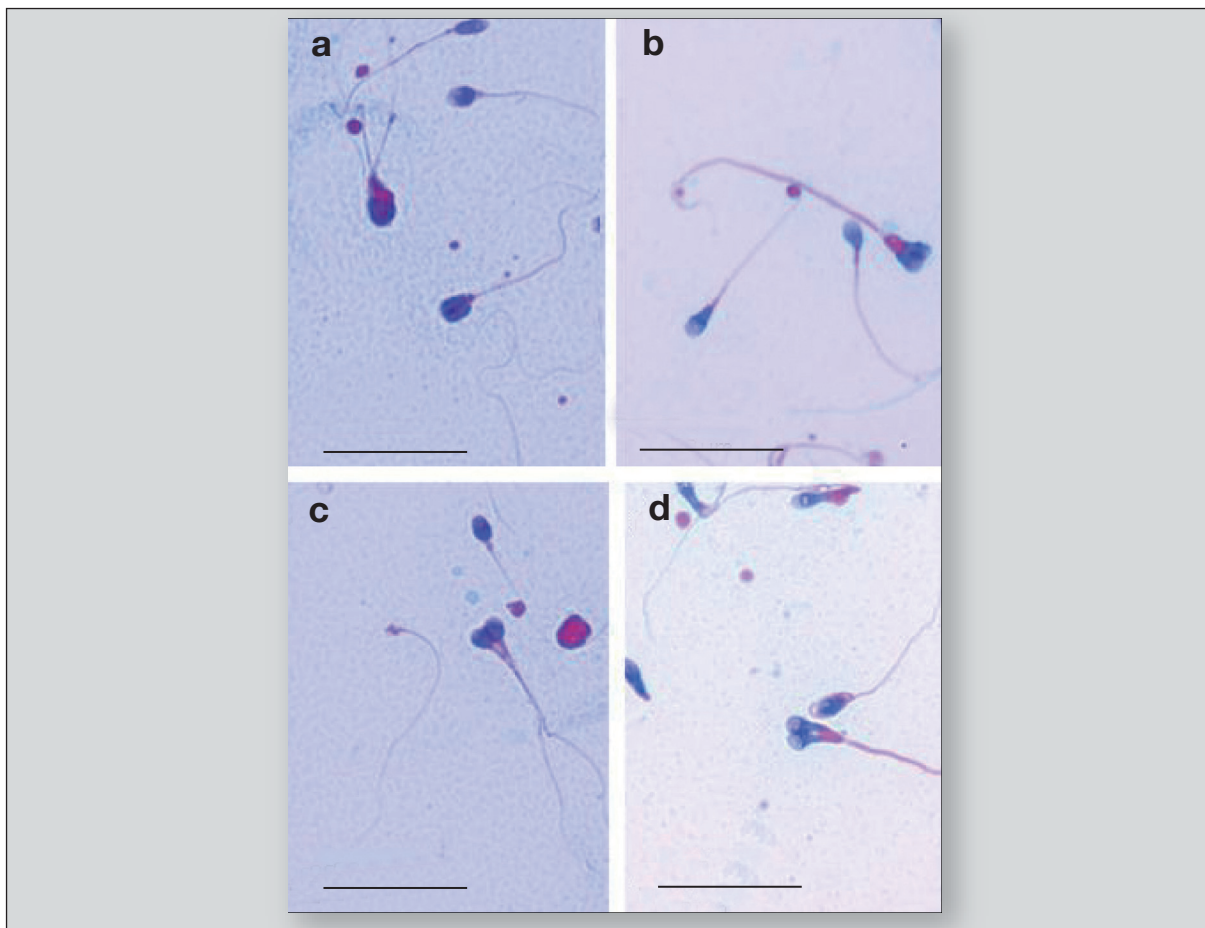
Définition : il y a plus d'une tête par spermatozoïde. Elles peuvent être accolées et occuper une surface totale similaire à celle d'une seule tête ou bien être parfaitement dissociées.

En microscopie électronique à transmission, on constate que ces anomalies sont dues à la persistance de ponts cytoplasmiques plus ou moins importants entre des cellules germinales d'une même onde spermatogénétique qui font que les noyaux demeurent contigus (formes binuclées) ou que des têtes bien individualisées restent associées (formes bicéphales) avec parfois un début de dédoublement de la pièce intermédiaire. On peut observer des anomalies multiples concernant trois noyaux ou têtes et plus.

Figure 17 : Têtes multiples (la barre représente 20µm)

Les têtes peuvent être accolées et occuper une surface totale similaire à celle d'une seule tête, « tête binucléée » **(a)** ou bien être plus ou moins séparées, « formes bicéphales » **(b-c-d)**.

On peut aussi observer trois noyaux ou têtes et plus.

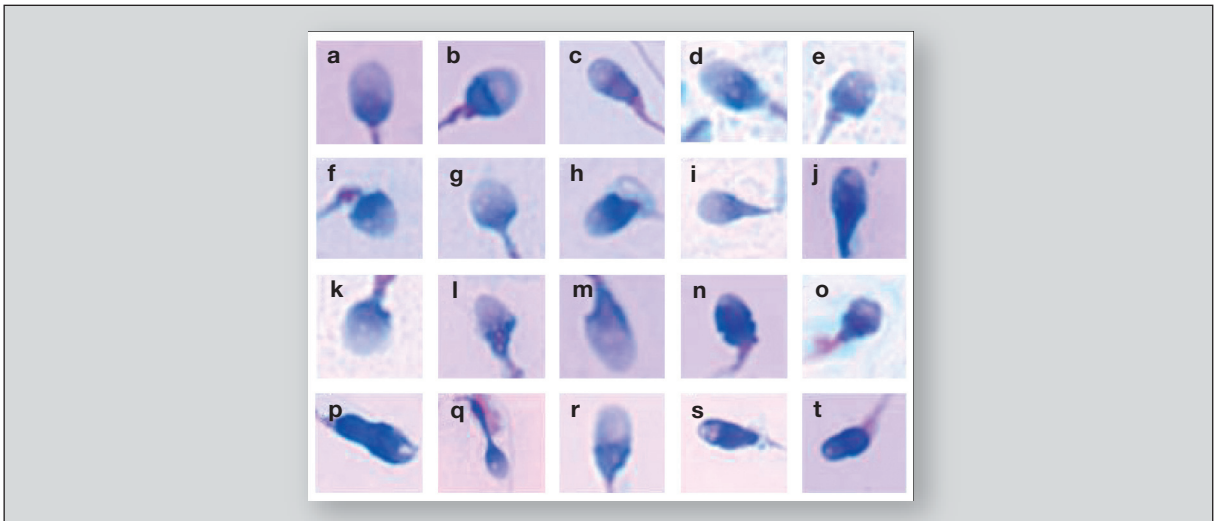


Anomalies de la base de la tête ou région post-acrosomique

Définition : toutes les anomalies de contour et de texture de la région postacrosomique (le contour doit normalement correspondre à une courbe bien régulière).

En principe, cette partie de la tête est assez uniformément colorée car correspondant à la projection de la partie épaisse et compacte du noyau: les anomalies de texture sont donc assez rares. Par contre, les anomalies de contour sont fréquentes. Il est impossible de toutes les répertorier et la [Figure 18](#) donne des exemples des formes les plus courantes. Toutes ces anomalies morphologiques de la base présentent une assez bonne concordance avec ce qui est observé en microscopie électronique à transmission. Ces anomalies semblent correspondre à un défaut de la morphogenèse de la tête et/ou du noyau dans sa partie distale. En microscopie électronique à transmission, les anomalies de contour de la base sont le plus souvent associées à des anomalies des structures adjacentes et notamment de la cape postacrosomique qui joue un rôle prédominant dans l'interaction du spermatozoïde avec l'ovocyte.

Figure 18 : Anomalies de la région post-acrosomique (souvent appelées anomalies de la base)



Région post-acrosomique de contour et de texture normale **(a)** ; anomalie de texture **(b)** ; base tronconique **(c)** ; base tronconique asymétrique **(d)** ; base aplatie **(e)** ; bases plus ou moins pointues, symétriques et régulières **(f-j)** ; aspect encoché unilatéral **(k-k)** ; concavité unilatérale **(l-m)** ; encoches ou rétrécissements bilatéraux plus ou moins marqués **(n-o-p)** ; aspect caractéristique en battant de cloche **(q)** ; contour irrégulier sur un côté **(r-s)** ; base plus large que la région acrosomique **(t)**

Anomalies de la région acrosomique

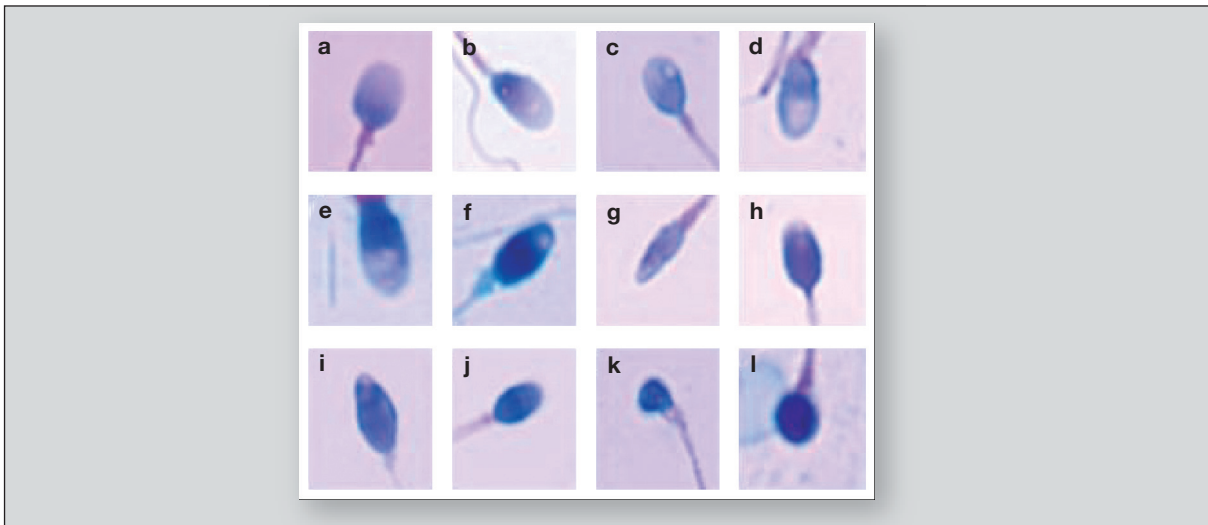
Définition : on classe dans cette catégorie toute anomalie de taille, de contour ou de texture de la région acrosomique.

La surface de la région acrosomique est inférieure à 40% ou supérieure à 70% de la surface totale de la tête (cette évaluation n'est pas toujours aisée car il n'existe pas toujours une limite nette entre régions acrosomique et postacrosomique: en cas de doute, s'aider de la comparaison avec les spermatozoïdes normaux et utiliser si nécessaire le réticule gradué en le plaçant le long du grand axe et en comparant les rapports de longueur de "l'acrosome" et de la tête) et/ou

- le contour de "l'acrosome" est irrégulier (il peut y avoir une ou plusieurs encoches sur le contour externe ou bien la limite interne n'est pas rectiligne et/ou non perpendiculaire au grand axe) et/ou
- la texture de "l'acrosome" est inhomogène (avec des aspects de vacuoles irrégulières; attention des vacuoles bien circulaires avec un halo de colorant correspondent le plus souvent à des artefacts de préparation et ne doivent pas être notées comme de vraies vacuoles) ou
- la région acrosomique a la même tonalité que la région postacrosomique suggérant une absence d'acrosome (mais cet aspect peut aussi correspondre à l'absence d'aplatissement du noyau dans cette région, signe d'immaturation nucléaire).

La microscopie électronique à transmission révèle de très nombreuses anomalies de forme, de taille et de positionnement de l'acrosome par rapport au noyau qui peuvent affecter l'interaction gamétique.

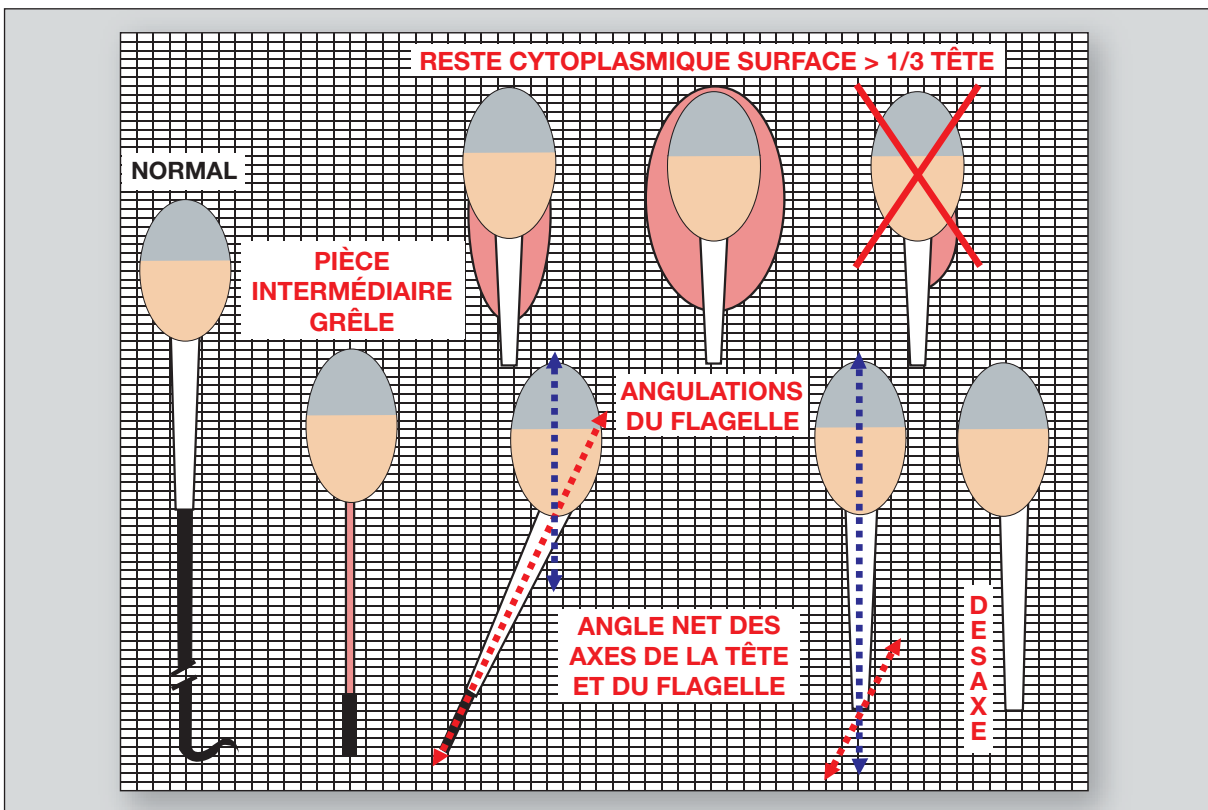
Figure 19 : Anomalies de la région acrosomique.



Région acrosomique dont les contours, la taille et la texture sont normaux **(a)** ; aspect subnormal de la région acrosomique, à considérer comme normal **(b)** ; la vacuole ne doit pas être considérée comme une anomalie : il s'agit d'un artefact lié à la coloration (forme très ronde et liseré de colorant) **(c)** ; texture hétérogène **(d-e)** ; petite taille **(f)** ; petite taille et hétérogène **(g-h-i)** ; densité de la région acrosomique similaire (j) ou identique à celle de la région post-acrosomique (k-l) **(j-k-l)**

Anomalies de la pièce intermédiaire

Figure 20 : Schéma des anomalies de la pièce intermédiaire

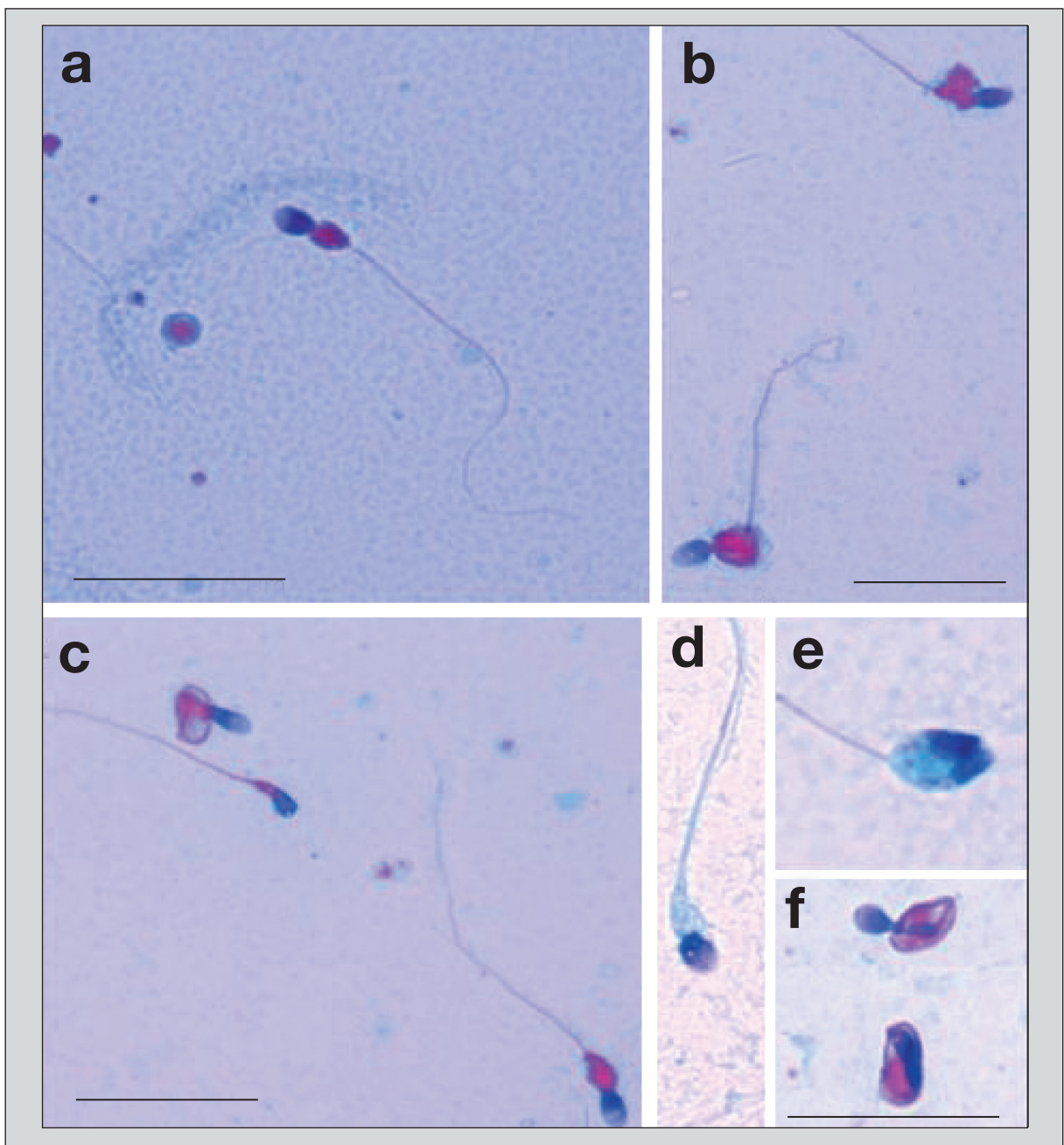


Reste cytoplasmique

Définition : le reste cytoplasmique est considéré comme une anomalie s'il a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe le plus souvent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire et c'est pourquoi il est classé comme anomalie de la pièce intermédiaire mais il peut également entourer l'ensemble de la cellule (souvent dans le cas de spermatozoïdes enroulés) ou englober seulement la tête.

Normalement, l'essentiel du cytoplasme des spermatozoïdes est éliminé lors de l'excrétion des spermatozoïdes testiculaires dans la lumière des tubes séminifères. Un reste cytoplasmique de taille importante est un signe d'immaturité cellulaire : soit les spermatozoïdes se séparent prématurément de l'épithélium germinal soit le processus de reprise du cytoplasme par les cellules de Sertoli lors de l'excrétion des spermatozoïdes dans le tube séminifère (spermiation) fait défaut. Tous ces restes cytoplasmiques sont clairement mis en évidence en microscopie électronique à transmission.

Figure 21 : Restes cytoplasmiques (la barre représente 20µm)

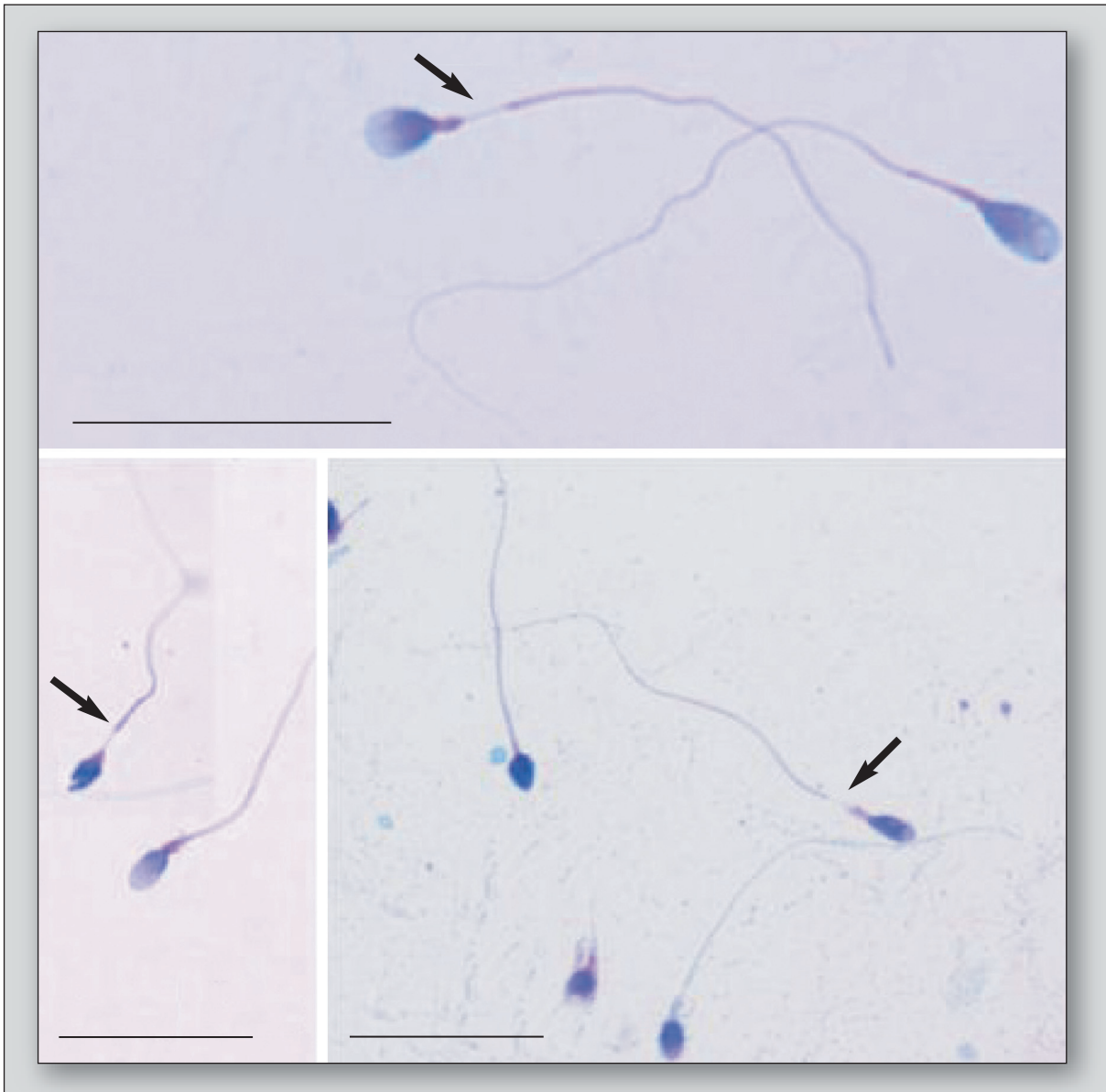


Pièce intermédiaire grêle

Définition : le diamètre de la pièce intermédiaire est égal ou inférieur au diamètre de la pièce principale dans sa partie initiale.

Cette anomalie correspond à une gaine mitochondriale qui ne s'est pas constituée (ou s'est incomplètement constituée).

Figure 22 : Pièce intermédiaire grêle (la barre représente 20µm)

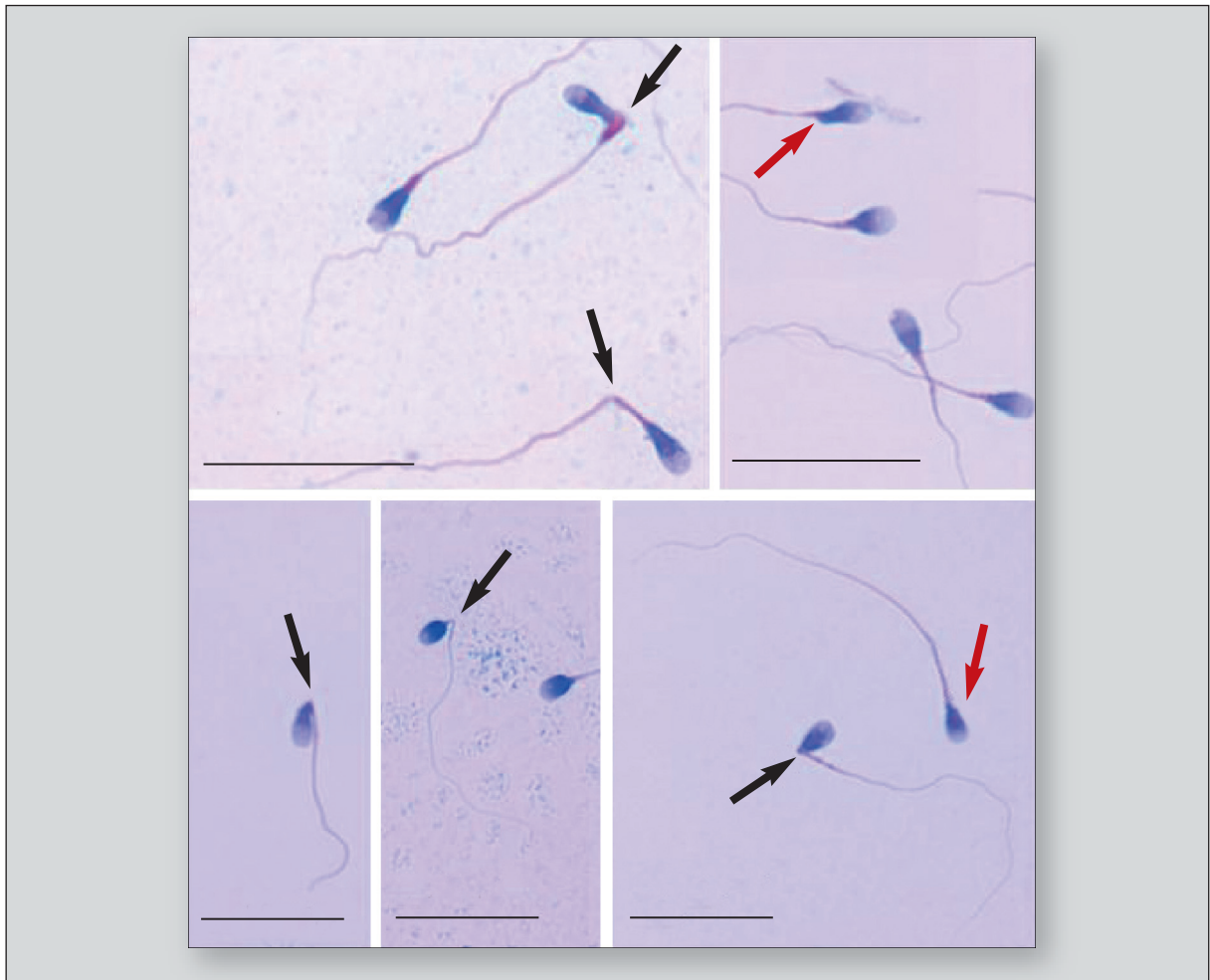


Angulations du flagelle

Définition : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête ou l'axe de la pièce principale, forment un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête.

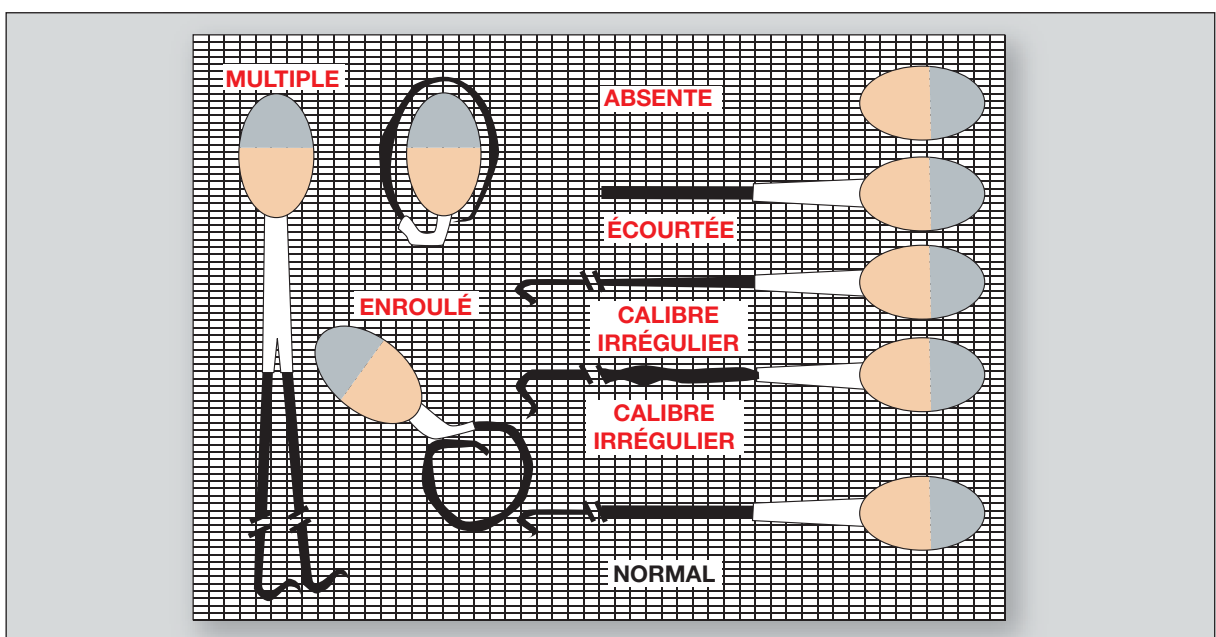
Les angulations sont bien visibles en microscopie électronique. Elles se présentent sous la forme d'une plicature à la jonction de la pièce intermédiaire et de la pièce principale ou plus loin sur le flagelle et régulièrement les structures axonémales et périaxonémales en regard sont désorganisées. Certains aspects d'angulation souvent aiguë ou de désaxement se situent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire. Ils correspondent à des défauts ultrastructuraux d'un autre type car intéressant les organites de la région du cou. Par commodité, ils sont classés avec les angulations flagellaires au niveau de la pièce intermédiaire.

Figure 23 : Pièce intermédiaire angulée (flèche noire) ou désaxée (flèche rouge) (la barre représente 20µm)



Anomalies de la pièce principale

Figure 24 : Schéma des différentes anomalies de la pièce principale



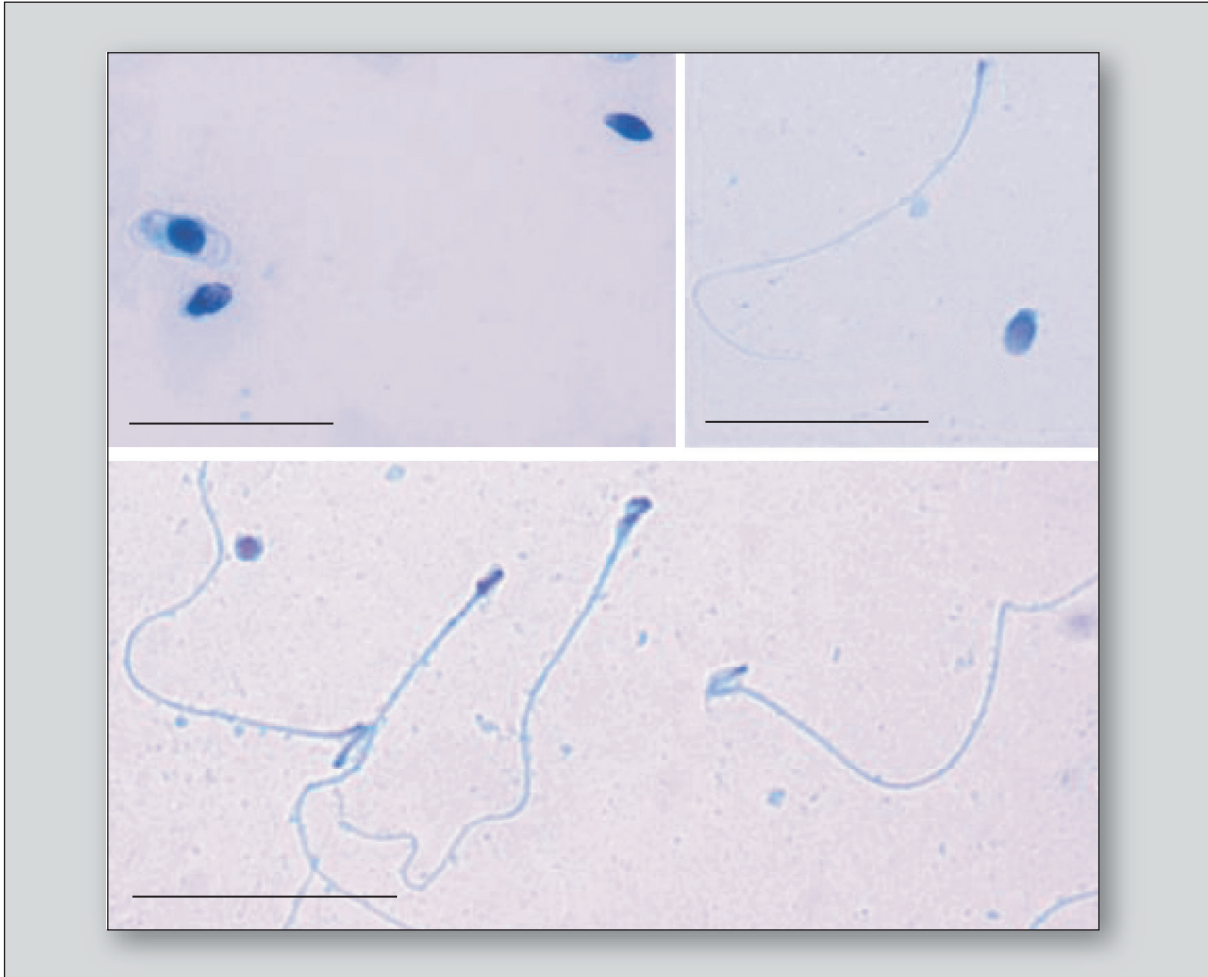
Flagelle absent

Définition : les têtes isolées sont comptées dans cette catégorie.

La pathologie ultrastructurale intéresse les colonnes striées qui sont absentes et/ou la pièce connective qui est rudimentaire.

Note : la figure 25 présente aussi des flagelles isolés qui sont classés en dehors de la grille principale.

Figure 25 : Flagelles absents et flagelles isolés (la barre représente 20µm)

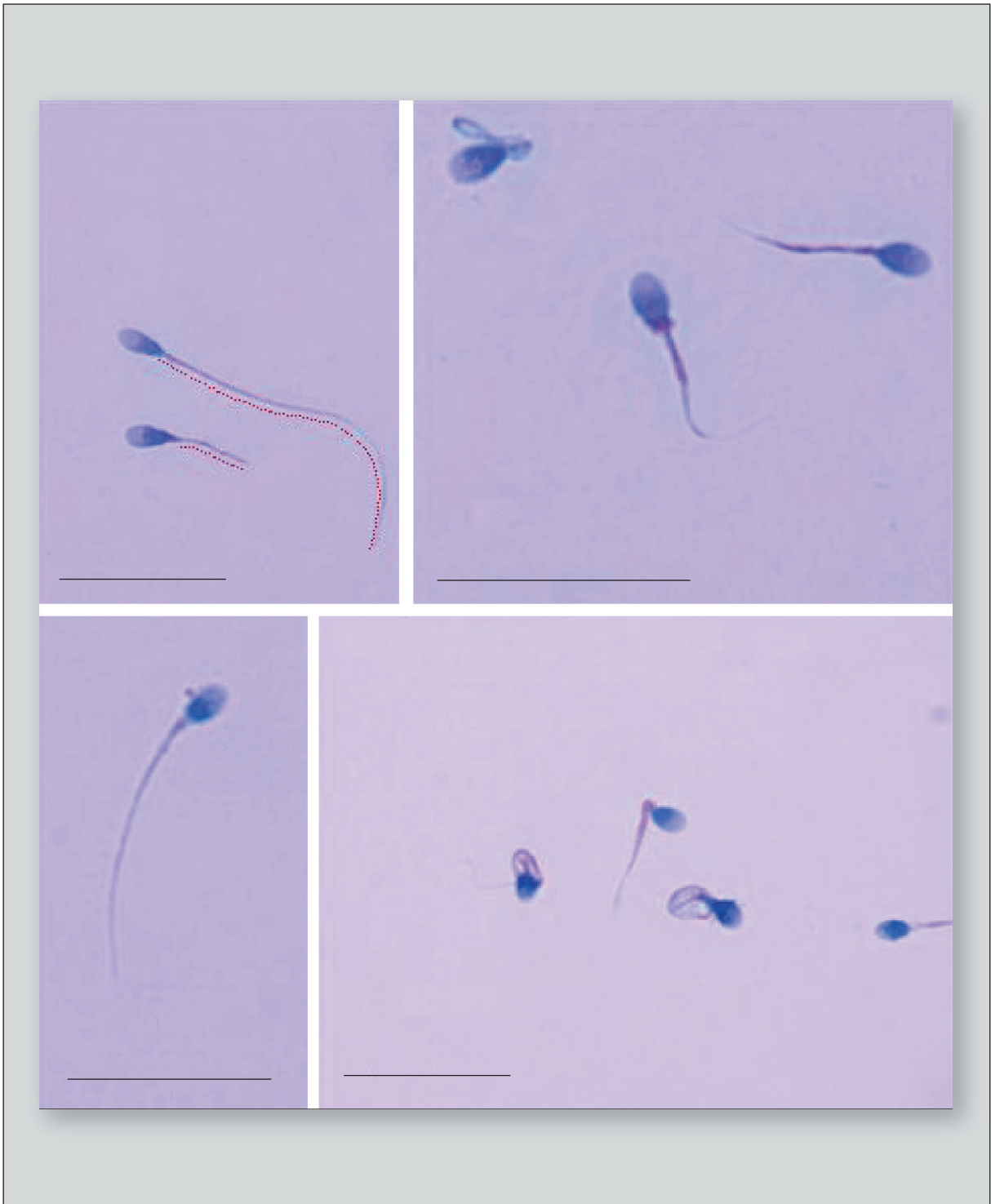


Flagelle court

Définition : le flagelle est significativement écourté (< 5 fois la longueur de la tête).

La microscopie électronique à transmission indique parfois que le flagelle est court du fait d'une brièveté de la pièce intermédiaire mais, le plus souvent, on observe des flagelles courts et épaissis avec une prolifération des éléments composant la gaine fibreuse. Ces flagelles ne sont pas fonctionnels.

Figure 26 : Flagelles courts (la barre représente $20\mu\text{m}$)

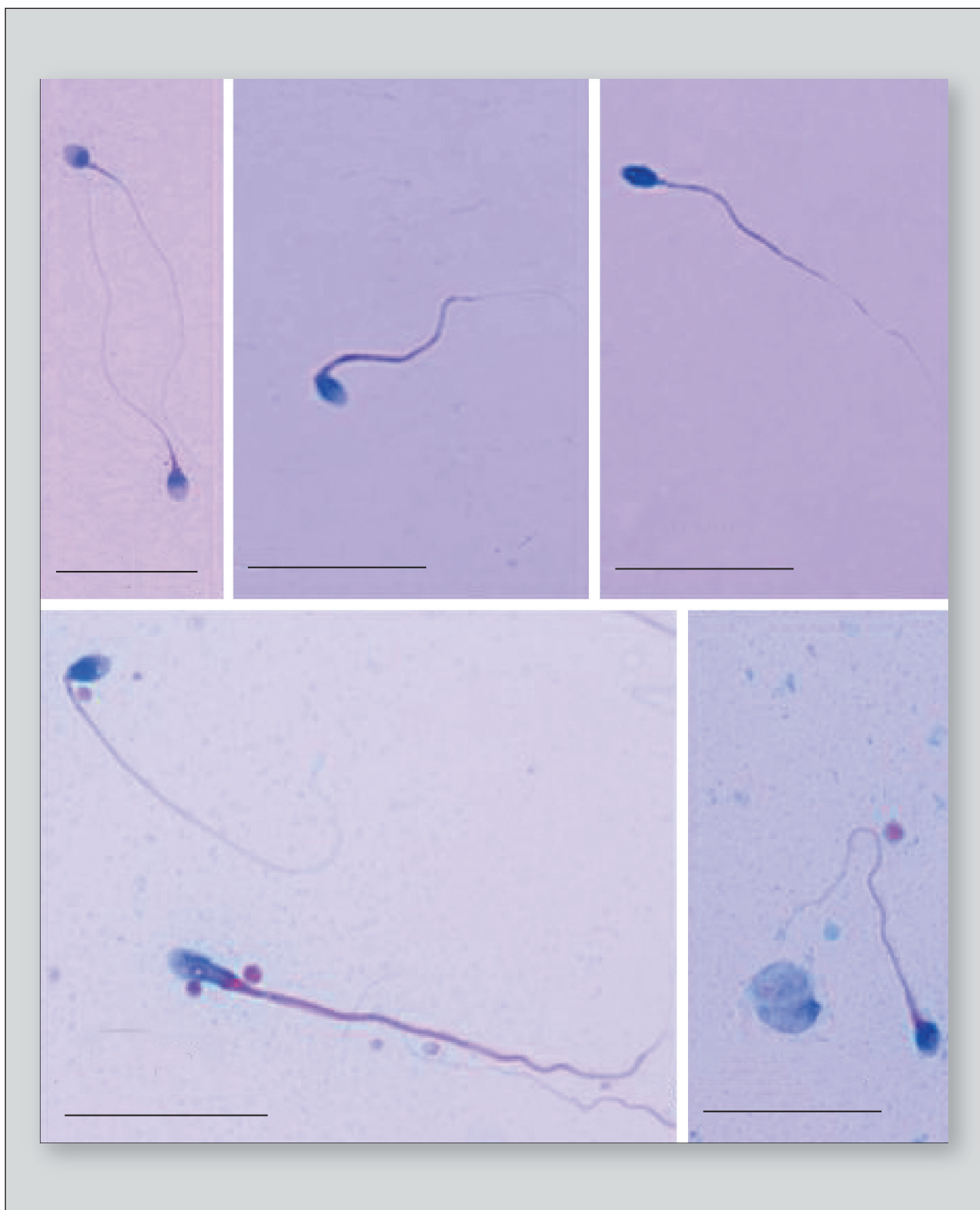


Flagelle irrégulier

Définition : le diamètre de la pièce principale est variable, présentant des rétrécissements ou des élargissements.

En microscopie électronique à transmission, cette anomalie correspond à des désorganisations étagées de l'axonème et/ou du périaxonème.

Figure 27 : Flagelles présentant des anomalies de calibre (la barre représente 20µm)



Flagelle enroulé

Définition : le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête.

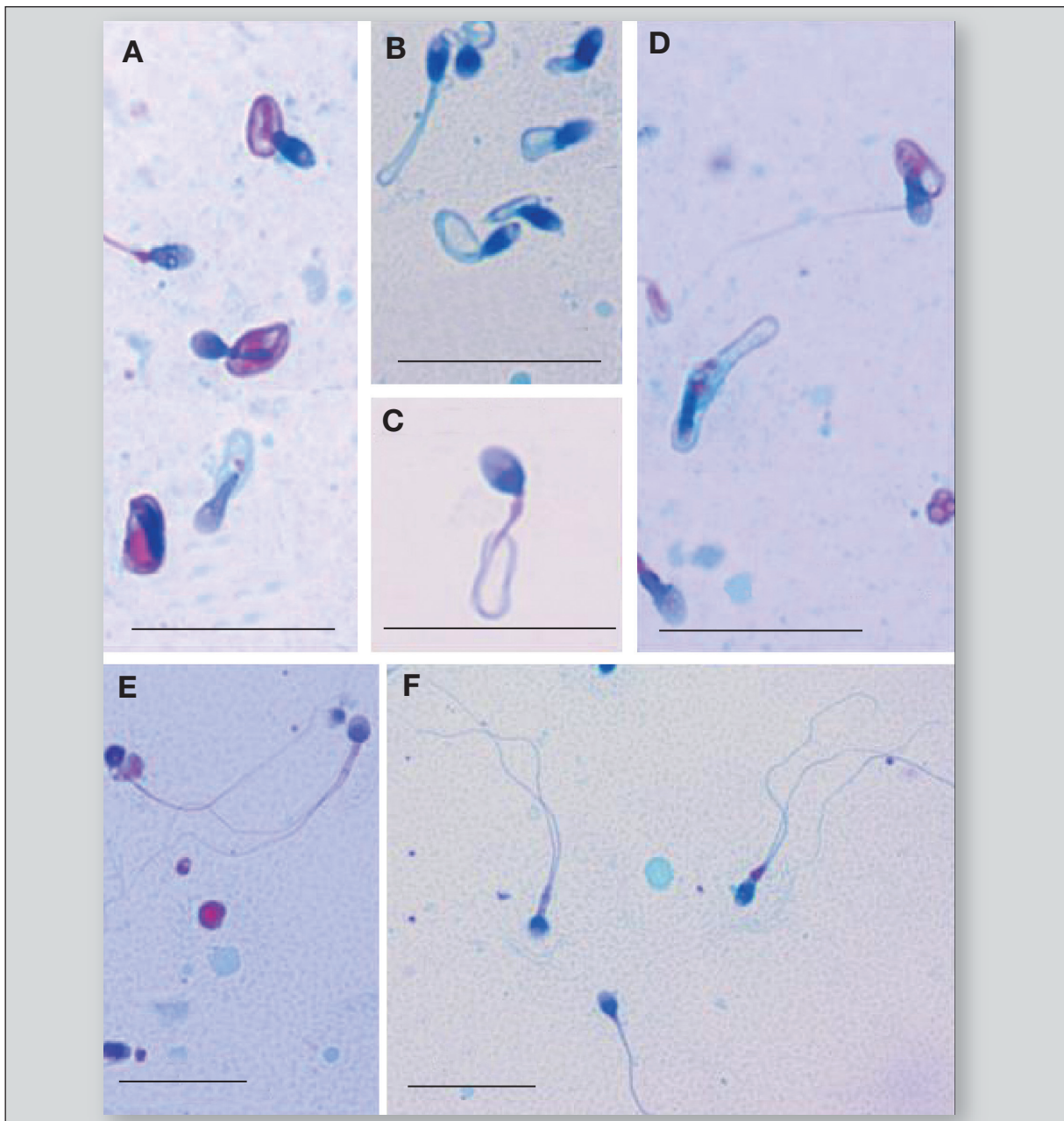
En microscopie électronique à transmission, on observe des coupes transversales multiples de flagelles correspondant à des niveaux différents au sein d'un même reste cytoplasmique, parfois des incidences longitudinales plus rares montrant nettement un enroulement du flagelle autour de la tête. Sur les coupes transversales de flagelle, on observe des désorganisations de la disposition circulaire stricte des différents éléments de l'axonème et du périaxonème dont certains manquent.

Flagelle multiple

Définition : Il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple.

En microscopie électronique à transmission, on observe des têtes spermatisques bien isolées avec deux (et plus) plaques basales et deux (et plus) pièces connectives.

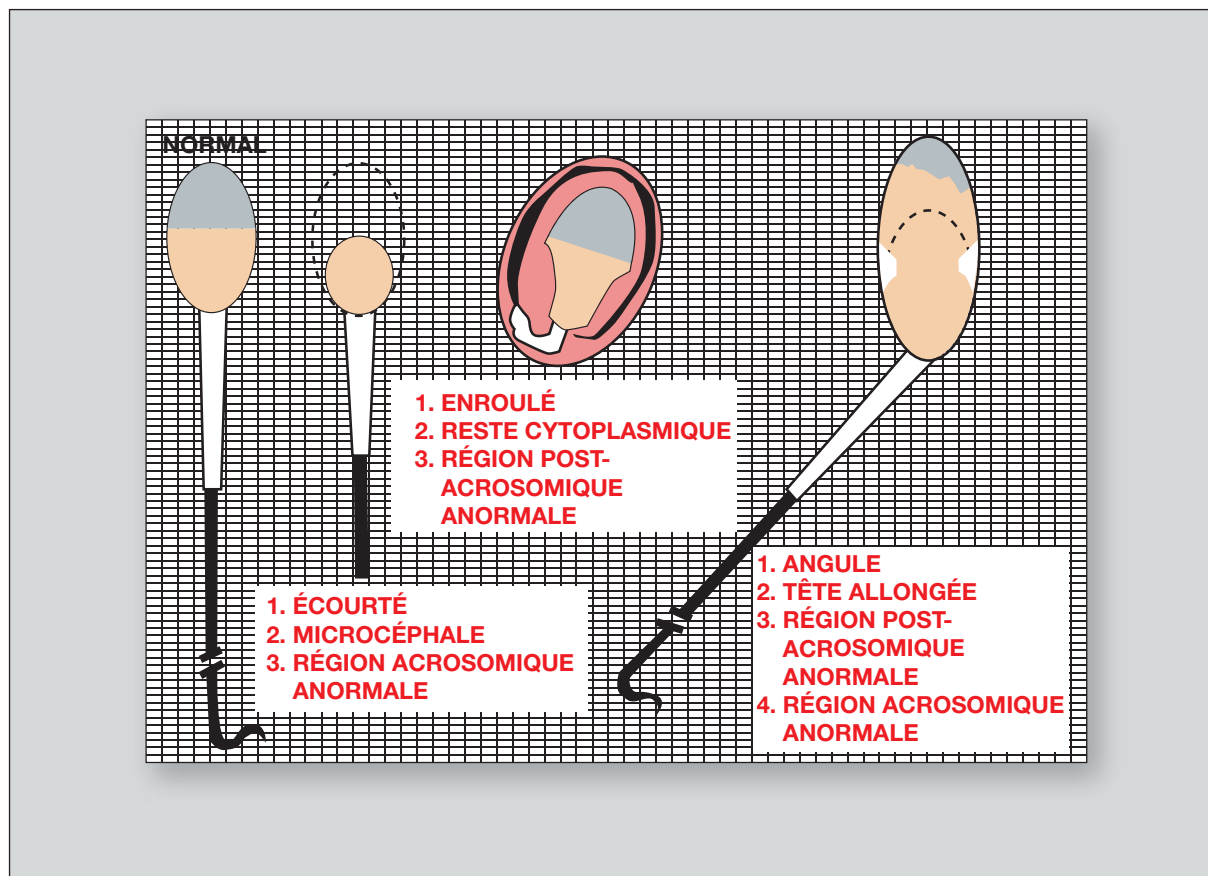
Figure 28 : Flagelles enroulés (A-D) et flagelles multiples (E-F) (la barre représente 20µm)



Exemples d'associations d'anomalies, méthode de classification et calcul de l'IAM

La Figure 29 présente trois exemples de spermatozoïdes anormaux avec des anomalies associées et les catégories d'anomalies dans lesquelles ils doivent être classés

Figure 29 : Trois exemples schématiques de spermatozoïdes atypiques présentant des anomalies morphologiques associées



Procédure (méthode de classification usuelle)

Les anomalies précédemment définies sont le plus souvent associées entre elles.

- Comme il n'y a aucune raison objective de considérer plus une anomalie qu'une autre, on doit faire une description détaillée du spermatozoïde anormal et recenser toutes les anomalies qui sont vues
- La classification et le comptage des anomalies recensées sont effectués à la main ou bien à l'aide d'un compteur dédié (type Spermascore).
- Les spermatozoïdes normaux ou les spermatozoïdes présentant une seule anomalie sont reportés dans les catégories correspondantes à l'aide du système "bâton" qui facilite les totaux en fin d'analyse (Figure. 30)
- Les associations d'anomalies sont recensées dans la grille de lecture sous forme de combinaisons de lettres*
- Lorsque le comptage est fait à la main, on utilise une lettre minuscule pour chaque catégorie d'anomalie, c'est à dire de "a" pour allongé à "p" pour flagelle multiple, le "n" n'est pas utilisé pour qu'il n'y ait pas de confusion avec le "m"

- Tout en reportant chacune des anomalies dans les différentes cases de la grille de lecture, on ne déclenche le compteur manuel (ou le Spermascore) qu'une fois par spermatozoïde décrit et le compte sera arrêté à 100 (200 de préférence) spermatozoïdes classés
 - La grille de lecture présente deux colonnes dans sa partie droite destinées à effectuer les totaux (Figure 30) : la colonne de droite correspond aux totaux pour chacune des catégories d'anomalies des spermatozoïdes présentant des associations d'anomalies (combinaisons de lettres), la colonne de gauche correspond aux totaux des spermatozoïdes présentant des associations d'anomalies (c'est à dire le chiffre de la colonne de droite) plus les spermatozoïdes présentant uniquement l'anomalie dans la catégorie
 - L'étape finale est le calcul de l'IAM
 - On ne prend en compte pour ce calcul que le total des anomalies répertoriées dans la colonne de gauche et le total de spermatozoïdes anormaux : l'IAM est égal au rapport du nombre total d'anomalies recensées par le nombre total de spermatozoïdes anormaux. Sa plus petite valeur théorique est 1. Un exemple de calcul est donné dans la Figure 30
- * Si on reprend les 3 exemples de la Figure 29, le premier spermatozoïde présentant une tête allongée (a), un acrosome anormal (g), une base anormale (f) et une angulation (j) est répertorié afgj et cette combinaison de lettres est reportée dans chacune des cases correspondantes de la grille de lecture: dans ce cas le spermatozoïde est donc mentionné quatre fois dans la grille (exemple du principe dans la Figure 30). Le spermatozoïde présentant une tête microcéphale (c), sans acrosome (g) et avec une flagelle court (l) est répertorié cgl et la combinaison de lettres est reportée dans chacune des cases correspondantes. Enfin, le spermatozoïde avec une base amincie (f), un reste cytoplasmique (h) et un flagelle enroulé (o) est répertorié fho et la combinaison de lettres est reportée dans chacune des cases correspondantes.

Note Importante

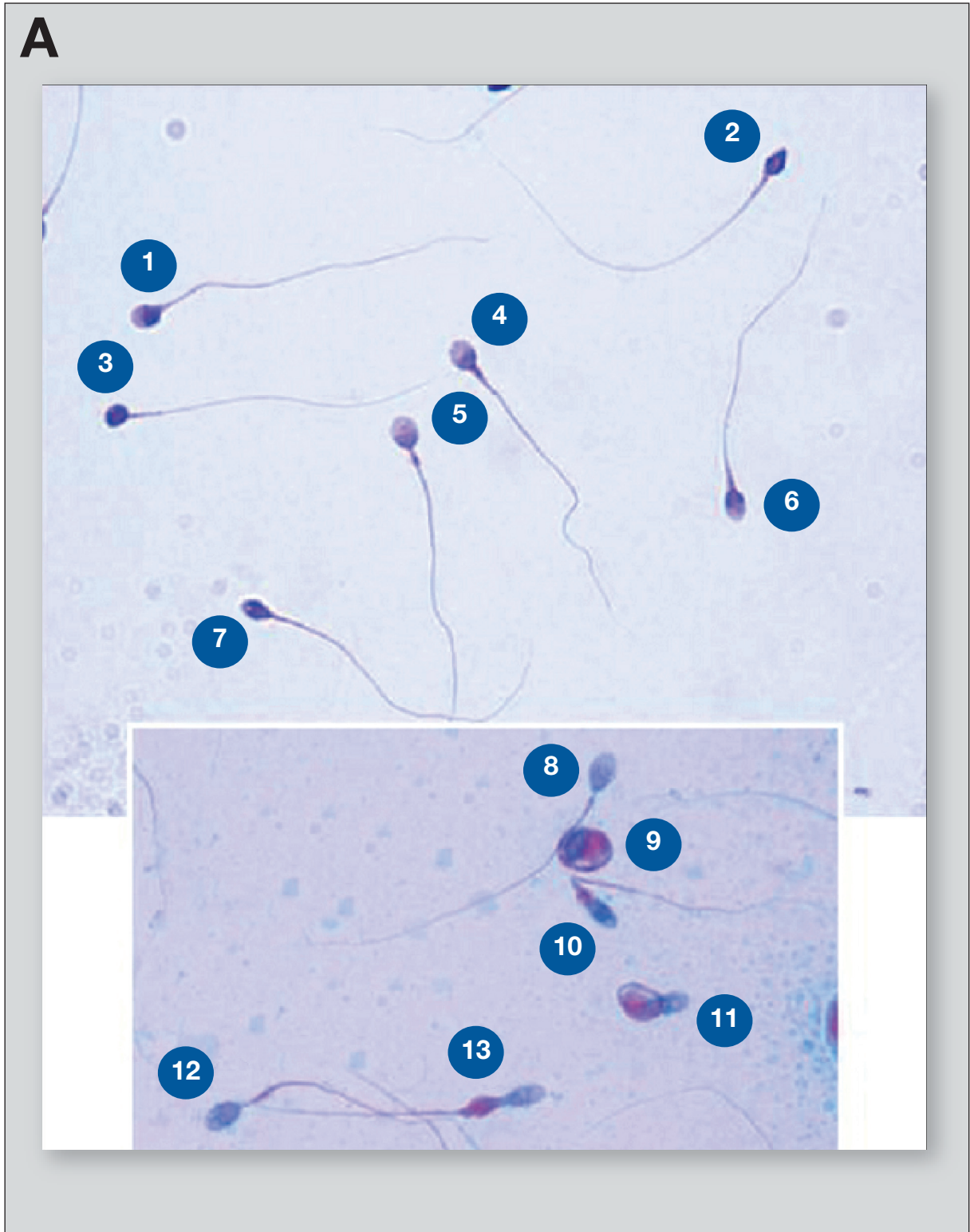
En 1975, David et coll. ont proposé tel que décrit ci-dessus, le système de classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes individualisant dans deux colonnes séparées pour chaque catégorie d'anomalie, le total des anomalies isolées (« bâton ») + associées (combinaison de lettres), première colonne, et, les seules anomalies associées (combinaison de lettres), deuxième colonne. Après plus de 30 années d'utilisation de cette méthode initiale, il est apparu de manière récurrente qu'elle n'apportait pas d'information supplémentaire pour le diagnostic et le pronostic tout en étant lourde à mettre en œuvre, source d'erreurs pour l'observateur et d'interrogations pour le prescripteur recevant un compte rendu avec deux chiffres mis en face de chaque catégorie d'anomalie morphologique. Aussi afin de simplifier la pratique et la présentation des résultats, une méthode simplifiée est proposée : elle consiste simplement à n'utiliser que le « système bâton » pour répertorier pour chaque spermatozoïde observé les anomalies isolées et/ou associées. Cette méthode modifiée évitant la lourdeur de l'usage des combinaisons de lettres aboutit à ne présenter qu'une seule colonne au lieu de 2 tout en offrant comme dans le système initial le moyen de calculer l'IAM. La Figure 30 illustre pour le même échantillon de sperme la méthode initialement décrite et la méthode simplifiée proposée. Les compte rendus présentés dans ce cahier se réfèrent à la méthode simplifiée.

Figure 30 : Exemple de grille remplie et calcul de l'IAM correspondant

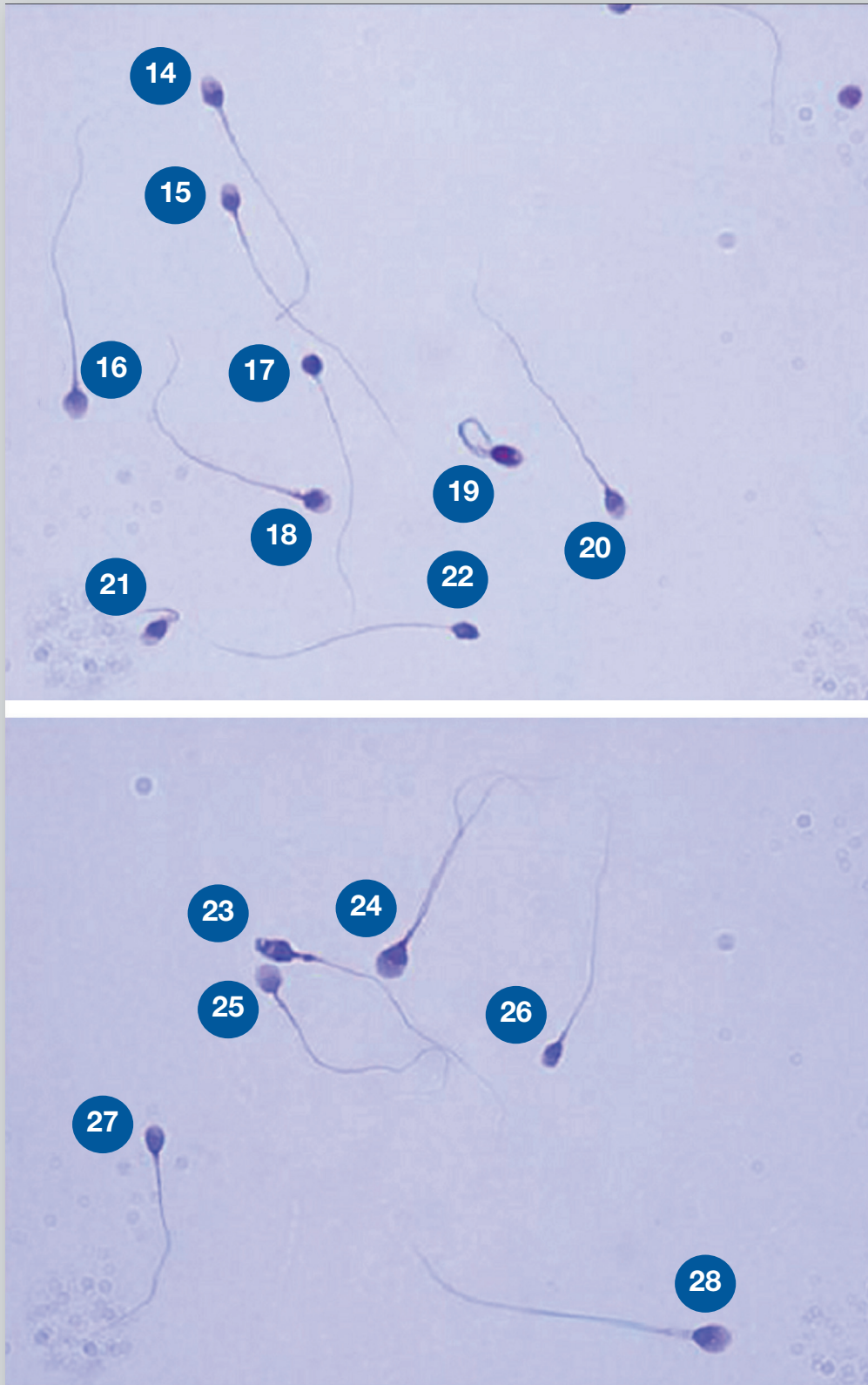
Méthode usuelle				Méthode simplifiée	
Normaux		☐☐☐☐☐		24	☐☐☐☐☐ ☐ 24
Allongé	a	agj	1 1		1
Aminci	b	bfgp bj bfgb bfgj bg bfj bfj bfj bfj bf bfgp bfgj bfg bf bfgj bfg bfgk bfgj bfgk bg	21 20	☐☐☐☐☐ 	21
Microcéphale	c	cfg cfg cfg cghp cgk cgj cg cgj	8 8	☐☐	8
Macrocéphale	d		0 0		0
Multiple	e	efg efg	2 2	└	2
Base anormale	f ☐☐ ☐	efg efg cfg cfg cfg bfj bfj bfj bfj bfg bfgj bfg bfgp bfgj bfg bf bfgp bfgk bf bfg bfgk bfg fo	39 23	☐☐☐☐☐ ☐☐☐☐	39
Région acrosomique anormale	g ☐	agj efg efg cfg cfg cfg go go bfg bg go bfgp bfgj go go bfgj bfgj bfgk bfg bfgk bfg bg bfgp bfgj cghp cgj cgj cgk cg gj ghj gk gk	38 33	☐☐☐☐☐ ☐☐☐☐	38
Reste cytoplasmique	h ☐	bfgh ghj cghp gj	7 4	☐└	7
Grêle	i		0 0		0
Angulée	j └	agj gj ghj gj bfgj bfgj cgj bfgj bfgj cgj bj bfi bfi bfi bfi	17 15	☐☐☐└	17
Absent	k └	bfgk cgk gk gk bfgk	7 5	☐└	7
Court	l		0 0		0
Irrégulier	m		0 0		0
Enroulé	o	go go go go go fo	7 6	☐└	7
Multiple	p	cghp bfgp bfgp	3 3	└	3
Nombre total d'anomalies = 150 IAM = 150/76 = 1,97					

Les figures 31A et 31B présentent des exemples de classifications se fondant sur les définitions données précédemment.

Figure 31 A et B : Exemples de classification



B



Classification, Figure 31A.

N°	Nombre d'atypies associées	Description
1 :	1	anomalie de la région post acrosomique (possible désaxement ?)
2 :	-	tête du spermatozoïde de profil : ce spermatozoïde ne doit pas être classé
3 :	2	tête microcéphale et anomalie de la région acrosomique
4, 5 :	0	morphologie normale
6 :	1	anomalie de la région post-acrosomique
7 :	2	anomalie de la région post acrosomique et anomalie de la région acrosomique
8 :	0	morphologie normale
9 :	3	anomalie de la région acrosomique, reste cytoplasmique et flagelle enroulé
10 :	4	tête amincie, anomalie du post-acrosome, anomalie de la région acrosomique et angulation du flagelle
11 :	4	anomalie de la région post-acrosomique, anomalie de la région acrosomique, reste cytoplasmique et flagelle enroulé
12 :	1	anomalie de la région acrosomique
13 :	4	tête allongée, anomalie de la région post-acrosomique, anomalie de la région acrosomique et reste cytoplasmique

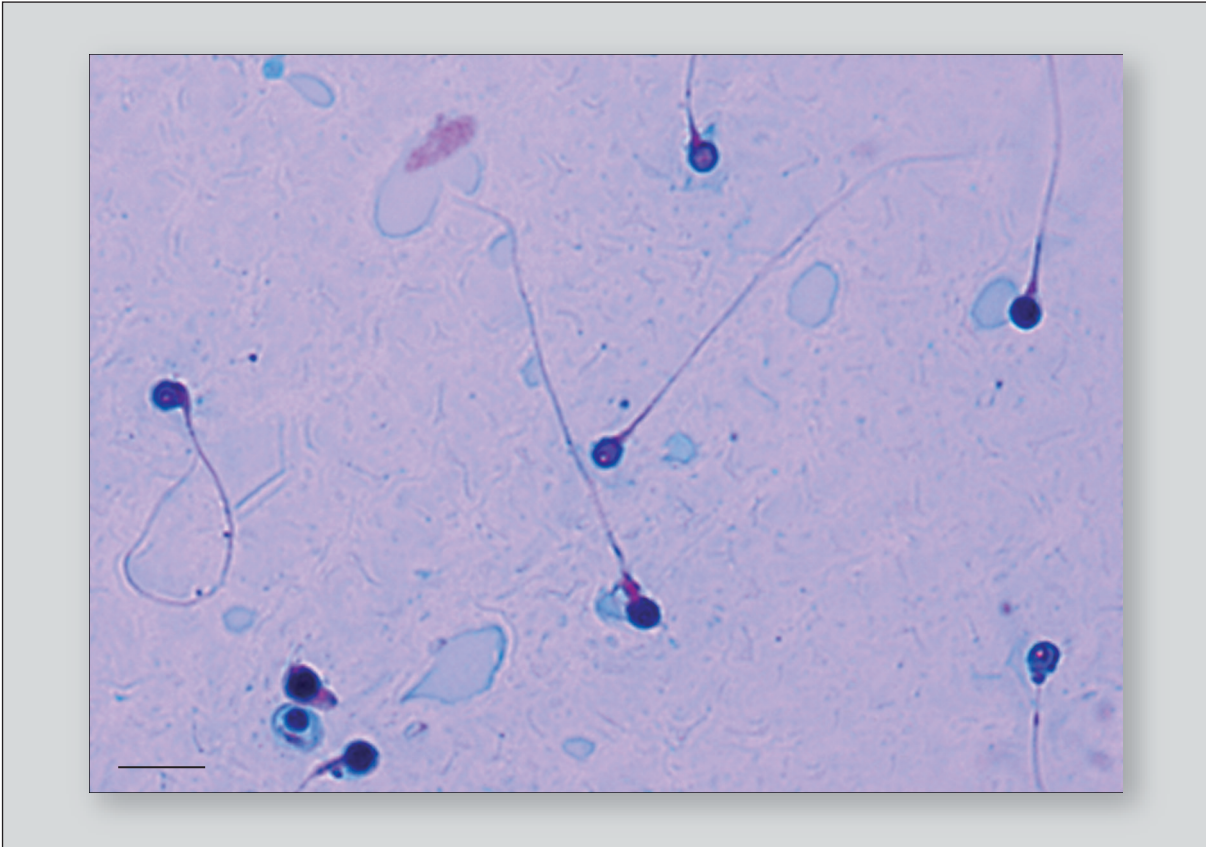
Classification, Figure 31 B.

14 :	0	morphologie normale
15, 16 :	0	morphologie normale
17 :	2	tête microcéphale et anomalie de la région acrosomique
18 :	1	anomalie de la région acrosomique
19 :	2	anomalie de la région acrosomique et flagelle enroulé
20 :	0	morphologie normale
21 :	3	flagelle angulé, court et présentant une anomalie de calibre (épaissi)
22 :	4	tête microcéphale, anomalie de la région post acrosomique et anomalie de la région acrosomique, pièce intermédiaire grêle
23 :	2	anomalie de la région post acrosomique et anomalie de la région acrosomique
24 :	2	tête macrocéphale et flagelle multiple
25 :	0	morphologie normale
26 :	2	tête microcéphale et anomalie de la région acrosomique
27 :	1	anomalie de la région acrosomique
28 :	2	tête macrocéphale ; le flagelle est flou et de ce fait la classification au niveau du flagelle est difficile (la possibilité de faire varier la mise au point au niveau du microscope avait indiqué qu'il s'agissait de 2 flagelles accolés)

Il faut savoir qu'il existe des situations d'infécondité rares en relation directe avec une anomalie morphologique particulière concernant la majorité des spermatozoïdes observés. C'est le cas par exemple du syndrome des « têtes rondes (dites)* sans acrosome » ou globozoospermie (Figure 32). Les causes génétiques précises restent à déterminer dans la plupart des cas décrits.

* L'échelle de la microscopie optique ne permet pas d'assurer qu'il n'existe absolument pas d'acrosome, par contre la région acrosomique est anormale.

Figure 32 : Globozoospermie ou syndrome des têtes rondes à région acrosomique anormale (dite sans acrosome) (la barre représente 10µm)



Caractérisation des cellules rondes du sperme et évaluation de leurs concentrations respectives

Figure 33 : Cellules de la lignée blanche, macrophage et cellule épithéliale (la barre représente 10 μ m) Polynucléaires neutrophiles **(a)** ; coloration à la peroxydase des polynucléaires neutrophiles non dégranulés (non décrite dans ce cahier) **(b)** ; monocyte **(c)** ; lymphocyte **(d)** ; macrophage **(e)** ; cellule épithéliale **(f)**.

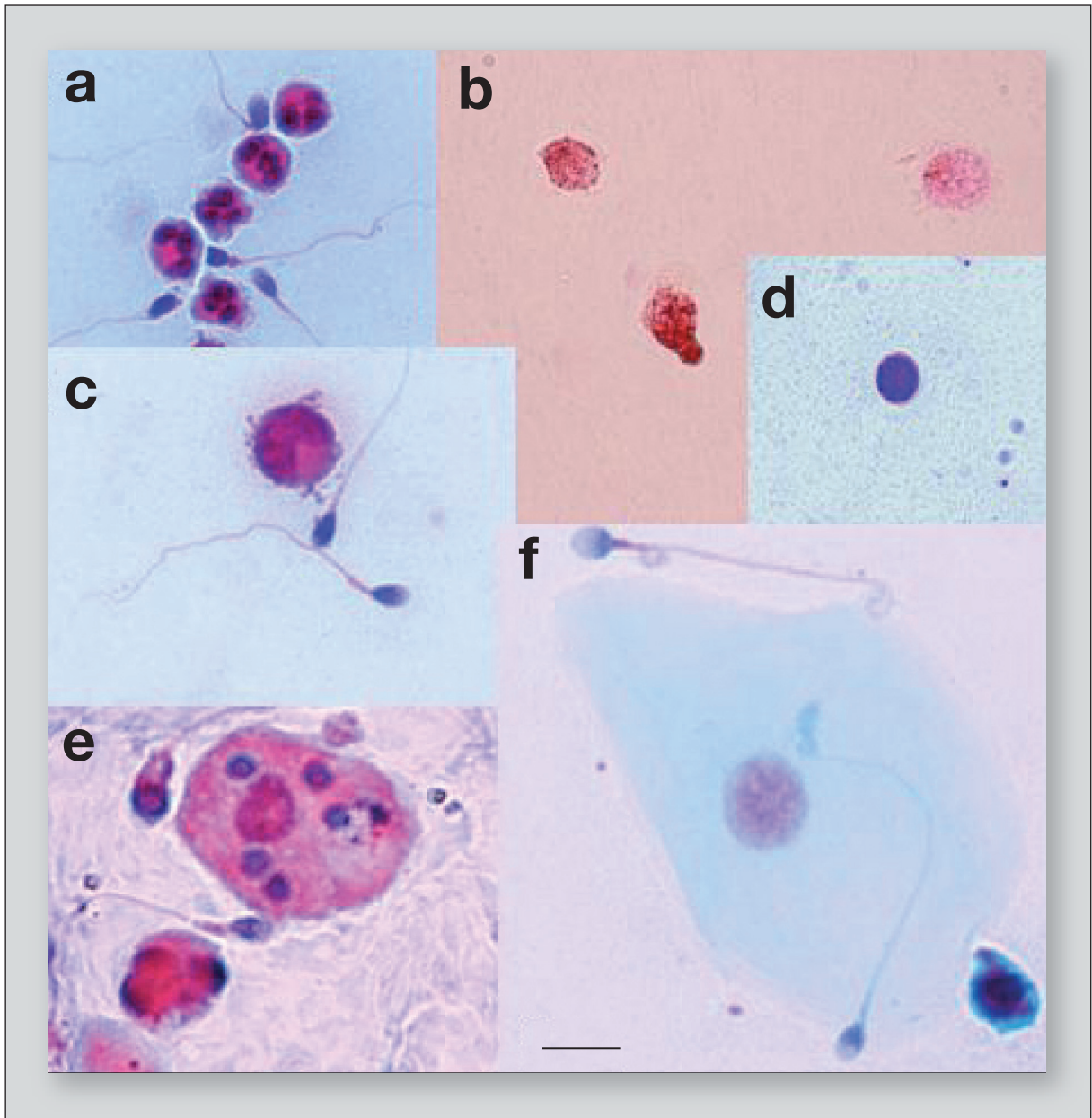
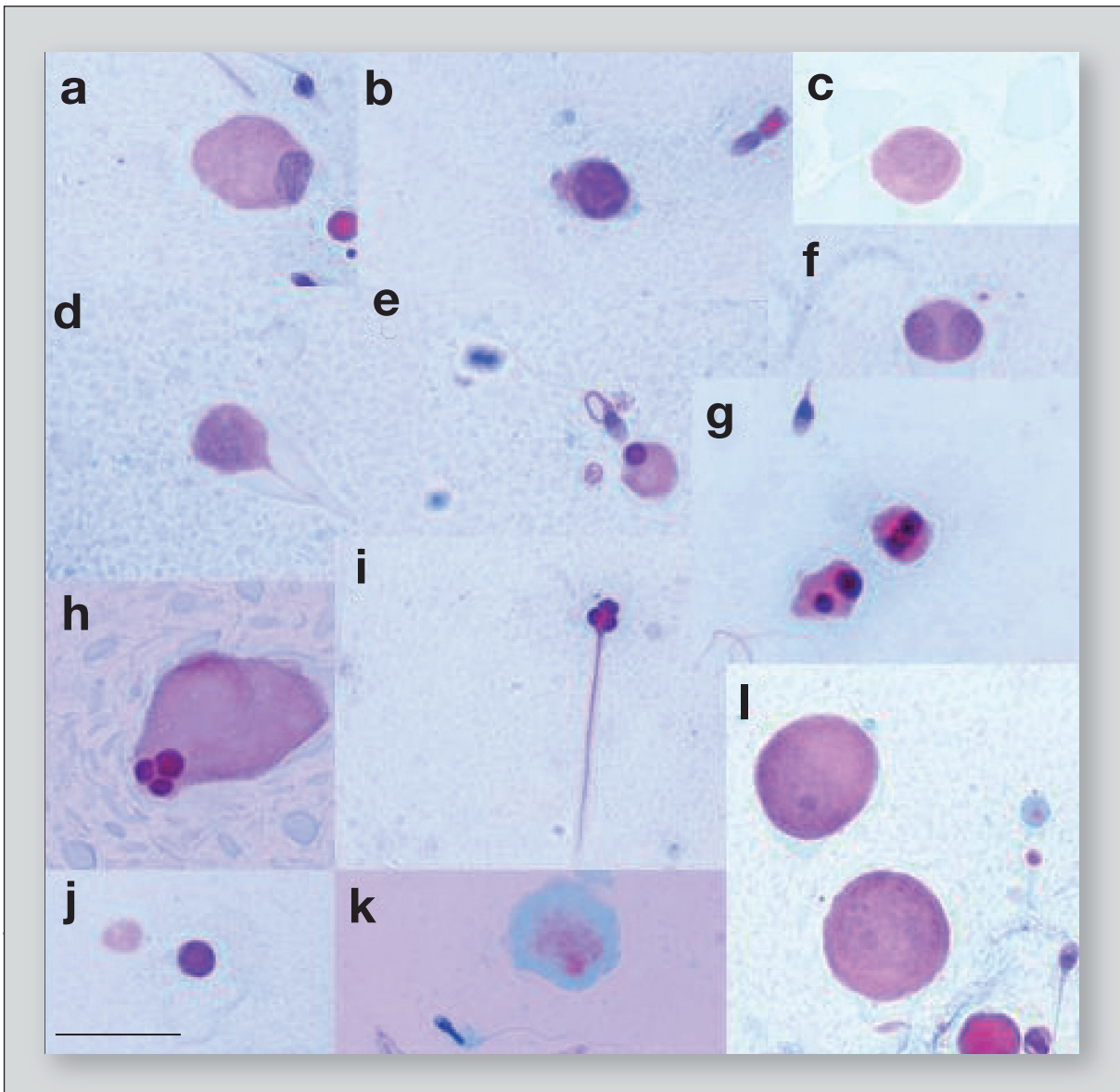


Figure 34 : Cellules immatures de la lignée germinale, cellules dégradées et fragments cellulaires. (la barre représente 20µm)

Spermatocyte I (**a**) ; spermatocyte II (**b**) ; spermatide jeune (**c**) ; spermatide intermédiaire avec début d'expansion flagellaire (**d**) ; spermatide tardive (**e**) ; spermatide intermédiaire en cours d'élongation (**f**) ; spermatides tardives : formes binuclées et trinuéées (**g**) ; spermatides tardives : forme trinuéée (**h**) ; spermatides tardives : forme trinuéée avec perte de la majorité du cytoplasme et flagelle constitué (**i**) ; noyau isolé (**j**) ; fragments cellulaires (**k**) ; cellules dégradées et corps résiduel (**l**).



Parallèlement à la classification des spermatozoïdes dans la grille de David, les autres cellules et éléments cellulaires observés sur les mêmes champs sont comptés dans une autre grille. Ces cellules et éléments cellulaires recensés sont : flagelles isolées, spermatozoïdes en lyse, cellules de la lignée germinale, cellules de la lignée blanche, autres cellules, fragments cellulaires.

La concentration des différents types cellulaires ainsi que celle des leucocytes peut être évaluée en référence à la concentration connue de spermatozoïdes puisque seuls ceux-ci et l'ensemble des cellules sans distinction sont comptés pour le calcul de la concentration.

Procédure

- Si N est le nombre d'un type donné de cellules comptées pour 100 spermatozoïdes sur les mêmes champs et S la concentration des spermatozoïdes en millions/ml, la concentration C du type cellulaire considéré peut être calculée en millions/ml en utilisant la formule suivante :

$$C = \frac{N \times S}{100}$$

Exemple :

Si sur le frottis coloré, 10 cellules germinales immatures sont comptées pour 100 spermatozoïdes et si la concentration des spermatozoïdes est de $120 \times 10^6/\text{ml}$, la concentration des cellules germinales immatures est égale à :

$$\frac{10 \times 120 \times 10^6 \text{ par millilitre}}{100} = 12 \times 10^6 \text{ par ml}$$

Les tests d'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical

La migration d'un nombre suffisant de spermatozoïdes depuis le vagin jusqu'à l'ampoule tubaire est une condition essentielle pour que la fécondation puisse s'accomplir dans des conditions naturelles. Aussi, la capacité de déplacement actif des spermatozoïdes dans le mucus cervical et leur survie dans ce milieu constituent une étape nécessaire (mais non suffisante) pour qu'ils puissent arriver au contact de l'ovocyte. Le mucus cervical peut être facilement prélevé pour études et analyses. L'évaluation de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical est donc un examen essentiel du bilan de tout couple consultant pour infertilité et il doit être intégré aux premières explorations. Une interaction optimale des spermatozoïdes avec le mucus cervical nécessite des propriétés physico-chimiques optimales du mucus associées à une qualité optimale du mouvement des spermatozoïdes.

La muqueuse endocervicale forme un système de cryptes intriquées, invaginations de l'épithélium cylindrique dans la muqueuse, évoquant des formations glandulaires. Leur morphologie dépend du stade du cycle menstruel et de l'âge de la femme. L'épithélium endocervical comporte plusieurs types de cellules sécrétoires qui se différencient par la nature et l'abondance des grains sécrétoires dans les différentes portions du col. Les sécrétions de ces cellules contribuent à la formation du mucus cervical. Les hormones ovariennes contrôlent la sécrétion du mucus cervical. Le 17 β -oestradiol stimule la production de quantité importante de mucus aqueux tandis que la progestérone inhibe l'activité sécrétoire des cellules épithéliales.

Le mucus cervical est une sécrétion hétérogène contenant plus de 90% d'eau. Il présente des propriétés rhéologiques particulières - viscosité, filance et cristallisation en feuille de fougère.

- La viscosité est influencée par l'arrangement moléculaire et les concentrations protéiques et ioniques du mucus cervical. Elle varie en fonction de la période du cycle, du mucus hypervisqueux et souvent cellulaire de la phase prémenstruelle, au mucus fluide de la phase pré-ovulatoire
- La filance est le terme consacré pour désigner la consistance, la capacité d'étirement ou encore les propriétés d'élasticité du mucus cervical
- La cristallisation en feuille de fougère est une caractéristique spécifique du mucus ayant séché sur une lame de verre.

Les modifications cycliques des constituants du mucus cervical modulent l'aptitude à la pénétration et la survie des spermatozoïdes. Lors d'un cycle normal, les spermatozoïdes commencent à pénétrer le mucus cervical approximativement au 9^{ème} jour et l'aptitude à la pénétration augmente régulièrement pour atteindre son maximum juste avant l'ovulation. La pénétration des spermatozoïdes commence alors à diminuer avant même que le mucus ne se soit apparemment modifié. Les variations individuelles de la période et de l'importance de la pénétration des spermatozoïdes sont fréquentes (la durée pendant laquelle les spermatozoïdes peuvent pénétrer le mucus cervical change considérablement d'une femme à l'autre, et peut changer chez la même femme d'un cycle à l'autre).

In vivo, les spermatozoïdes mobiles peuvent être canalisés vers les cryptes cervicales grâce à l'orientation des mailles du mucus pour y séjourner plus ou moins longtemps avant d'être libérés progressivement dans la cavité utérine.

Les propriétés suivantes peuvent être attribuées au col de l'utérus et à ses sécrétions :

- Il permet la pénétration des spermatozoïdes dans le mucus en phase préovulatoire et l'empêche à d'autres moments du cycle
- Il protège les spermatozoïdes de l'environnement hostile de la cavité vaginale et de la phagocytose
- Il fournit les éléments énergétiques nécessaires aux spermatozoïdes
- Il joue le rôle d'un filtre en sélectionnant par exemple les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement mais les forces générées par le battement flagellaire jouent un rôle déterminant pour vaincre les résistances mécaniques du mucus.
- Il constitue un réservoir à court terme de spermatozoïdes
- La capacitation des spermatozoïdes serait initié lors de l'étape d'interaction avec le mucus cervical.

Test d'interaction spermatozoïdes/mucus cervical *in vivo* : le test post-coïtal (TPC) ou test de Hühner (TH)

But

Le test post-coïtal, ou test de Hühner, examen essentiel de première intention avec le spermogramme-spermocytogramme dans l'exploration d'un couple infécond, permet d'évaluer le nombre, la mobilité et la survie des spermatozoïdes présents dans le mucus cervical, un certain nombre d'heures après un rapport sexuel en période préovulatoire. Ce test simple est encore trop souvent négligé dans l'exploration de l'infécondité du couple alors qu'il est facile à réaliser et qu'il apporte des informations fondamentales.

Remarque

Le TPC est pratiqué soit par le gynécologue qui suit le couple, s'il est équipé pour le réaliser selon la méthodologie standardisée décrite, soit le plus souvent au laboratoire.

Lorsqu'un homme ne peut recueillir un échantillon de sperme par masturbation, le TPC peut fournir une information globale sur la quantité et la qualité de ses spermatozoïdes.

Programmation

Le mucus cervical est réceptif aux spermatozoïdes pendant une période limitée du cycle menstruel sous l'influence des oestrogènes. Le TPC doit être réalisé en phase pré-ovulatoire. Il est important que tous les laboratoires qui réalisent ce test évaluent le mucus de manière standardisée, dans une période de 9 à 14 h après le rapport sexuel programmé.

- Le test ne pourra être interprété correctement que s'il est programmé et effectué dans la période préovulatoire de la patiente explorée, c'est à dire dans les 2 à 3 jours qui précèdent la montée thermique, aussi près que possible de l'ovulation comme déterminée par des critères cliniques, c'est à dire, durée habituelle du cycle, température basale, modifications du mucus, cytologie vaginale, et, si disponibles, dosages sériques ou urinaires de LH et/ou dosages d'oestradiol et échographie ovarienne
- De manière simplifiée, le moment optimal pour la réalisation du TH peut être déterminé en se basant sur deux à trois courbes de température récentes
- Il est par ailleurs demandé à la patiente d'établir la courbe de température du cycle correspondant à celui du test ce qui en facilitera son interprétation

- Dans un premier temps, le test est programmé en l'absence de traitement hormonal pour permettre une interprétation dans les conditions physiologiques.

Instructions données au couple pour un TPC au laboratoire

- Prendre rendez vous dès le premier jour des règles afin de fixer les dates du rapport sexuel programmé, du prélèvement et de la réalisation du test
- S'abstenir de rapports sexuels, et l'homme de masturbation dans les 2 à 8 jours précédant le test
- Avoir un rapport avec pénétration vaginale 9 à 14h avant le test
- Ne pas employer de lubrifiant vaginal lors de ce rapport et ne pas faire une toilette vaginale profonde ou un bain chaud après ce rapport
- Se rendre au laboratoire au jour et à l'heure dite pour la réalisation du test.

Prélèvement

- Poser un spéculum non-lubrifié dans le vagin
- Dégager le col de l'utérus et noter son degré d'ouverture
- Essuyer doucement avec une compresse l'orifice externe du col afin d'éviter une contamination du prélèvement par les sécrétions vaginales
- Réaliser les prélèvements à trois niveaux : vaginal, exocervical et endocervical
- Aspirer le plus possible du liquide présent dans le cul de sac postérieur vaginal à l'aide d'une seringue tuberculinique (sans aiguille), d'une pipette ou d'un tube de polyéthylène (par exemple, aspiglaire en France)
- Aspirer la plus grande quantité possible de mucus au niveau de l'exocol à l'aide d'un dispositif semblable à celui utilisé pour le prélèvement vaginal
- Aspirer la plus grande quantité possible de mucus dans le canal endocervical, à l'aide d'un dispositif semblable à celui utilisé pour le prélèvement vaginal
- Évaluer la qualité du mucus endocervical immédiatement. Cette évaluation incluant la mesure du volume, la détermination de la viscosité, de la filance, de la cristallisation, de la cellularité et du pH
- Placez l'échantillon de mucus sur une lame et disposer par dessus une lamelle (22 mm X 22 mm) en exerçant une pression légère ; la profondeur de cette préparation peut être standardisée ([voir ci-dessous](#))
- Examiner la préparation sur un microscope équipé d'optiques de contraste de phase au grossissement final x400 (objectif x40 et oculaires x10).

Remarque

Si de manière exceptionnelle l'évaluation ne peut être faite tout de suite, le mucus devra être conservé dans des conditions adéquates.

L'examen des sécrétions vaginales permet de s'assurer que du sperme a bien été déposé dans le vagin en cas d'absence de spermatozoïdes dans les autres prélèvements. Les spermatozoïdes sont habituellement morts après deux heures dans le vagin.

Méthode standardisée de l'OMS de calibration de la préparation

La méthode consiste à faire reposer les angles d'une lamelle (22 mm x 22 mm) sur quatre "piliers" faits de pâte de silicone incluant des microsphères de verre d'un diamètre de 100 µm. La préparation est déposée dans l'espace compris entre ces piliers puis la lamelle est appliquée fermement sur eux. La préparation peut être close hermétiquement en introduisant de l'huile de paraffine entre les piliers.

Mesure du score de l'OMS

Les propriétés du mucus sont décrites selon le score de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé, 1992).

Important

La mesure du pH n'est pas incluse dans ce score. Le pH du mucus cervical doit être mesuré à l'aide d'un papier pH (calibré entre 6,4 et 8,0), in situ, ou immédiatement après le prélèvement. Si le pH est mesuré dans le col, il faut éviter une possible contamination par du mucus exocervical (pH plus bas) ou des sécrétions vaginales (pH acide). Les spermatozoïdes sont sensibles aux modifications du pH du mucus cervical. Un mucus acide immobilise les spermatozoïdes tandis qu'un mucus alcalin peut stimuler la mobilité. Cependant, une alcalinité excessive (pH > 8,5) peut avoir un effet délétère sur la viabilité des spermatozoïdes. La valeur optimale du pH, pour la migration et la survie des spermatozoïdes dans le mucus cervical, est comprise entre 7,0 et 8,5 ce qui correspond aux valeurs habituelles du pH du mucus cervical en phase préovulatoire. Notez qu'un pH compris entre 6,0 et 7,0 n'empêche pas toujours la pénétration des spermatozoïdes. Dans certains cas, le mucus cervical peut être nettement plus acide, évoquant une sécrétion anormale ou l'existence d'une infection bactérienne (par exemple, par des Lactobacillus). Aussi cette constatation ne doit pas être considérée comme un artefact.

Volume

Le volume est évalué directement dans le dispositif de recueil si celui-ci est gradué ou approximativement si le volume global du dispositif est connu, par exemple une aspiration sur une longueur de 3,4 cm dans un aspiglaire correspond à un volume de 0,18 ml.

0 = absence de mucus jusqu'à moins de 0,1 ml

1 = 0,1 ml jusqu'à moins de 0,2 ml

2 = 0,2 ml jusqu'à moins de 0,3 ml

3 = 0,3 ml et plus

Viscosité

La viscosité du mucus cervical est le facteur qui influence le plus la pénétration des spermatozoïdes. En milieu de cycle, le mucus oppose peu de résistance à la migration des spermatozoïdes, alors que le mucus visqueux de la phase lutéale forme une barrière très efficace. Les débris cellulaires et les leucocytes se trouvant dans le mucus, gênent la migration des spermatozoïdes. L'évaluation est semi-quantitative en fonction de la force qu'il faut appliquer sur le dispositif d'aspiration.

0 = mucus épais, très visqueux de type prémenstruel

1 = mucus de viscosité intermédiaire

2 = mucus peu visqueux

3 = mucus aqueux, de viscosité minimale, de type préovulatoire.

Filance

La filance est évaluée après avoir établi un contact avec le mucus cervical à l'aide d'une lamelle ou d'une seconde lame de verre disposée perpendiculairement, on sépare les deux lames par un mouvement ascensionnel de la lame supérieure. Elle peut encore être évaluée entre les deux extrémités d'une pince longuette. La longueur du filament de mucus qui se forme entre les lames ou entre les extrémités de la pince est estimée (en centimètres) avant sa rupture de la façon suivante :

0 = < 1 cm

1 = de 1cm à 4 cm compris

2 = au delà de 4 cm jusqu'à 9 cm non compris

3 = \geq 9 cm.

Cristallisation

La cristallisation en feuille de fougère est notée après examen de plusieurs champs choisis au hasard sur la préparation. Le degré de cristallisation le plus important parmi ceux observés est considéré comme typique de l'échantillon selon la classification suivante :

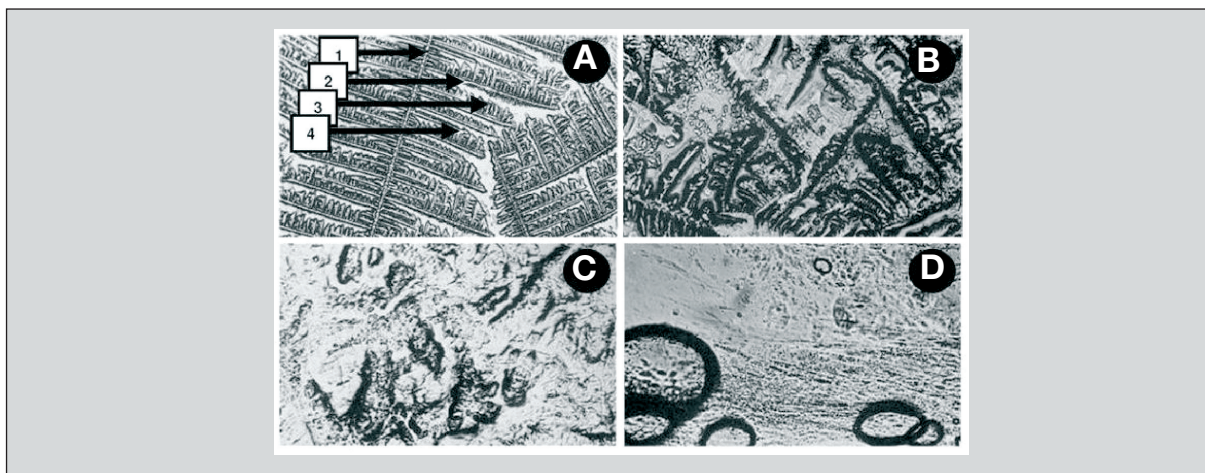
0 = pas de cristallisation

1 = formation de cristaux atypiques

2 = cristallisation en feuille de fougère de premier et de deuxième ordre

3 = cristallisation en feuille de fougère de troisième et de quatrième ordre

Figure 35 : Exemples de cristaux en feuilles de fougère formés à partir du mucus cervical séché à l'air sur une lame de verre (x100)



L'aspect des cristaux peut être très variable, dépendant par exemple de l'épaisseur de la préparation ou du nombre de cellules présentes. En outre, une préparation peut présenter plusieurs sortes de cristaux ; parfois tous les types peuvent coexister sur une même préparation.

Score de cristallisation = 3 (1, structure de premier ordre, 2, structure de deuxième ordre ; 3, structure de troisième ordre, 4, structure de quatrième ordre) (A) ; structures de premier et de deuxième ordres en majorité (score 2), avec la présence occasionnelle de structures de troisième ordre (B) ; cristallisation en feuille de fougère atypique (score 1) (C) ; absence de cristallisation (score 0) ; les formations arrondies à paroi épaisse sont des bulles d'air (D).

Cellularité

Le nombre de leucocytes et des autres cellules présentes dans le mucus cervical est estimé au grossissement final x400. Une méthode de calibration de la surface du champ microscopique et de l'épaisseur de la préparation proposée par l'OMS permet à partir d'un facteur de conversion d'extrapoler le nombre de cellules par champ à la concentration : 10 cellules/champ, correspond à 500 cellules/mm³ (c'est à dire par µl), pour une épaisseur de préparation de 100 µm. Les scores pour la cellularité sont les suivants :

0 = > 20 cellules/champ	soit > 1000 cellules/mm ³
1 = 11 à 20 cellules/champ	soit 501 à 1000 cellules/mm ³
2 = 1 à 10 cellules/champ	soit 1 à 500 cellules/mm ³
3 = absence de cellules	

Évaluation des spermatozoïdes présents dans le mucus

Après avoir évalué la qualité du mucus, on évalue le nombre et la mobilité des spermatozoïdes présents dans le mucus cervical.

Le nombre de spermatozoïdes présents dans la partie la plus basse du canal cervical change en fonction du temps écoulé depuis le rapport sexuel. Deux à trois heures environ après le coït, la majorité des spermatozoïdes est présente dans cette région.

L'évaluation usuelle du nombre de spermatozoïdes dans le mucus cervical est traditionnellement basée sur le nombre de spermatozoïdes comptés par champ microscopique au fort grossissement (grossissement final x400 ou High Power Field, HPF. Cependant, il est recommandé d'exprimer la concentration de spermatozoïdes dans le mucus en nombre de spermatozoïdes par µl de mucus. Grâce à la méthode de l'OMS pour calibrer la préparation de mucus à examiner, il est possible, comme pour les cellules, à partir d'un nombre de spermatozoïdes observés/champ au grossissement final x400 d'estimer le nombre de spermatozoïdes par unité de volume, par exemple, 10 spermatozoïdes observés/champ, correspond à 500 spermatozoïdes/mm³ ou µl.

Comme dans le sperme, la mobilité des spermatozoïdes dans le mucus cervical est évaluée comme suit:

1. Mobilité P = mobilité progressive (ou «a»+«b», selon l'OMS 1999)
2. Mobilité NP = mobilité non-progressive (ou «c», selon l'OMS 1999)
3. Immobilité I = spermatozoïdes immobiles (ou «d», selon l'OMS 1999)

La mobilité spermatique progressive est l'indicateur le plus important d'une fonction cervicale normale.

Comment déterminer le nombre de spermatozoïdes par unité de volume de mucus ?

Le volume de mucus dans chaque champ microscopique dépend de la surface du champ ($\pi.r^2$ où r est le rayon du champ microscopique) et de la profondeur de la chambre (100µm lorsque l'on réalise la préparation calibrée décrite plus haut). Il faut tout d'abord déterminer le diamètre du champ microscopique à l'aide d'un micromètre de platine. Il peut être grossièrement estimé en divisant le diamètre d'ouverture de l'oculaire par le rapport optique (grossissement) de l'objectif. Avec un objectif x40 et un oculaire x10 ayant une ouverture de 20 millimètres, le champ microscopique a un diamètre approximatif de 500µm (20 millimètres / 40x) : dans ce cas, $r = 250\mu\text{m}$, $r^2 = 62500\mu\text{m}^2$, $\pi.r^2 = 196349 \mu\text{m}^2$ et le volume est égal à $19634,9\mu\text{m}^3$ soit environ 20nl. Ainsi, le compte de 10 spermatozoïdes par HPF est équivalent approximativement à 10 spermatozoïdes pour 20nl, ce qui équivaut à 500 spermatozoïdes par µl. Cependant, comme le nombre de spermatozoïdes comptés est faible, l'erreur de mesure est élevée : l'erreur de mesure pour 10 cellules comptées est ~62%.

Résultats et Interprétations

Il n'existe pas de normes établies concernant les résultats du test de Hühner ; on estime cependant généralement que le résultat est normal lorsque le score du mucus cervical est au moins égal à 10 (score maximum à 15) indiquant que le mucus présente des qualités favorables pour la pénétration des spermatozoïdes et que dans un période de 9 à 14h après le rapport sexuel, on observe 5 à 10 et plus spermatozoïdes mobiles progressifs par champ au grossissement final x400 (au moins 250 à 500 spermatozoïdes mobiles progressifs / μ l de mucus).

Par contre, un nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs par champ au grossissement final x400 inférieur à 5, surtout si leur progression est lente ou circulaire (mobilité « b » et/ou « c » de l'OMS), indique une pénétration diminuée et/ou un mucus cervical anormal avec généralement un score inférieur à 10 et/ou un pH anormal. Quand aucun spermatozoïde n'est trouvé dans le mucus, le test est conclu « négatif ». La présence de nombreux spermatozoïdes progressifs est en défaveur de facteurs cervicaux péjoratifs ou d'une auto-immunité d'origine masculine en tant que causes possibles de l'infertilité. Quand des spermatozoïdes mobiles sont observés mais qu'ils présentent une mobilité non-progressive (ou des oscillations de type « shaking »), cela doit faire évoquer la présence d'anticorps anti spermatozoïdes dans le mucus ou sur les spermatozoïdes. Seuls des tests négatifs à plusieurs reprises en dépit d'une synchronisation optimale permettent de considérer que des facteurs cervicaux sont possiblement à l'origine de l'infertilité.

Tableau 7 : Exemple d'un compte rendu de test de Hühner

INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées		
TEST DE HUHNER		
Numéro de dossier : 000009		
Nom : POL	Prénom : Jacqueline	Date de naissance : 15/02/77
Nom et prénom du conjoint : RIC ...	Philippe	Délai d'abstinence préalable au test : 3 j
Examen demandé par : Dr W ...		
Date du test : 31/02/2009	Heure du test : 9h30	Heure du rapport : 22h30
Jour du cycle : 12	Température matinale : 36,4°C	
Traitement : Aucun		
Évaluation du mucus endocervical :	Volume :	3
	Viscosité :	3
	Filance :	3
	Cristallisation :	3
	Cellularité :	3
	Score total* :	15
Aspect du col : Ouvert		
Ph : 8,0		
	Exocol	Endocol
Nb total de spermatozoïdes observés rapportés à 1 μ l de mucus (estimation dans une préparatin calibrée ; OMS, 1999)	2500	1500
Pourcentages de spermatozoïdes mobiles		
Mobilité progressive (P)	0	40
Mobilité non progressive (NP)	5	15
Immobilie (I)	95	45
Nb de spermatozoïdes mobile progressifs par champ dans l'endocol** : 20		
<p>CONCLUSIONS</p> <p>Mucus cervical de type ovulatoire. Test positif.</p> <p>Dr X</p>		
<p>* Score > 10 = mucus cervical de type ovulatoire Score < 10 = mucus cervical peu fonctionnel</p> <p>** On estime que l'observation de 5-10 spermatozoïdes mobiles progressifs et plus par champ microscopique à l'objectif x 40, 9 à 14h après un rapport, correspond à une colonisation satisfaisante du mucus.</p>		

Si le mucus endocervical est normal et que les spermatozoïdes sont absents, il faut examiner le prélèvement exocervical puis le prélèvement vaginal à la recherche de spermatozoïdes :

- si des spermatozoïdes sont retrouvés au niveau de l'un ou l'autre de ces prélèvements, il faudra refaire le test
- si aucun spermatozoïde n'est retrouvé et après s'être assuré auprès du couple qu'une éjaculation intravaginale a bien eu lieu, il faudra demander à ce qu'un spermogramme soit réalisé

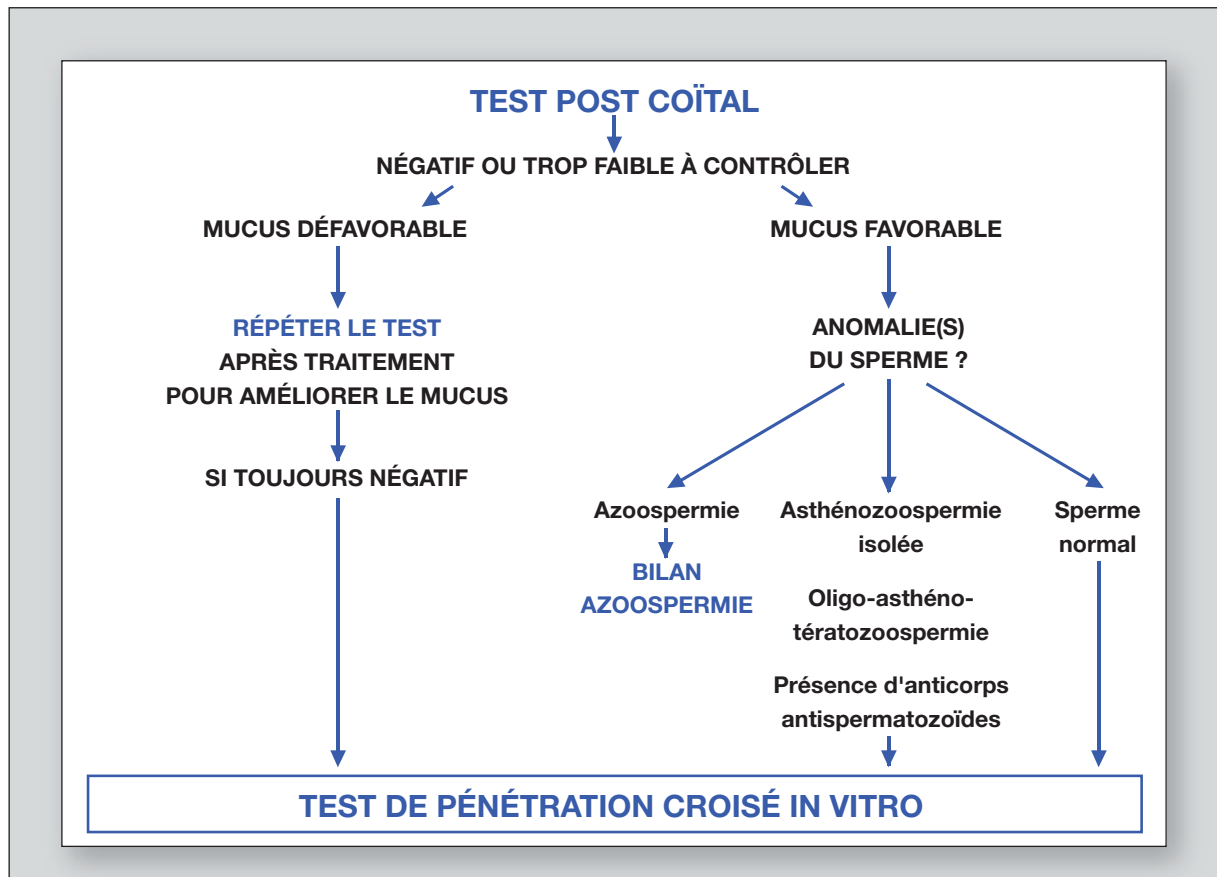
Remarque

- *Un test négatif peut résulter d'une mauvaise programmation : un test réalisé trop tôt ou trop tard au cours du cycle peut être négatif chez une femme par ailleurs fertile*
- *Chez certaines femmes, le test n'est positif qu'un à deux jours par cycle*
- *Si le mucus cervical est déficient, il faut répéter le test au cours d'un autre cycle éventuellement après administration d'œstrogènes pour obtenir une optimisation du mucus cervical.*

Tests in vitro

Une évaluation approfondie de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical peut être faite en utilisant des tests *in vitro*. Ces tests sont habituellement faits suite à des TH négatifs (Tableau 8).

Tableau 8 : Contextes de prescription d'un test de pénétration in vitro



Le maximum d'information est apporté par la réalisation du test de manière croisé. Les tests de pénétration croisés *in vitro* (TPCIV) consistent à mettre en présence *in vitro* au cours de la phase préovulatoire : 1) les spermatozoïdes du partenaire masculin et le mucus de la femme, 2) le sperme du partenaire masculin et un mucus cervical témoin, 3) un sperme témoin et le mucus de la femme.

Remarque

Ces tests ne peuvent pas être réalisés par tous les laboratoires puisqu'il faut pouvoir disposer de spermatozoïdes et de mucus témoins frais ou conservés.

Les spermatozoïdes témoins doivent répondre aux critères de normozoospermie de l'OMS (1999) (20 millions/ml et mobilité progressive \geq 50%) et un pourcentage de spermatozoïdes typiques au moins égal à 25% selon la classification de David (Slama et al., 2002). Les mucus cervicaux témoins doivent avoir un score OMS toujours supérieur à 10 et de préférence 12.

Le mucus cervical témoin (tout comme le mucus cervical de la femme) devra tout d'abord être observé au microscope afin de s'assurer de l'absence initiale de spermatozoïdes. Dans le cas contraire, le test devra être reprogrammé. Le mucus cervical témoin peut être obtenu chez des femmes en phase ovulatoire qui sont programmées pour une insémination artificielle ; le mucus cervical devrait être prélevé avant l'insémination lors de cycles naturels de préférence.

Des mucus de femmes traitées par du citrate de clomiphène dans le but d'induire leur ovulation ne devraient pas être employés en raison des effets possibles sur le col de l'utérus de ce composé anti-oestrogénique.

Les mucus cervicaux témoins peuvent être conservés quelques jours dans des conditions standardisées :

- *Dans le dispositif de prélèvement, seringue, tube de polyéthylène, etc... après obturation de l'extrémité par un bouchon ou du papier paraffine pour éviter la deshydratation (de ce point de vue, il faut veiller à minimiser le volume d'air contenu dans le dispositif)*
- *Au réfrigérateur à 4°C*
- *Pour des périodes n'excédant pas 5 jours*

Si possible, les échantillons de mucus doivent être utilisés dans les deux jours suivant le prélèvement et le délai entre le prélèvement et l'utilisation doit être noté. Les tests rhéologiques et de pénétration des spermatozoïdes ne doivent pas être effectués sur des prélèvements de mucus qui ont été congelés et décongelés.

La TPCIV est utile pour évaluer le retentissement d'une immunisation anti-spermatozoïde dans le sperme du patient ou le mucus de sa femme (Chapitre IV). Les tests *in vitro* doivent être faits dans un délai d'1h après le recueil du sperme et seuls des mucus cervicaux de milieu de cycle doivent être employés. Des « mucus » de substitution tels que le mucus cervical bovin ou des hydrogels synthétiques ont été proposés pour pallier à la difficulté de disposer facilement de mucus humains pour des tests croisés. Ils ne peuvent être considérés comme un équivalent du mucus cervical humain pour les tests *in vitro*. Ces « mucus » substitutifs sont cependant utiles pour étudier la capacité des spermatozoïdes à migrer dans un milieu de viscosité élevée dont l'organisation moléculaire est proche du mucus cervical humain.

Deux types de tests *in vitro* sont communément utilisés : le test simplifié sur lame et le test en tube capillaire. Le premier, proposé par l'OMS est peu usité en France, il est plus simple dans sa réalisation mais ne peut fournir qu'une interprétation qualitative à la différence du second aboutissant à une évaluation globale semi-quantitative.

Programmation commune aux différents tests *in vitro*

Les modalités de programmation sont similaires à celles du TH en dehors de l'absence de rapport sexuel programmé précédant le test.

Instructions données au couple pour un test *in vitro* au laboratoire

1. Prendre rendez vous dès le premier jour des règles afin de programmer la date des prélèvements et de la réalisation du test
2. S'abstenir de rapports sexuels (et l'homme de masturbation) dans une période de 2 à 8 jours précédant le test
3. Se rendre (tous les deux) au laboratoire au jour et à l'heure fixés pour la réalisation du test

Le jour de l'examen, l'homme prélève son sperme par masturbation. Une partie du sperme de l'homme est utilisée pour faire un spermogramme-spermocytogramme, le reste sert à la réalisation du test proprement dit.

Test in vitro simplifié sur lame

Recueil du mucus

Le mucus est recueilli selon la même méthode que pour le TH. Une partie du mucus aspiré est déposée sur une lame, pour l'évaluation ultérieure de l'interaction sperme/mucus.

Procédure

- Placer une goutte de mucus cervical sur une lame et écrasez-la à l'aide d'une lamelle 22mm x 22mm ; la profondeur de cette préparation peut être normalisée avec la technique de l'OMS décrite précédemment (en omettant de déposer l'huile de paraffine sur chacun des bords)
- Déposer sur chacun des côtés de la lamelle une goutte de sperme de telle sorte que les spermatozoïdes pénètrent par capillarité sous la lamelle; de cette façon, des interfaces nets entre mucus cervical et sperme sont obtenus
- Mettre la préparation dans une chambre humide à l'étuve à 37°C pendant 30 min
- Examinez les interfaces sperme/mucus au microscope en contraste de phase au grossissement final x400.

Observation

Observez si :

- Des projections de sperme en doigt de gant (phalanges) se développent au sein du mucus après quelques minutes (c'est une propriété physique des fluides car ce phénomène se produit de la même manière dans les échantillons de sperme de patient azoospermique)
- La plupart des spermatozoïdes pénètrent ces phalanges avant de pénétrer le mucus ; très souvent, on observe un spermatozoïde qui semble mener une colonne des spermatozoïdes au sein du mucus
- Une fois pénétrés dans le mucus cervical, les spermatozoïdes se dispersent, semblant se déplacer au hasard ; une minorité regagne les phalanges de plasma séminal, la plupart migre profondément au sein du mucus cervical jusqu'à ce que leur migration soit arrêtée par des débris cellulaires ou des leucocytes.

Interprétation

L'interprétation du test *in vitro* simplifié est subjective principalement parce qu'il est impossible de normaliser la taille et la forme de l'interface mucus/sperme dans ce type de préparation. En conséquence, il est recommandé de faire une simple évaluation qualitative. Les observations peuvent se résumer ainsi :

1. Résultat positif = « Les spermatozoïdes pénètrent le mucus au sein duquel plus de 90% d'entre eux sont mobiles progressifs »
2. Résultat faible = « Les spermatozoïdes pénètrent dans le mucus, mais la plupart ne progressent plus au delà d'un trajet d'environ 500µm (soit, environ 10 fois la longueur d'un spermatozoïde) »
3. Résultat négatif suggérant la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS) = « Les spermatozoïdes pénètrent dans le mucus mais s'immobilisent rapidement ou bien présentent un mouvement de forme ' shaking ' »*
4. Résultat négatif = « Il n'y a aucune pénétration des spermatozoïdes à l'interface avec le mucus, les phalanges s'étant formées ou non, les spermatozoïdes restant rassemblés sur le versant spermatique de l'interface »

* Mouvement typique de la présence d'ACAS

Remarque

Lorsque l'interaction sperme du conjoint/mucus de la conjointe est anormale, l'utilisation de sperme et de mucus témoins en suivant les mêmes modes opératoires permet d'apprécier la responsabilité des facteurs masculin et/ou féminin dans ce résultat anormal.

La partenaire peut recevoir un traitement de 5 jours d'éthinyl-oestradiol dans le but d'améliorer les propriétés physico-chimiques du mucus, gardant en mémoire que le test sera réalisé dans des conditions non physiologiques.

Test *in vitro* en tube capillaire

Ce test proposé à l'origine par Kremer (1965) mesure la capacité des spermatozoïdes à pénétrer une colonne de mucus cervical aspirée dans un tube capillaire. Diverses modifications de la procédure initialement décrite ont été proposées.

Ce test évalue à la fois :

- 1) la distance de migration des spermatozoïdes ayant pénétré la colonne de mucus
- 2) L'intensité de pénétration (la colonisation) du mucus, et
- 3) La capacité de survie des spermatozoïdes dans le mucus.

Tout comme le test simplifié sur lame, la possibilité supplémentaire de recourir à des spermes et des mucus témoins permet d'apprécier la responsabilité des facteurs masculin et/ou féminin. Il ne pourra être réalisé que dans des laboratoires pouvant disposer de spermes et de mucus normaux témoins.

Nous décrivons ci-dessous deux procédures se différenciant par quelques modalités techniques et analytiques. La procédure la plus souvent utilisée en France intègre les trois types d'information (migration, colonisation, survie à court terme) dans une évaluation semi quantitative unique ; la procédure proposée dans le manuel de l'OMS (1999) est fondée sur la combinaison de plusieurs scores et l'estimation de la survie à 24h.

Recueil du mucus (identique dans les deux procédures)

Le mucus est recueilli selon la même méthode que pour le TH. Le mucus aspiré est déposé sur une lame de verre en veillant à ne pas faire de bulles d'air et les capillaires sont remplis par aspiration en veillant également à ne faire aucune bulle d'air. Divers types de tubes capillaires ont été proposés. Des tubes capillaires présentant une section rectangulaire (petite dimension = 0,3 mm) qui facilite l'observation microscopique sont recommandés (par exemple, capillaires Camlab Ltd). Le capillaire doit donc être associé à un dispositif d'aspiration. Le remplissage du capillaire peut être effectué de façon simple, par exemple en obturant l'extrémité large d'une pipette Pasteur par une pâte élastique dans laquelle on introduit le capillaire, son extrémité libre étant placée dans le mucus cervical à examiner : on applique alors une aspiration douce et régulière à l'autre extrémité de la pipette Pasteur afin de remplir au maximum le capillaire sans faire de bulles d'air.

Procédure 1

- Disposer les capillaires (selon cette procédure on utilise des capillaires de 10 cm de long à section rectangulaire qui sont remplis sur une longueur d'environ 7 cm) contenant les mucus cervicaux homologue et témoin verticalement dans des tubes en verre à fond rond (avec bouchon) contenant 100µl des spermatozoïdes homologue et témoin
- Un trou est réalisé dans chacun des bouchons afin de maintenir le tube capillaire en position verticale et d'obturer au mieux le dispositif capillaire-tube durant toute la période de pénétration des spermatozoïdes
- La température d'incubation doit être standardisée à 37°C
- L'évaluation, semi-quantitative, est effectuée après 1 heure et 4 heures d'incubation, en contraste de phase, à l'objectif x10 (grossissement final x100).

À la première heure, on note :

- la plus grande distance de migration des spermatozoïdes dans le capillaire (en cm), puis, avec un système de cotation de 0 à +++
- l'intensité de pénétration de spermatozoïdes à 1 cm et 4 cm : 0 = 0 spermatozoïde/champ, + = environ 50 spermatozoïdes/champ, ++ = environ 100 spermatozoïdes/champ, +++ = 150 et plus spermatozoïdes/champ
- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et le caractère orienté ou non du mouvement aux mêmes niveaux (normalement les spermatozoïdes migrent dans le mucus avec des trajectoires rectilignes orientées selon le grand axe du capillaire).

À la 4^{ème} heure, l'intensité de pénétration et les caractéristiques de mobilité (= survie) sont à nouveau évaluées de la même façon.

Tableau 9 : Exemple de feuille de paillasse pour le TPCIV (Procédure 1)

Feuille de paillasse TPCIV

Nom : **Du P...**

N° Dossier : **01002**

Date : **20/06/09** Jour du cycle : **14**

Température : **36,2°C** Traitement préalable : **Neuhut**

Heure mise en contact : **8h30**

MUCUS TESTE

Abondance : **++**

Aspect : **translucide**

Filance : **3**

Cellules : **1**

+

SPERME TESTE

Heure Lecture : **T1**

9h30

Progression : **X**

Intensité de Pénétration : **+**

Mobilité Progressive : **10%**

Survie (Mobilité progressive) : **10%**

1 cm

2 cm

3 cm

4 cm

5 cm

Heure mise en contact : **9h30**

MUCUS TEMOIN Ref: 1059

Abondance : **+++**

Aspect : **translucide**

Filance : **3**

Cellules : **3**

+

SPERME TESTE

Heure Lecture : **T1**

9h30

Progression : **X**

Intensité de Pénétration : **+**

Mobilité Progressive : **20%**

Survie (Mobilité progressive) : **15%**

1 cm

2 cm

3 cm

4 cm

5 cm

Heure mise en contact : **8h30**

MUCUS TESTE

Concentration : **506K**

Mob. progressive : **50**

Morph. typique : **32**

+

SPERME TEMOIN Ref: 506K

Heure Lecture : **T1**

9h30

Progression : **X**

Intensité de Pénétration : **+++**

Mobilité Progressive : **50%**

Survie (Mobilité progressive) : **35%**

1 cm

2 cm

3 cm

4 cm

5 cm

Cahier de formation Bioforma • Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin • 2009

106

Tableau 11 : Interprétations possibles des tests de pénétration croisés *in vitro*

OAT = Oligo-asthénospermie

SP = Spermie du patient

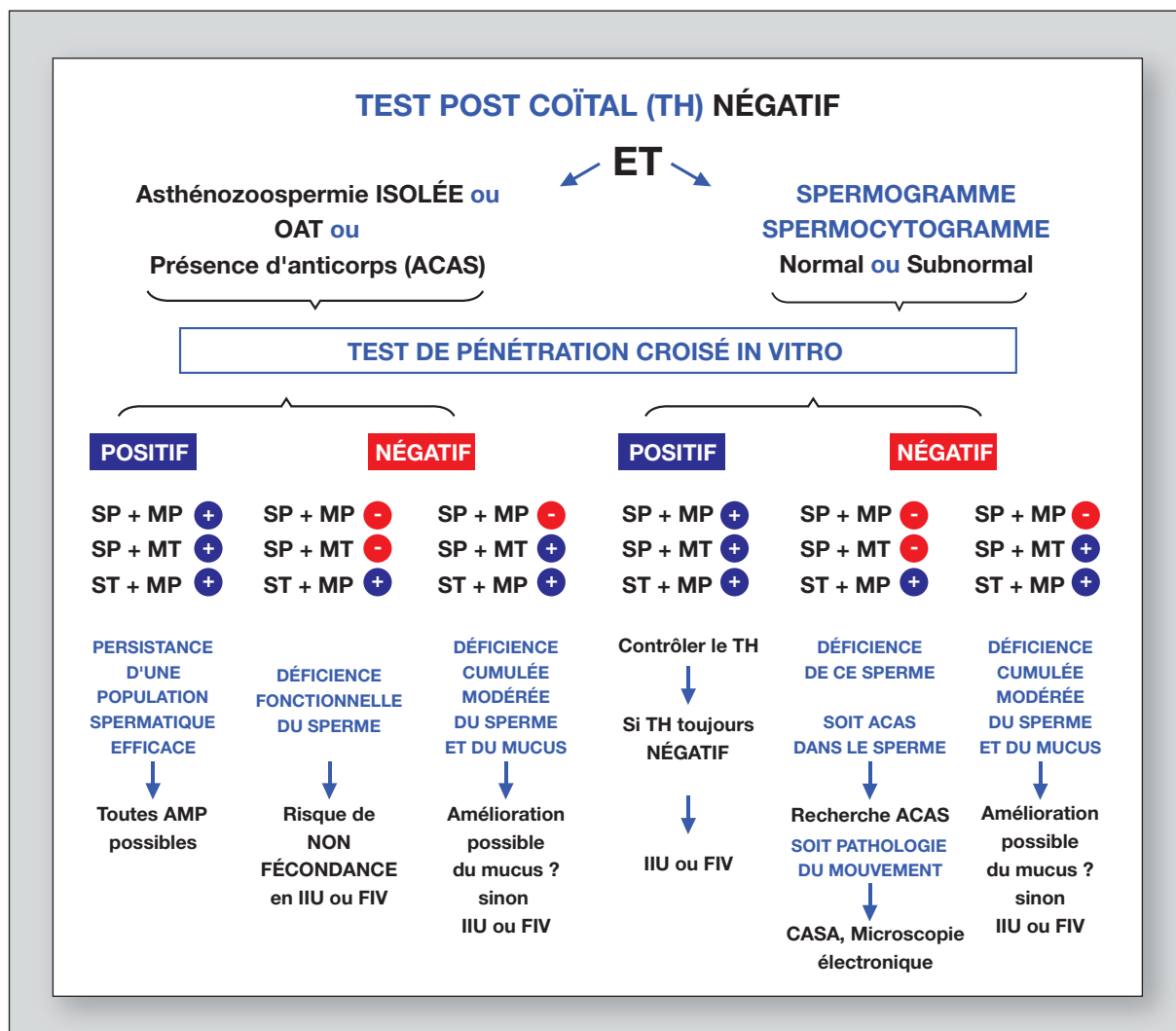
ST = Spermie témoin

MP = Mucus de la patiente

MT = Mucus témoin

ACAS = Anticorps anti spermatozoïde

CASA = Système d'analyse du mouvement assisté par ordinateur



Résultats/Interprétation/pronostic

Si les tests direct et croisés sont positifs, alors que le TH est négatif, il faudra reconstrôler ce dernier qui n'a probablement pas été fait dans des conditions optimales. Si dans les conditions optimales le test post-coïtal est finalement positif, la grossesse devrait normalement survenir naturellement. Un test de pénétration croisé *in vitro* peut simplement confirmer la faible colonisation et diffusion des spermatozoïdes dans un mucus normal en relation avec une oligo et/ou asthénospermie qui est appréciée sur le spermogramme conjoint. S'il est faiblement positif, des inséminations intra-utérines pourraient être proposées. Le test peut aussi révéler l'existence d'un mucus impropre à la pénétration des spermatozoïdes : le test est conclu négatif. Cela peut être dû à la présence d'anticorps antispermatozoïdes dans le mucus ou à un mucus non fonctionnel. Dans ce dernier cas, des traitements

devront être entrepris pour tenter d'améliorer ses qualités physico-chimiques. Si celles-ci ne peuvent être améliorées, ou dans le cas de la présence d'anticorps, il faudra également recourir à des inséminations intra-utérines. Enfin, le test peut révéler une absence de pénétration des spermatozoïdes ou une pénétration incomplète des spermatozoïdes alors que le mucus présente une qualité optimale. Le test est conclu négatif. Ce résultat oriente vers des examens complémentaires, à la recherche d'une cause immunologique (un mouvement oscillant sur place des spermatozoïdes, précocement observé, est très évocateur de la présence d'anticorps antispermatozoïdes) ou d'une pathologie du mouvement des spermatozoïdes. Si l'une ou l'autre de ces anomalies est confirmée, il faudra probablement envisager une procréation médicalement assistée dont le choix (IIU, FIV, ICSI) dépendra de l'importance qualitative et quantitative de l'anomalie.

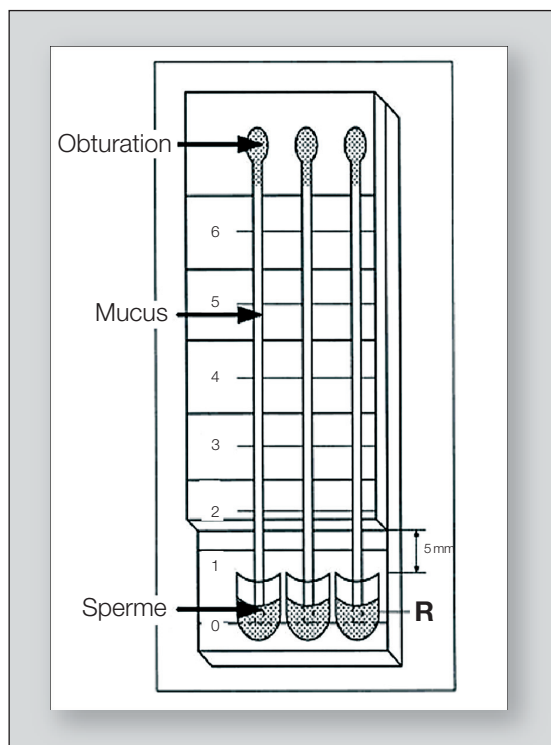
Procédure 2 (de l'OMS)

Le dispositif préconisé (Figure 36) peut être aisément réalisé comme suit :

1. Coller à l'extrémité d'une lame de verre, comme illustré sur la figure, trois petits réservoirs confectionnés avec la base de petits tubes en plastique à fond rond (diamètre d'environ 7 mm)*
2. Coller une deuxième lame de verre sur la première, la deuxième lame étant disposée à 1,5 cm de l'extrémité de la première et à environ 5 mm de l'ouverture des réservoirs (ce dispositif va empêcher la remontée par capillarité du fluide séminal entre le tube capillaire et la plaque en verre)
3. Marquer à l'aide d'un feutre une échelle centimétrique sur le bord de cette seconde lame.

*On peut alternativement utiliser un petit conteneur, type capsule BEEM No. 00 et percer un trou dans son bouchon permettant d'introduire et de maintenir le tube capillaire en position verticale durant toute la période de pénétration des spermatozoïdes.

Figure 36 : Dispositif proposé par l'OMS pour réaliser l'interaction *in vitro* spermatozoïdes / mucus. Les capillaires contenant les mucus à tester sont plongés dans les trois réservoirs contenant les spermés à tester



Une fois le dispositif réalisé, on doit :

- Déposer à l'aide d'une pipette dans chaque réservoir un petit volume (environ 50µl) de chacun des échantillons de sperme à tester (dans l'heure suivant l'éjaculation s'il s'agit de sperme frais)
- Aspirer le mucus cervical dans les tubes capillaires, en s'assurant de ne faire aucune bulle d'air
- Observer le mucus au microscope afin de vérifier qu'il est dépourvu de spermatozoïdes
- Sceller l'extrémité supérieure du tube avec de la pâte à modeler, ou tout matériau similaire ; l'obturation doit être réalisée de telle manière que la colonne de mucus fasse légèrement saillie à l'autre extrémité du tube
- Placer l'extrémité ouverte du tube capillaire dans le réservoir contenant l'échantillon de sperme de telle sorte qu'elle soit immergée sur une longueur d'environ 0,5 cm.

- Incuber à 37°C (les valeurs de référence fournies plus loin concernent cette température) pendant 2h en atmosphère humide (pour éviter la dessiccation du sperme et/ou du mucus)
- Effectuer les évaluations microscopiques aux temps recommandés et remettre le dispositif à l'étuve entre deux évaluations.

Après 2 h on évalue les variables suivantes :

- Distance de migration : distance entre l'extrémité inférieure du tube capillaire et la position du spermatozoïde ayant parcouru la plus longue distance
- Intensité de pénétration à 1 cm et 4,5 cm de l'extrémité inférieure du tube capillaire : à chacun de ces niveaux, le nombre moyen de spermatozoïdes par champ au grossissement final x100 (oculaire x10 et objectif x10) est déterminé, le nombre moyen étant obtenu à partir des évaluations de cinq champs adjacents ; le score d'intensité de pénétration correspondant est donné dans le [Tableau 12](#)
- Différentiel de la pénétration : c'est le différentiel entre les scores d'intensité de pénétration à 1 cm et 4,5 cm
- Survie : détection de spermatozoïdes mobiles progressifs à 2h et à 24h.

Tableau 12 : Correspondance entre nombre de spermatozoïdes observés par champ et score d'intensité de pénétration

Nombre moyen de spermatozoïdes par champ (grossissement final x100)	Score d'intensité de pénétration
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
> 100	7

Exemple 1

Le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs moyen par champ à 1 cm est 51-100 et à 4,5 cm, 6-10. Selon le [Tableau 12](#), le différentiel est de 3 (6-3) : il s'agit d'une pénétration médiocre.

Exemple 2

Le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs moyen par champ à 1 cm est 21-50 et à 4,5 cm, 51-100. Selon le [Tableau 12](#), le différentiel est négatif (5-6) ; dans ces situations de score négatif et par

convention le score différentiel est 0 : il s'agit d'une bonne pénétration puisque l'on retrouve plus de spermatozoïdes mobiles progressifs.

Résultats/Interprétation

Tableau 13 : Exemple de résultats globaux du test

Distance parcourue (cm)	Indice de pénétration maximum (nombre de spermatozoïdes par champ à 1 cm et 4,5 cm)	Score différentiel d'intensité entre 1 et 4,5 cm	Survie (mouvement progressif) (h)	Classification
1	0	-	-	Test négatif
< 3 ou	< 10 ou	> 3 ou	à 2h mais pas à 24h	Test faible
4,5 et	> 50 et	< 3 et	> 24h	Test positif

Similitudes et différences entre les 2 procédures

La procédure la plus souvent utilisée en France intègre les trois types d'informations (migration, intensité de pénétration ou colonisation, survie) étudiées dans la méthode de l'OMS. Il faut cependant remarquer, et cela est lié au dispositif : mucus « exposé » à l'air, + température à 37°C aboutissant à un assèchement relativement rapide de la préparation au delà de 4 heures, que sa limite principale concerne l'estimation de la survie à long terme.

**Méthodologie (2) :
tests complémentaires usuels
portant sur le sperme**

CHAPITRE IV

Spermoculture

Le tractus génital masculin est un cul-de-sac allant des tubes séminifères au méat urinaire qui présente une structure globalement contournée où peuvent se loger de multiples micro-organismes, bactéries, parasites, champignons ou encore virus. Si les infections aiguës sont cliniquement parlantes, les infections chroniques sont le plus souvent asymptomatiques. Il faut noter que dans le cadre du bilan de l'infertilité du couple, on n'observe que de manière exceptionnelle des infections aiguës du tractus génital de l'homme. S'il s'agit d'infections chroniques, le fait qu'elles soient asymptomatiques ne signifie pas qu'elles sont sans effet sur l'intégrité du tractus et/ou des spermatozoïdes. En effet cette situation peut être à l'origine d'une inflammation plus ou moins importante du tractus. Une autre particularité du tractus génital de l'homme qui constitue une grande difficulté pour l'interprétation de la présence de germes dans le sperme est que les modalités du prélèvement font qu'une contamination est toujours possible. Pour toutes ces raisons, la place de la spermoculture dans le bilan des infertilités du couple, bien que peu contestée, demeure un sujet de controverse majeure comme en atteste la littérature. Cependant la nécessité de sécurité sanitaire, s'agissant d'infections possiblement sexuellement transmissibles, et la pratique de l'AMP ont conduit à la recommandation de ce test à la fois dans le cadre diagnostique et dans celui de l'AMP.

La spermoculture : exigences réglementaires

L'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation a fixé le caractère indispensable de la réalisation de la spermoculture :

« Un bilan diagnostique du couple est réalisé préalablement à toute AMP. Il comprend au minimum, après anamnèse, les examens suivants :

- examen clinique
- exploration du cycle et du statut ovarien
- exploration utérine ou utéro-tubaire selon les cas
- spermogramme, spermocytogramme, spermoculture
- tests de sécurité sanitaire. »

« ...Le biologiste agréé qui participe notamment à la décision de prise en charge en IAC du couple n'assurera la préparation du sperme que s'il obtient une information complète sur l'indication de l'IAC, les données détaillées d'un test de migration-survie des spermatozoïdes (TMS) et d'une spermoculture datant de moins de six mois ... »)

Dans le cas particulier du don de sperme : *« ...il est nécessaire de pratiquer une spermoculture ainsi qu'une recherche de chlamydiae par la technique la plus sensible... ».*

Les analyses bactériologiques susceptibles d'être effectuées lors d'un bilan d'infertilité ou avant AMP sont :

- sur le sperme : recherche de germes usuels (spermoculture simple, selon la nomenclature « examen microbio du sperme », B90) +/- recherche de mycoplasmes (à préciser sur l'ordonnance, B40)
- sur les urines : recherche de chlamydia par PCR (B100), sur le premier jet urinaire recueilli dans un pot stérile, premières urines du matin, sinon au moins 3h après la dernière miction.

Méthodologie

Conditions du prélèvement

Les conditions du prélèvement de sperme et les étapes pré-analytique et analytique sont les mêmes que celles décrites dans le [chapitre III](#). Comme pour tout prélèvement microbiologique, il est absolument nécessaire d'optimiser les conditions de recueil du sperme. Il a été montré que le seul fait d'expliquer les mesures d'hygiène au patient avant le prélèvement réduit de manière significative le nombre de spermocultures positives. Pratiquement, il faut donner les instructions de recueil par oral et les afficher dans la pièce où le recueil est fait. Après émission, le prélèvement doit être traité le plus rapidement possible. Le patient doit uriner puis se laver les mains et le pénis avec du savon, se rincer abondamment et s'essuyer avec une serviette propre de préférence à usage unique, avant d'effectuer le recueil de sperme. Afin de parfaire la désinfection du gland, il est conseillé d'appliquer une solution bactéricide sur celui-ci (type chlorhexidine ou dakin). Le réceptacle dans lequel sera recueilli le sperme doit être stérile.

Remarque

Ne pas mettre le prélèvement à l'étuve. Si un spermogramme-spermocytogramme est demandé en même temps, après liquéfaction (prélèvement laissé sur la paillasse), prélever stérilement le volume nécessaire à l'examen microbiologique ($\geq 0,5\text{ml}$) et le déposer dans un tube stérile. Si le prélèvement n'est pas traité immédiatement sur place, il peut être gardé pendant un temps limité (1 à 2 heures) à 4°C afin de limiter la prolifération bactérienne.

Examen bactériologique

Examen direct

L'examen à l'état frais du sperme entre lame et lamelle va viser à rechercher la présence de levures ou de parasites notamment le *Trichomonas vaginalis*. La coloration de Gram permet de rechercher l'existence ou non de diplocoques à Gram négatif (*Neisseria gonorrhoeae*), de levures, de cocci à Gram positif, de bacilles à Gram négatif. La coloration au MGG permet de noter la présence ou non de leucocytes.

Culture

Après dilution au 10^{ème} du sperme dans du sérum physiologique, le prélèvement est ensemencé sur une gélose chocolat, une gélose au sang en milieu aérobie et anaérobie et une gélose Sabouraud pour la recherche de levures (*Candida*).

La recherche de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum* se réalise sur des milieux synthétiques enrichis en sérum et en extrait de levure. L'identification se fait sur les propriétés métaboliques (fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine ou de l'urée).

Dans les cultures monomicrobiennes, le germe est identifié et un antibiogramme est réalisé si la concentration est supérieure ou égale à 10³ UFC/ml.

Résultats, interprétation, conclusion

Les cultures monomicrobiennes sont en faveur d'une infection et ce d'autant plus qu'il s'agit d'espèces bactériennes comme *Neisseria gonorrhoeae* dont la pathogénicité est établie. Cependant, en dehors de cette espèce très rarement trouvée dans le contexte de la demande de spermoculture, la possibilité d'une contamination lors du recueil ne peut totalement être écartée. À l'opposé, la présence d'une flore polymorphe suggère plutôt une contamination au moment du recueil. Les bactéries et levures de la flore digestive peuvent également souiller le prélèvement. Concernant la détection de

chlamydia par PCR sur premier jet d'urines, plusieurs études indiquent de faibles taux de positivité lorsqu'il s'agit de populations d'hommes consultant pour une infécondité du couple.

La question des traitements, comment traiter, à partir de quels seuils, durée des traitements, etc..., reste un sujet très controversé et ne concerne qu'indirectement le biologiste (spermocultures de contrôle, contrôles chez la partenaire, etc...). Le niveau de connaissance encore très fragmentaire du rôle des infections/inflammations sur le tractus génital de l'homme et les spermatozoïdes implique de développer plus d'études dans ce domaine.

Tableau 1 : Principaux germes identifiés lors de 965 spermocultures consécutives au cours de bilans d'infertilité du couple et/ou avant AMP (Hôpital Cochin, 1996). Le taux de spermocultures négatives était de 69,8%

Germes identifiés	Fréquence (%)	Nombre d'hommes concernés
1) ureaplasma u.	9,8	28/965
2) enterocoque	6,6	19/965
3) E. coli	4,9	14/965
4) staphylo. coag.	3,6	10/965
5) proteus	2,2	6/965
6) strepto. β	1,8	5/965
7) mycoplasme h.	1,4	4/965
8) morganella m.	0,7	2/965

Bibliographie

- Moskowitz MO, Mellinger BC. (1992) Sexually transmitted diseases and their relation to male infertility. Urol Clin North Am. 19, 35-45.
- Krissi H, Orvieto R, Ashkenazi J, Gilboa Y, Shalev J, Moscovitch I, Bar-Hava I. (2004) Effect of contaminated preprocessed semen on fertilization rate and embryo quality in assisted reproductive techniques. Gynecol Endocrinol. 18, 63-67.

Biochimie séminale

Le plasma séminal, milieu de transport et de survie des spermatozoïdes qui s'y admixent lors de l'éjaculation est un fluide biologique composite et complexe contenant un très grand nombre de substances (par exemple plus de 500 protéines selon des travaux récents en protéomique), sécrétées à différents niveaux de l'appareil génital ([Tableau 1](#)).

Un certain nombre d'entre elles interagissent avec les spermatozoïdes et sont susceptibles d'en modifier les propriétés fonctionnelles et le pouvoir fécondant. Le volume et la composition du plasma séminal sont altérés lors de diverses pathologies et notamment dans tout processus inflammatoire de l'appareil génital. Certaines d'entre elles peuvent être suspectées voire diagnostiquées grâce au dosage de plusieurs composés du plasma séminal. Le fait que certains de ces composés soient sécrétés dans une portion anatomique spécifique du tractus génital, est utilisé en pratique courante pour tenter de localiser l'origine des anomalies lors de bilans d'une infertilité du couple mais aussi, d'une manière plus large, dans l'évaluation andrologique de l'homme.

Au total, l'analyse biochimique de plusieurs composés du plasma séminal, examen de deuxième intention faisant l'objet d'une cotation, est un outil extrêmement précieux dans ces deux domaines. [Le Tableau 1](#) illustre à l'aide de quelques exemples non exhaustifs la variété des composés présents dans le plasma séminal en fonction des différents compartiments anatomiques.

Fonctions des différentes sécrétions

Epididyme

La maturation des spermatozoïdes au cours de leur transit dans l'épididyme dépend des multiples activités de sécrétion et de réabsorption de l'épithélium épидидymaire ([Chapitre I](#)). La composition du fluide épидидymaire se modifie de la tête à la queue de l'épididyme.

Vésicules séminales

L'éventuelle fonction des nombreux composés des sécrétions des vésicules séminales, n'est établie que pour une minorité d'entre eux. La plus claire est la coagulation du sperme, qui se produit immédiatement après l'éjaculation et implique la séménogéline et la fibronectine. Le fructose et le glucose participent au métabolisme énergétique des spermatozoïdes. La sphingomyéline aurait un effet stabilisant sur leur membrane. Certains composés auraient une activité anti-bactérienne (prostaglandines, lactoferrine) ou des propriétés immunomodulatrices (lactoferrine).

Prostate

La sécrétion prostatique intervient dans la liquéfaction du sperme éjaculé. Le PSA hydrolyse la séménogéline et la fibronectine responsables de la coagulation du sperme. La PAP et d'autres protéases comme le pepsinogène C contribuent à la dissolution du coagulum.

Tableau 1 : Composition biochimique principale des fluides et sécrétions dans les différentes portions anatomiques post-testiculaires et participation relative des différentes sécrétions dans le volume de plasma séminal

Caractéristiques	Epididyme	Vésicules séminales	Prostate
Ions	Ca, P, Cl, Na,...	+/-	Zn, Na, K, ...
Composés sucrés et azotés et autres molécules de bas poids moléculaire	glycérol, inositol, acide sialique, carnitine, acetylcarnitine,...	acides aminés, prostaglandines+++ (notamment, PGE-1 et PGE-2), fructose et glucose	Citrate (++), spermine, spermidine, putrescine
Stéroïdes	testostérone, DHT		
Enzymes	alpha 1-4 glucosidase, glycosyltransférase, bêta-glucuronidase, gamma-GT, catalase, SOD,...	anhydrase carbonique, 5- nucléotidase	PAP, pepsinogène C, lactate deshydrogénase, succinate deshydrogénase, diverses osidases ; nucléosidases, protéines kinases, gamma-GT, catalase, diamine oxydase,...
Lipides	glycérophosphorylcholine, ...	sphingomyéline, phosphatidylsérine	cholestérol
Protéines	protéines et glycoprotéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes et l'acquisition du pouvoir fécondant	transferrine, lactoferrine, séménogéline, fibronectine	albumine, alpha-1 glycoprotéine acide, Zn-alpha-2 glyprotéine, PSA, facteurs de croissance, EGF.
pH	légèrement acide	alcalin	acide
Proportion volumique dans le plasma séminal	environ 5%	environ 65%	environ 30%

Variations de la quantité et de la composition du plasma séminal

L'activité sécrétoire tout au long du tractus génital est sous le contrôle de plusieurs hormones notamment des androgènes. Un déficit androgénique quelle que soit son origine réduit de façon importante les sécrétions tant de l'épididyme que des vésicules séminales et de la prostate. La testostérone est apportée à l'épididyme par la circulation mais surtout par le fluide testiculaire. Elle est convertie dans les cellules de l'épithélium épидидymaire ainsi que dans la prostate et les vésicules séminales en son dérivé actif, la 5-alpha dihydrotestostérone (DHT). D'autres hormones, comme les oestrogènes, l'aldostérone et

la prolactine, semblent également susceptibles d'agir sur l'épididyme, les vésicules séminales et la prostate. Par ailleurs, l'innervation cholinergique et adrénergique des parois du tractus intervient également dans la régulation des activités sécrétoires et dans la proportion respective des différentes sécrétions dans la composition du plasma séminal.

L'importance des sécrétions des vésicules séminales et de la prostate se révèle en pratique très variable d'un individu à l'autre et, chez un même individu, d'un éjaculat à l'autre, en fonction du contexte de l'éjaculation et du délai écoulé depuis l'éjaculation précédente. De nombreux médicaments, comme certains anti-hypertenseurs, neuroleptiques ou antidépresseurs, sont susceptibles de modifier la mécanique éjaculatoire et, donc, la composition biochimique finale du plasma séminal. Enfin, il faut savoir qu'une source potentiellement importante de variation de la composition du liquide séminal est liée au temps qui s'écoule entre l'éjaculation et le moment où le plasma séminal est étudié. De nombreux processus, en particulier enzymatiques se produisent entre certains composés des différentes sécrétions et en modifient les concentrations. En définitive, on observe une variabilité notable de l'importance et des proportions relatives des différentes sécrétions du tractus génital dans le sperme éjaculé et dans la composition biochimique du plasma séminal.

Dans l'analyse des marqueurs biochimiques du plasma séminal, il est donc essentiel de connaître et contrôler autant que possible les facteurs qui peuvent l'être et, avant tout, le délai d'abstinence et les conditions de recueil et d'analyse.

Conditions de recueil et de traitement du sperme en vue de l'analyse biochimique

Les conditions de recueil sont les mêmes que précédemment décrites ([Chapitre III](#)) sauf que le délai d'abstinence nécessaire concerne un nombre fixe de jours, 5 jours sans éjaculation (ni plus ni moins) sont généralement préconisés.

Remarques

La recommandation d'un tel délai et le contrôle qu'il a bien été respecté sont des étapes pré-analytiques essentielles pour le rendu des résultats exprimés non pas en concentration mais en quantité de substance par éjaculat ainsi que pour l'interprétation de ces résultats, d'un patient à l'autre ou lors d'examens répétés pour un même patient.

Procédure

- Dès que possible, placer l'éjaculat à l'étuve à 37° C jusqu'à liquéfaction
- Après réalisation du spermogramme ([Chapitre III](#)), centrifuger 1,5 ml minimum de sperme à 12 000 g pendant 10 min dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C pour séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et récupérer le millilitre de plasma séminal nécessaire pour une analyse biochimique complète
- La préparation de liquide séminal est alors immédiatement congelée à -20°C dans l'attente des dosages des marqueurs biochimiques (si le prélèvement est transporté, il doit être maintenu à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages).

Marqueurs biochimiques séminaux utilisés dans l'exploration de la fertilité, méthodes de dosage

En pratique, 6 composants du plasma séminal sont le plus souvent utilisés comme marqueurs des différentes sécrétions du tractus génital : la carnitine libre et l' α -1,4 glucosidase neutre pour la sécrétion épидидymaire, le fructose pour celle des vésicules séminales et le zinc, le citrate et la PAP pour la sécrétion prostatique. L'intérêt du dosage de ces composés n'est pas tant lié à leur importance physiologique qu'au fait que leur origine est suffisamment spécifique d'une portion précise du tractus, épидидyme, vésicules séminales ou prostate.

Certains marqueurs, le zinc, la phosphatase acide, l' α -1,4 glucosidase, peuvent être dosés directement dans le plasma séminal ou après simple dilution dans une solution saline 0,15M. Les autres marqueurs, L- carnitine, citrate et fructose nécessitent une déprotéinisation préalable soit par de l'acide perchlorique, suivie d'une neutralisation, soit par passage sur membrane de filtration Millipore[®].

Remarque

L'existence d'un faible volume est l'une des indications pour la réalisation de la biochimie séminale. Lorsque le volume de l'éjaculat est très faible (1ml et moins), il faudra se contenter du dosage d'un seul marqueur par compartiment anatomique, par exemple, l' α -1,4 glucosidase pour l'épididyme, le fructose pour les vésicules séminales et le zinc pour la prostate.

Dosage de la L-carnitine, du fructose, du citrate par spectrophotométrie à 340 nm.

Le marqueur à doser est le premier substrat d'une cascade de réactions enzymatiques à 37°C, c'est donc le paramètre limitant. La dernière réaction est la réaction indicatrice, elle aboutit à la formation ou à la consommation de NADH₂ ou NADPH₂, dont on mesure la variation en point final par spectrophotométrie UV à 340 nm. Le dosage se déroule en 2 temps. On incube d'abord le plasma séminal avec un premier réactif contenant le tampon de réaction, les substrats annexes nécessaires et les différentes enzymes de la cascade, excepté la première enzyme.

Puis on ajoute le deuxième réactif, réactif déclenchant contenant la première enzyme qui initialise la cascade de réactions. On effectue la mesure en fin de réaction, quand le substrat initial est épuisé.

Pour le dosage de la L-Carnitine, le réactif déclenchant sera la carnitine acétyl transférase (CAT).

Remarque

Il existe une autre technique de dosage de la L-carnitine qui repose sur une lecture colorimétrique et la valeur normale est plus basse. On mesure la formation de CoA après action de la carnitine acétyl transférase sur l'acétyl CoA et la L-carnitine de l'échantillon. Le CoA formé réagit avec l'acide 5-5 dithio bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) pour former l'anion 5-thio-2-nitrobenzoate jaune qui absorbe à 405 nm. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la quantité de L-Carnitine contenue dans l'échantillon.

Pour le dosage du fructose, la technique utilisée est conçue pour doser à la fois le fructose et le glucose. Le sperme contient peu de glucose, mais il faut néanmoins éliminer cette interférence. Dans ce but, le premier réactif contient l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui réalisent la totalité de la cascade enzymatique du glucose, alors que le fructose est seulement transformé en fructose-6-phosphate. La première mesure effectuée prend donc en compte la formation de NADPH₂ liée spécifiquement à la présence de glucose. Puis le deuxième réactif, la phosphoglucose isomérase, déclenche la suite du dosage spécifique du fructose. Ainsi, par

différence entre les deux mesures d'absorbance, on obtient le dosage du fructose.

Le fructose est synthétisé dans les cellules épithéliales des vésicules séminales, par conversion à partir du glucose sanguin. Le diabète entraîne une "fausse" augmentation du fructose séminal et peut, par exemple, masquer un abaissement de ce paramètre. La technique du dosage du citrate est semblable à celle de la L-carnitine, avec comme réactif déclenchant la citrate lyase.

Dosage du zinc

Le zinc forme avec le 5-Br-PAPS un complexe coloré rouge violet dont on mesure l'absorbance en point final à 560 nm. Celle-ci est directement proportionnelle à la quantité de zinc contenue dans l'échantillon.

Détermination de l'activité phosphatase acide (technique d'Hillmann modifiée)

Un substrat spécifique, l' α -naphtylphosphate est hydrolysé à 37° C, aboutissant à la formation d' α -naphtol qui réagit avec un sel de Fast Red TR (dialzo 2, chloro 5 toluène) pour former un composé azoïque coloré. Il s'agit d'une méthode cinétique colorimétrique avec une mesure de l'augmentation moyenne de densité optique par minute à 405 nm pendant 3 minutes.

Mesure de l'activité α -1,4 glucosidase neutre (technique recommandée par l'OMS)

Le sperme contient de nombreuses osidases mais seule l' α -1,4 glucosidase neutre est spécifiquement d'origine épидидymaire. L'activité enzymatique est mesurée par hydrolyse à pH 6,8 et à 37°C du p-nitrophénol glucopyranoside en p-nitrophénol, dont on mesure l'absorbance à 405 nm. Pour rendre la mesure spécifique de cette isoenzyme, on utilise deux inhibiteurs: le dodécylsulfate de sodium (SDS) qui inhibe l'activité de l'isoenzyme α -glucosidase acide prostatique, et, la castanospermine, alcaloïde qui inhibe toutes les activités hydrolasiques du sperme et permet donc de réaliser un blanc échantillon. L'activité de l' α -1,4 glucosidase neutre est facile à mesurer, sensible et spécifique.

Remarque

Les dosages des différents marqueurs biochimiques du plasma séminal sont commercialisés et peuvent être adaptés sur automate excepté le dosage de l' α -1,4 glucosidase qui reste manuel.

Expression des résultats. Valeurs de référence

Les résultats sont exprimés en quantité par éjaculat après avoir multiplié la concentration mesurée par le volume de l'éjaculat.

Remarque

Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence. En pratique, cela pose le problème de la définition de la population de référence et que celle-ci soit suffisamment importante pour obtenir une distribution et donc des valeurs seuils reflétant la réalité (dans l'idéal, les valeurs de référence devraient provenir de sujets en bonne santé ayant récemment procréé).

Les valeurs de référence de l'OMS obtenues par une telle approche sont le plus souvent utilisées. Elles sont indiquées dans le Tableau 2. Pour l'interprétation des résultats, le seuil en dessous duquel le résultat est considéré comme significativement perturbé a été fixé au 10^{ème} percentile de la distribution pour chacun des marqueurs considérés.

Tableau 2 : Marqueurs biochimiques usuels du plasma séminal : Origine, méthodes de dosages, valeurs de référence

	Fructose	Citrate	Zinc	Phosphatase acide	α 1,4 Glucosidase neutre	L-Carnitine
Origine	vésicules séminales	prostate	prostate	prostate	épididyme	épididyme (principalement)
Méthode de dosage usuelle	enzymatique 340 nm		colorimétrique 560 nm	cinétique enzymatique 405 nm		enzymatique 340 nm ou colorimétrique 405 nm
Valeurs de référence par éjaculat	$\geq 20\mu\text{mol}$	$\geq 60\mu\text{mol}$	$\geq 3\mu\text{mol}$	$\geq 1234\text{UI}$	$\leq 59\text{mU}$	$\geq 654 \text{ nmol}$ ou $\geq 390 \text{ nmol}$

Indications et intérêt du dosage des marqueurs biochimiques séminaux

L'intérêt du dosage des marqueurs biochimiques repose principalement sur le fait qu'ils sont produits spécifiquement par une des glandes annexes ou zone bien déterminée du tractus génital mâle. Il est possible ainsi de localiser une atteinte au niveau du tractus génital en fonction de la diminution de tel ou tel marqueur. L'étude biochimique du plasma séminal peut s'avérer utile pour compléter le bilan de différentes pathologies susceptibles de retentir sur l'intégrité anatomique et fonctionnelle du tractus génital: pathologies endocriniennes (notamment les hypoandrogénies), urologiques, métaboliques (diabète) ou encore neurologiques entraînant des perturbations de l'éjaculation. Elle est souvent réalisée dans le cadre d'un bilan d'infertilité, au vu d'anomalies du sperme.

Les indications les plus fréquentes sont :

- Un faible volume de l'éjaculat
- Une absence de spermatozoïdes (azoospermie) afin de distinguer l'origine non obstructive (ANO) ou obstructive (AO) de l'anomalie
- Une vitalité notablement diminuée (nécrozoospermie)
- Une infection/inflammation génitale, avec ou sans augmentation du nombre de leucocytes (leucospermie).

Remarque

Concernant le petit volume de l'éjaculat, il est toujours nécessaire de s'assurer qu'il n'est pas la conséquence d'une éjaculation incomplète accidentelle ou de la perte d'une partie de l'éjaculat. Si la baisse du volume est confirmée, la biochimie peut mettre en évidence des anomalies sécrétoires de la prostate et/ou des vésicules séminales et/ou des épидидymes pouvant être liées à une

obstruction complète ou non du tractus génital, à l'atteinte, souvent d'origine inflammatoire, de la prostate ou des vésicules séminales, à un trouble de l'éjaculation et notamment une éjaculation rétrograde, ou encore à un déficit androgénique.

En cas d'azoospermie, il est essentiel de différencier les causes liées à un obstacle, l'absence de développement ou une involution d'une portion plus ou moins importante du tractus (AO ou azoospermie excrétoire), et les causes résultant d'un défaut de la spermatogenèse (ANO ou azoospermie sécrétoire). Le dosage des marqueurs séminaux, combiné au dosage de la FSH plasmatique est alors important (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification et origine possible des azoospermies en fonction des résultats de la biochimie séminale et du taux de FSH.

α glucosidase	Fructose	Citrate	FSH	Type d'azoospermie, causes possibles
↘	Non détectable	Normal	Normale	Obstructive : - Occlusion des canaux éjaculateurs - Agénésie des canaux déférents
↘	Normal	Normal	Normale	Obstructive : - Occlusion déférentielle et/ou épидидymaire
Normale	Normal	Normal	Normale	Obstructive au niveau du rete testis
↘	Normal	Normal	↗	Non obstructive + obstructive : - Anorchidie unilatérale avec atteinte sécrétoire controlatérale - Orchiépididymite avec séquelles testiculaires - Syndrome de Klinefelter
Normale	Normal	Normal	↗	Non obstructive

Explorations immunologiques

Le spermatozoïde est une cellule étrangère au système immunitaire du fait de la mise en place tardive de la spermatogenèse par rapport à l'acquisition de la tolérance immune aux antigènes du soi. Malgré cela, les antigènes propres aux cellules germinales post-méiotiques sont normalement tolérés par l'organisme. La barrière testiculaire isole les cellules germinales du compartiment vasculaire. Au niveau épидидymaire il existe une barrière plus faible permettant le passage éventuel de faibles quantités d'antigènes spermatiques capables de stimuler les lymphocytes T supprimeurs majoritairement présents dans ces épithéliums et d'induire ainsi une tolérance spécifique. Il existe par ailleurs, tout au long du tractus génital, des facteurs immunosupprimeurs capables de réguler localement les effecteurs du système immunitaire. Occasionnellement, l'état de tolérance immunitaire peut être rompu par des agressions physiques ou infectieuses de l'appareil génital ayant entraîné un contact anormal des spermatozoïdes avec les cellules immunocompétentes. Il y a alors production locale et systémique d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS) qui, en se fixant sur les spermatozoïdes, peuvent les empêcher d'être féconds.

Pour une large proportion d'hommes infertiles, la présence d'ACAS ne peut être liée à des antécédents traumatiques ou infectieux et seule l'agglutination spontanée des spermatozoïdes dans l'éjaculat évoque une immunisation anti-spermatozoïdes. Cette auto-agglutination reste la principale indication de la recherche d'ACAS.

La présence de taux élevés d'ACAS chez 3 à 10% des hommes consultant pour infertilité et la répercussion défavorable de ces anticorps sur la fertilité des sujets atteints sont amplement démontrées à travers la littérature. L'étendue et l'importance de l'impact fonctionnel des ACAS dépendent du taux, de la classe et de la spécificité moléculaire des anticorps présents sur les spermatozoïdes. Les techniques permettant de préciser la classe et le taux des ACAS et leur localisation à la surface des spermatozoïdes du sujet infertile semblent être des indicateurs valables de la répercussion fonctionnelle de ces anticorps, malgré une controverse récurrente sur la valeur prédictive des tests immunologiques utilisés dans la détection des ACAS.

Depuis les premières publications démontrant la présence d'anticorps spermagglutinants dans le sérum et dans le liquide séminal d'hommes infertiles, plusieurs techniques ont été proposées dans le dépistage des ACAS circulants, dont les plus couramment utilisées détectent les ACAS par leurs effets agglutinant, immobilisant ou cytotoxiques sur les spermatozoïdes témoins ou, directement, par la fixation secondaire d'anticorps anti-immunoglobulines (Igs) humaines couplés à des billes sur les anticorps portés par ces spermatozoïdes.

Recherche directe des anticorps fixes sur les spermatozoïdes éjaculés

Cette recherche est entreprise lorsque l'on suspecte une immunisation anti-spermatozoïdes (antécédents évocateurs, présence d'agglutinats, incapacité des spermatozoïdes à pénétrer normalement le mucus cervical), le seul facteur limitant étant la qualité du sperme. Deux techniques sont couramment utilisées, le MAR-test et le test aux immunobilles, les deux permettant d'objectiver les ACAS par la fixation secondaire de billes recouvertes d'Igs.

MAR-test (réaction d'agglutination mixte anti-immunoglobulines)

Des billes de latex recouvertes d'Igs humaines sont mélangées avec le sperme à tester avant d'ajouter une forte concentration d'anticorps anti-Igs. Si les spermatozoïdes sont porteurs d'anticorps, les anticorps anti-Igs en réagissant avec les Igs portées par les billes et par les spermatozoïdes vont provoquer leur agglutination mixte.

Matériel et réactifs nécessaires, confection des milieux tampon

- 1- Suspension de billes de latex (3 μ m) recouvertes d'Igs humaines de classe IgA et IgG (particules de latex de 3 μ m, Sigma I 4506 ; Igs humaines lyophilisées IgA et IgG, Sigma I 1010 et I 4506).
- 2- Sérum de lapin anti-Igs humaines (Sigma, réf. I-8010).

Milieu tampon 1 (solution glycine 0,54 M, pH 8,67)

- Prendre 1,4g de glycine
- Ajouter 0,07g de NaOH et 0,1g d'azide Na
- Ajouter 50 ml d'eau et ajuster à pH 8,6
- Compléter à 100ml avec de l'eau.

Milieu tampon 2 (solution glycine 0,054M pH : 8,6)

- Diluer au 10^{ème} le milieu tampon 1.

Milieu tampon 3 (Glycine / BSA 0,27 M, pH 8,26)

- Ajouter 20ml d'eau à 54 ml du tampon 1
- Ajuster à pH 8,2 avec du HCl 0,1M en tampon Hepes
- Ajouter 0,1g de BSA fraction V
- Compléter à 100ml avec de l'eau.

Préparation de la suspension de billes de latex

- Laver 100 μ l de la suspension de particules de latex dans 4 ml du tampon 2
- Centrifuger 5 min à 12 000 g deux fois
- Mettre en suspension le culot final dans 2 ml de tampon 2
- Ajouter 300 μ l du mélange v/v d'IgA (5 mg/ml) et d'IgG (10 mg/ml) à la suspension de billes lavées
- Incuber 30 min sous rotation à température ambiante
- Réaliser deux lavages dans 4 ml de tampon 2
- Remettre en suspension dans 2 ml de tampon 3

La préparation des particules de latex ainsi sensibilisées peut être gardée à 4°C jusqu'à six mois.

Procédure

- Sur une lame, déposer 10 μ l du sperme à tester et 10 μ l de la suspension de billes
- Bien mélanger et ajouter 10 μ l de sérum de lapin non dilué
- Recouvrir d'une lamelle 22 mm x 32 mm.

Lecture et interprétation

- Lire immédiatement au microscope (grossissement final x400, en contraste de phase),

- Estimer le pourcentage de spermatozoïdes recouverts de billes à partir de 100 spermatozoïdes mobiles observés.

On considère généralement que le résultat est significatif lorsque le pourcentage est $\geq 20\%$. Dans ce cas, la localisation majoritaire (tête, pièce intermédiaire, pièce principale) est précisée. La réalisation de ce test est simple et rapide, mais la taille des agglutinats mixtes formés peut rendre leur analyse délicate. Ce test ne permet pas de détecter spécifiquement les deux classes d'anticorps, IgA et IgG, souvent associées dans le sperme. Pour ces raisons le test aux immunobilles est souvent utilisé d'emblée lorsque des agglutinats sont présents dans le sperme (sinon secondairement à un MAR-test $\geq 20\%$).

Test aux Immunobilles (IBT)

Cette technique utilise des billes couplées à des anticorps spécifiques des différentes classes d'Igs, ce qui permet de différencier la classe des ACAS et, pour chaque classe, le taux et la localisation à la surface des spermatozoïdes. La faible quantité d'anti-Igs couplés aux billes impose l'élimination des Igs libres dans le liquide séminal ce qui alourdit la réalisation de ce test.

Réactifs nécessaires

Billes de polyacrylamide (3 à 10 μm) recouvertes d'anticorps anti-IgA, anti-IgG et anti-IgM (Irvine Scientific, réf. 15376, 15375 et 15377) à préparer selon les instructions du fabricant.

Procédure

- Centrifuger le sperme à tester à 600 g pendant 10 min
- Reprendre le culot dans 5 ml de Tyrode-BSA
- Renouveler l'étape de centrifugation
- Reprendre le culot final dans du Tyrode-BSA
- Ajuster la concentration de spermatozoïdes à 10-20 x 10⁶/ml
- Sur une lame, mélanger 10 μl de la suspension de spermatozoïdes avec 10 μl de la suspension de billes
- Recouvrir d'une lamelle 22 mm x 22 mm
- Incuber en chambre humide à la température ambiante pendant 10 min.

Lecture et interprétation

- Lire immédiatement au microscope (grossissement final x400, en contraste de phase)
- Estimer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles recouverts de billes pour chaque Ig testée et préciser la localisation à partir de 100 spermatozoïdes mobiles comptés.

On considère généralement que le résultat est significatif lorsque le pourcentage est $\geq 20\%$. Ce résultat est observé pour environ 5-10% des hommes consultant pour infertilité, les deux classes d'ACAS, IgA et IgG, étant le plus souvent associées.

Si la détection d'anticorps sur plus de 20% des spermatozoïdes mobiles est le critère de positivité retenu par l'OMS, ce n'est qu'au-delà de 50% de spermatozoïdes porteurs de billes qu'il faut envisager la responsabilité des ACAS dans l'infertilité masculine, comme le démontrent les taux significativement abaissés de grossesses lorsque le seuil de 50% et plus d'ACAS est atteint. À pourcentage identique, la présence d'IgA serait plus défavorable à la pénétration des spermatozoïdes dans le mucus cervical. Les taux de fécondation en FIV sont significativement diminués lorsqu'il y a plus de 80% de spermatozoïdes porteurs d'IgA et d'IgG. Par contre, la localisation exclusivement flagellaire des ACAS, si elle empêche la

pénétration des spermatozoïdes dans le mucus cervical et donc la fécondation *in vivo*, ne semble pas modifier les résultats de la FIV.

La conclusion que la présence d'ACAS contribue à l'infertilité du couple doit s'appuyer sur des taux significatifs sur au moins deux éjaculats différents étant donné que le taux et la répartition relative des classes d'ACAS peuvent varier dans le temps.

En cas de délai d'infécondité prolongé avec présence significative d'ACAS, le choix de l'AMP dépend du nombre de spermatozoïdes mobiles sélectionnés et du pourcentage de ceux recouverts d'anticorps, ainsi que de la localisation prédominante de ces anticorps. Si la quantité de spermatozoïdes mobiles après sélection le permet, on peut dans un premier temps réaliser quelques cycles d'IIU. En cas d'échec, le choix de la technique, FIV ou ICSI, dépend surtout de la localisation des ACAS. La présence exclusive des anticorps sur les flagelles est une indication de FIV classique quelle que soit la proportion de spermatozoïdes porteurs d'anticorps. Par contre, la présence d'anticorps sur plus de 80% des têtes spermatisques impose la réalisation d'une ICSI d'emblée. Qu'il s'agisse de FIV ou d'ICSI, il n'y a pas été observé d'impact apparent des ACAS sur le développement embryonnaire.

Recherche des ACAS dans les liquides biologiques par le test indirect aux immunobilles (IBTi)

Si la recherche des anticorps fixés sur les spermatozoïdes éjaculés fournit les renseignements utiles pour le pronostic, la recherche des ACAS dans le sang et dans le liquide séminal permet de mieux cerner l'importance du processus immunitaire. La recherche des ACAS circulants s'impose d'emblée quand le nombre et la mobilité des spermatozoïdes ne permettent pas la réalisation des tests directs. La recherche des ACAS dans les liquides biologiques se fait après transfert passif de ces anticorps sur des spermatozoïdes mobiles provenant de donneurs fertiles par des techniques diverses, dont la spermagglutination et la spermimmobilisation ont été les plus couramment utilisées jusqu'à l'avènement des immunobilles. Si un effort de standardisation et d'évaluation fait par l'OMS a permis de définir les titres cliniquement significatifs pour les deux premières techniques, l'utilisation des immunobilles en technique indirecte (IBTi) n'a pas été l'objet d'une standardisation valable. Dans la plupart des études publiées, les dilutions limite causant la fixation des immunobilles sur environ 50% des spermatozoïdes témoins (titre) n'ont pas été déterminées et, pour les faibles dilutions utilisées (1:2 à 1:10) les résultats positifs n'ont pas été validés par rapport à des populations témoins fertiles. Comme les techniques microscopiques de spermagglutination, l'IBTi permet aussi d'analyser le lieu de fixation des ACAS circulants sur les spermatozoïdes.

Préparation

Sang :

- Centrifuger un prélèvement de sang (prélevé sur tube sec) 10 min à 1500 g
- Décanter le sérum
- Chauffer à 56°C pendant 60 min.

Liquide séminal :

- Centrifuger l'échantillon de sperme 5 min à 12 000 g
- Récupérer le plasma séminal (surnageant)
- Chauffer à 56°C pendant 60 min.

Spermatozoïdes :

- Sélectionner les spermatozoïdes témoins provenant de donneurs fertiles par la méthode de centrifugation sur gradient de densité ([Chapitre VI](#))
- Resuspendre les spermatozoïdes récupérés de la fraction 90% après deux lavages dans un milieu Tyrode-BSA ou équivalent
- Ajuster la concentration finale à $20 \times 10^6/\text{ml}$

Immunobilles :

- La préparation des immunobilles est effectuée comme dans le test direct aux immunobilles ([voir plus haut](#)).

Procédure

- Mélanger 50 μl de la suspension de spermatozoïdes témoins avec 100 μl des dilutions successives du sérum (à partir de 1:10) ou du liquide séminal (à partir de 1:2) dans du Tyrode-BSA ou milieu équivalent
- Incuber à 37°C pendant 1h
- Laver les spermatozoïdes deux fois dans 1 ml de Tyrode-BSA ou milieu équivalent
- Remettre les spermatozoïdes en suspension dans 100 μl de milieu
- Tester les spermatozoïdes avec les immunobilles comme précédemment décrit pour le test direct
- Déterminer la dilution contenant environ 50% de spermatozoïdes recouverts de billes : cette dilution représente le titre des ACAS dans le sérum ou dans le liquide séminal.

Remarque

Dans l'idéal afin de disposer d'un contrôle interne, il faut inclure des témoins positifs et négatifs connus dans chaque batterie de tests.

Résultats (travaux principalement de M. de Almeida)

Dans les populations d'hommes infertiles non sélectionnés, la fréquence de résultats positifs en IBTi est de l'ordre de 20% dans le sérum dilué 1:4 et de 10% dans le liquide séminal dilué 1:2. Dans des populations d'hommes sélectionnées en fonction d'antécédents uro-génitaux et/ou d'une auto-agglutination spermatique la fréquence de résultats positifs est de l'ordre de 50% dans le sérum dilué 1:4 ou 1:10 et dans le liquide séminal dilué 1:2. Dans le sérum, les ACAS sont le plus souvent des IgG, avec des titres pouvant aller au-delà de 5000, associés dans environ 15% des cas à des ACAS de classe IgA (titres généralement inférieur à 500) et très rarement à des IgM à la limite de la détection pour la dilution 1:10. Dans les liquides séminaux, l'association des deux classes d'ACAS est fréquente avec des titres pouvant atteindre 500, pour IgA et pour IgG.

Bibliographie

- Chamley LW, Clarke GN. (2007) Antisperm antibodies and conception. *Semin Immunopathol.* 29, 169-184.
- Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. (2007) Naturally-occurring antisperm antibodies in men : interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci.* 12, 2890-2911.
- de Almeida M. (1993) Male infertility of immunologic origin and its treatment. *Rev Prat.* 43, 956-959.

Recherche et caractérisation d'une éjaculation rétrograde

L'éjaculation rétrograde est la conséquence de la fermeture incomplète du col vésical quand se forme la chambre de pression au niveau de l'urètre prostatique au cours du processus éjaculatoire. Tout ou partie du sperme est alors expulsé vers la vessie plutôt que vers l'urètre pénien et l'extérieur. L'éjaculation rétrograde est rare chez les hommes consultant pour infertilité mais lorsqu'elle existe, il est important d'en faire le diagnostic dans la mesure où cette infertilité peut être corrigée relativement facilement grâce à des procédures biologiques adaptées. Le défaut de fermeture du col vésical est dû soit à une lésion anatomique congénitale ou post-chirurgicale soit à une lésion nerveuse. La cause la plus fréquente est la chirurgie prostatique, trans-urétrale ou non, mais celle-ci est réalisée chez des hommes ayant atteint un âge auquel en général, ils ne souhaitent plus avoir d'enfant.

Les causes trouvées chez les hommes infertiles sont indiquées dans le [Tableau 1](#). A partir d'une synthèse de 76 articles rapportant une éjaculation rétrograde chez 205 patients infertiles, les causes les plus fréquemment trouvées sont les curages ganglionnaires rétro-péritonéaux (42,4%), les neuropathies diabétiques (14,6%) et la chirurgie du col vésical (5,9%). Dans près de 20% des cas, aucun antécédent n'est retrouvé.

Tableau 1 : Causes de l'éjaculation rétrograde

<p>Lésions du col de la vessie et de l'urètre prostatique</p> <ul style="list-style-type: none">- Malformation congénitale du col vésical ou des orifices des canaux éjaculateurs- Chirurgie au niveau du col vésical- Prostatectomie <p>Déficit neurologique</p> <ul style="list-style-type: none">- Neuropathie diabétique- Cure ganglionnaire rétropéritonéale- Chirurgie de la région colo-rectale ou aorto-iliaque- Lésions médullaire, sclérose en plaque- Traitement médicamenteux alpha bloquant <p>Idiopathique</p>

Le diagnostic est simple. Il est suspecté devant une absence d'éjaculation (aspermie) avec orgasme, surtout s'il y a des antécédents évocateurs. Il suffit d'analyser les urines recueillies après une masturbation ou un rapport sexuel. La présence de nombreux spermatozoïdes dans l'urine signe l'éjaculation rétrograde. Un volume très faible de sperme observé de manière répétée peut être le reflet d'une éjaculation partiellement rétrograde et justifie aussi l'examen des urines. En l'absence de lésion anatomique, un traitement à base d'agonistes alpha, d'anticholinergiques, traitement par l'imipramine à 25m-75 mg/j, par exemple, ou d'antihistaminiques peut être entrepris : il pourrait rétablir une éjaculation antégrade dans environ 50% des cas. Une étude a indiqué que de tels traitements ont abouti à des

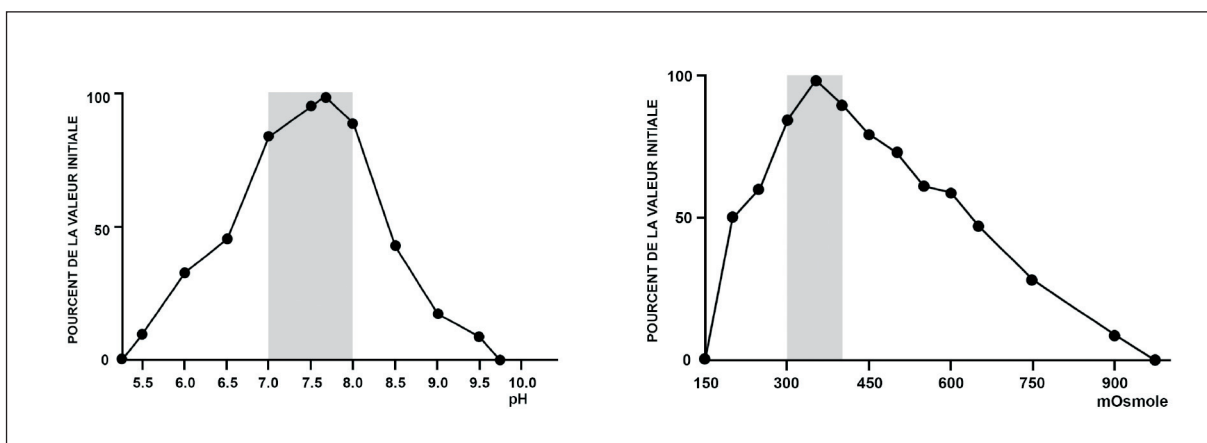
grossesses naturelles chez environ un tiers des patients traités.

Une autre approche consiste à recueillir les spermatozoïdes dans les urines et de les utiliser par une technique d'AMP. Dans un premier temps, il a été proposé de cathériser la vessie pour récupérer les spermatozoïdes mais il est beaucoup plus simple de les recueillir dans l'urine émise immédiatement après une masturbation ou un rapport sexuel.

Recherche et préparation en vue d'AMP des spermatozoïdes recueillis dans les urines

Comme le montre l'incubation des spermatozoïdes dans des milieux de pH et d'osmolarité variable, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles diminue considérablement après une heure quand le pH et/ou l'osmolarité sont trop faibles ou trop élevés. Les meilleurs résultats sont obtenus quand le pH est compris entre 7 et 8 et l'osmolarité entre 300 et 400 milli-osmoles (Figure 1).

Figure 1 : Modifications du pourcentage de spermatozoïdes mobiles après 1 heure d'incubation en fonction du pH et de l'osmolarité du milieu. Les valeurs indiquées sont relatives au pourcentage initial de spermatozoïdes mobiles. Les zones grisées indiquent les valeurs optimales de pH et d'osmolarité pour le maintien de la mobilité des spermatozoïdes (d'après Makler et al, 1981)



Préparation dans le but d'alcaliniser et de diluer les urines

En prévision du test et d'éventuelle préparation des urines, il convient d'alcaliniser et de diluer les urines avant de recueillir les spermatozoïdes :

- Prescrire la prise d'une cuillère à café de bicarbonate de soude (environ 5 g) la veille au soir et le matin du rendez-vous au laboratoire
- Demander au patient de boire un litre d'eau plate dans les 2 heures précédant l'heure du rendez-vous pour le prélèvement.

Procédure

Lorsque le patient arrive au laboratoire :

- Contrôler le pH et l'osmolarité sur un peu d'urine avant que le patient ne se masturbe et faire les ajustements du pH et de l'osmolarité si nécessaire en fonction des valeurs trouvées (prise de

bicarbonate de soude et/ou d'eau) ; attendre environ 15 min ; une autre possibilité pour « tamponner » le prélèvement consiste à déposer quelques millilitres de milieu de culture (type milieu capacitant) dans le tube où sera recueillie l'urine.

Demander au patient :

- de pratiquer la masturbation debout vessie pleine (la pression exercée sur la vessie et le col vésical peut quelquefois être suffisante pour qu'une partie du sperme soit émis en antégrade),
- de pratiquer une miction fractionnée : en pratique, il s'agit de récupérer les 10 à 15 premiers millilitres d'urines dans un réceptacle de recueil de sperme et de collecter le reste des urines dans un verre à pied.

Centrifuger la première fraction à 600 g pendant 10 min.

Resuspendre le culot dans le milieu d'insémination.

Observer au microscope et réaliser un spermogramme-spermocytogramme ([Chapitre III](#)).

Remarques

En général, la première fraction des urines contient le sperme qui n'a pas encore eu le temps de diffuser dans l'urine à l'intérieur de la vessie. La présence de sperme dans les urines est alors visible à l'œil nu comme une masse floconneuse.

Si aucun spermatozoïde n'est observé dans la première fraction, répéter l'observation sur la seconde fraction préalablement concentrée : très exceptionnellement on y retrouve des spermatozoïdes. Si aucun spermatozoïde n'est observé dans les deux fractions, soit, l'homme a par ailleurs une azoospermie, soit, il s'agit d'une anéjaculation qui est assez fréquente en cas de neuropathie. Indépendamment des informations apportées par l'examen clinique ou les dosages hormonaux, le diagnostic différentiel peut alors être fait par le dosage du fructose dans les urines ([Chapitre IV](#)). Ce sucre n'est normalement jamais présent dans les urines, sa présence indiquant que des sécrétions séminales ont été émises est en faveur d'une azoospermie.

Dans le cas le plus fréquent où des spermatozoïdes sont retrouvés dans la première fraction, leur quantité et leur qualité sont souvent suffisantes pour faire de simples IIU mais aussi pour réaliser une congélation en vue d'IIU (ou de FIV) ultérieures si nécessaire.

Bibliographie

- Kamischke A et Nieschlag E. (2002) Update on medical treatment of ejaculatory disorders, Int. J. Androl., 25, 333-344.
- Jouannet P et Soumah A, Ejaculation rétrograde et fertilité, dans « L'éjaculation et ses perturbations » J Buvat et P Jouannet édts, pp 62-68, SIMEP, Lyon 1984.
- Makler A, David R, Blumenfeld Z et Better OS, Factors affecting sperm motility, VII : Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. Fertil. Steril., 1981, 36, 507-511.

**Méthodologie (3) :
autres tests évaluant
structures et fonctions
des spermatozoïdes**

Microscopie électronique à transmission des spermatozoïdes

L'analyse morphologique des spermatozoïdes en microscopie optique est limitée par le pouvoir de résolution de la technique et par le fait que l'on évalue le plus souvent la morphologie à partir de frottis et non de coupes. Si un observateur très exercé à partir de frottis étalés et colorés de manière optimale peut déceler ou suspecter des anomalies extrêmement fines (par exemple des anomalies du calibre du flagelle faisant suspecter des anomalies du périaxonème), seule la microscopie électronique à transmission (TEM) se fondant sur l'observation de coupes dans un intervalle de grossissements de x10 000 à x100 000 et plus, permettra d'étudier des détails aussi fins que les membranes, la texture de la chromatine ou de l'acrosome, le cytosquelette, la nature de la connexion tête/flagelle ou encore, la constitution microtubulaire de l'axonème.

À l'échelle de la TEM, il est possible d'apprécier la morphologie des différents constituants subcellulaires impliqués dans l'expression du potentiel fécondant et parfois de porter un diagnostic sur l'origine ultrastructurale par exemple d'un défaut de mobilité ou d'une absence de mobilité avec vitalité conservée. Cependant, l'analyse est limitée par le fait qu'aucun spermatozoïde ne peut être observé dans son intégrité, l'anisotropie de la tête et la taille réduite du flagelle (une analyse approfondie des structures flagellaires en coupe nécessite des grossissements supérieurs à x100 000) favorisant très majoritairement les incidences de coupe transversales (têtes « de profil » et coupes plus ou moins transversales de flagelle). L'analyse TEM des spermatozoïdes humains révèle une variabilité morphologique extraordinaire y compris chez des hommes féconds ayant des spermatozoïdes qualifiés de typiques en microscopie optique. L'observation des spermatozoïdes en TEM confirme également le caractère associé des atypies pour l'immense majorité des (portions de) spermatozoïdes observé(e)s.

Il est ainsi apparu nécessaire de recenser la fréquence des différentes atypies sur un nombre suffisant de spermatozoïdes, en référence à ce qui est trouvé chez des hommes féconds servant en quelque sorte de témoins permettant aussi de distinguer de simples variants morphologiques d'anomalies ultrastructurales franches.

L'examen des spermatozoïdes humains en TEM, en dehors de l'intérêt majeur de la technique pour des études fondamentales (d'autant que cette approche peut être étendue à des aspects de l'immunocytochimie avec par exemple la technique à l'or colloïdal), est un test complémentaire très utile dans les démarches diagnostiques des infertilités du couple dans un nombre relativement limité d'indications, principalement lorsque sont suspectées des dyskinésies flagellaires d'origine structurale ([Chapitre V](#)). Elle peut être éventuellement proposée dans le but de préciser chez des hommes inféconds certaines anomalies morphologiques qui dans des situations rares touchent une majorité de spermatozoïdes, par exemple la globozoospermie ([Chapitre III](#)) ou les spermatozoïdes tête d'épingle pour lesquels on ne sait s'il existe du matériel nucléaire. Concernant les anomalies du flagelle, c'est le caractère majoritaire de l'anomalie qualitative et un faisceau d'arguments qui amènera à proposer l'examen en microscopie électronique, par exemple, moins de 5% de spermatozoïdes mobiles, voire 0%, sur des examens répétés avec vitalité conservée et notion d'un long délai d'infécondité. Il peut s'agir d'anomalies du périaxonème avec des phénotypes variés. Il peut s'agir d'anomalies touchant l'axonème. Dans ce cas, on peut retrouver chez 10 à 20% des patients des pathologies du tractus respiratoire, chez le patient lui-même et/ou dans la famille du fait de l'organisation ultrastructurale similaire des cils et des flagelles mettant en jeu des gènes communs à l'édification des deux structures. Le caractère familial, la

consanguinité ou le fait d'observer certaines des anomalies dans des populations d'origine géographique déterminée suggèrent l'origine génétique des défauts flagellaires. Aussi, en dépit des connaissances actuelles encore limitées, un conseil génétique sur la possibilité éventuelle de transmission du phénotype anormal à la descendance doit être délivrée au couple demandeur d'une ICSI lorsque quelques spermatozoïdes ne semblant pas présenter le défaut sont utilisables. D'après la littérature, les résultats de l'ICSI avec de tels spermatozoïdes semblent moins bons que ceux de l'ICSI en général.

Au total, la microscopie électronique des spermatozoïdes est un outil diagnostique puissant pour la compréhension de certaines infertilités du couple. Elle pourrait certainement constituer un outil pronostique intéressant lors de la prise en charge de certains couples infertiles en ICSI. Malheureusement, la lourdeur de sa mise en œuvre réservée à des laboratoires ultra-spécialisés et aussi d'autres facteurs comme le nombre de spermatozoïdes nécessaires en limitent considérablement l'usage dans le champ de la médecine et de la biologie de la reproduction.

Remarque

Une autre approche pour l'évaluation morphologique fine des spermatozoïdes humains, la technique microscopique MSOME (motile sperm organelle morphology examination) récemment décrite et pratiquée pour l'instant dans le cadre de l'ICSI sur spermatozoïdes vivants et mobiles avec des niveaux de grossissement final entre x5 000 et x10 000 offre la possibilité d'une visualisation pseudo tridimensionnelle très détaillée des compartiments sub-cellulaires spermatiques (il ne s'agit donc pas de coupes comme en TEM). Cette technique relativement simple à mettre en œuvre pourrait dans les années à venir constituer un outil intéressant à mi-chemin entre microscopie optique conventionnelle et TEM pour une meilleure caractérisation de la morphologie spermatique.

Bibliographie

- Zamboni L. (1987). The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility : the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril.* 48, 711-734.
- Chemes EH, Rawe YV. (2003). Sperm pathology : a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* 9, 405-428.
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. (2005) The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod.* 20, 185-190.

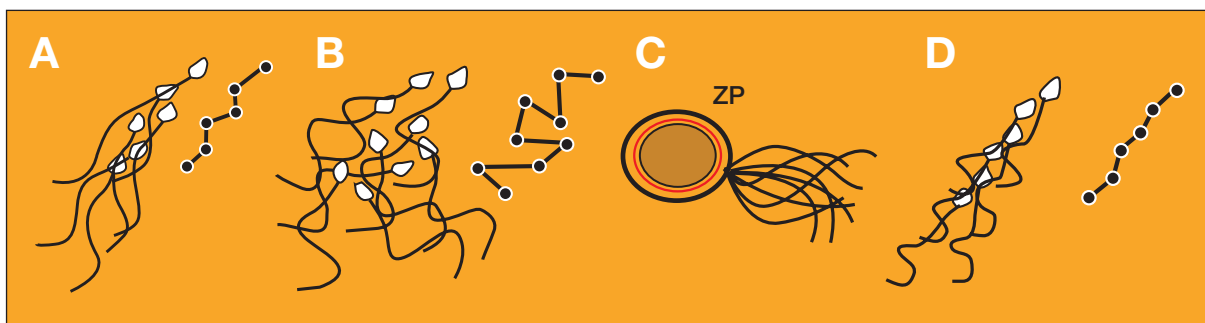
Analyse objective de la mobilité et du mouvement des spermatozoïdes

Le mouvement spermatique résulte de la propagation d'ondes successives le long du flagelle depuis la base de la tête vers son extrémité. Dans le plasma séminal, l'alternance de propagation d'ondes flagellaires et de rotations cellulaires impose à la tête du spermatozoïde un mouvement d'oscillation de part et d'autre de son axe de progression. Ce mouvement se modifie en fonction des propriétés physicochimiques des différents micro-environnements rencontrés (Figure 1). L'expression du potentiel fécondant des spermatozoïdes présents dans le sperme dépend : 1) de leur aptitude à se déplacer de manière active et efficace (aspect qualitatif) dans le tractus génital féminin principalement au travers du mucus cervical ovulatoire et au travers des enveloppes de l'ovocyte et, 2) du nombre de spermatozoïdes mobiles (aspect quantitatif).

L'analyse visuelle de différentes caractéristiques du sperme au microscope est subjective par nature et l'évaluation précise et reproductible du pourcentage de spermatozoïdes mobiles (mobilité, aspect quantitatif) est l'une des étapes les plus délicates de l'analyse du sperme. Plus encore, l'œil et le système de la vision ne permettent la mesure et donc ne sont pas aptes à une évaluation des caractéristiques du mouvement, vitesse et caractéristiques de trajectoires (aspect qualitatif). En dépit de cela, l'observation méticuleuse du mouvement des spermatozoïdes en routine, qu'il s'agisse de spermés natifs ou de préparations de spermatozoïdes resuspendus dans un milieu capacitant, fait parfois suspecter une anomalie qualitative du mouvement.

Pour tenter de pallier au caractère imprécis et/ou subjectif de l'analyse manuelle du sperme et notamment de la mobilité et des caractéristiques du mouvement, différentes approches objectives ont été proposées. La majorité d'entre elles repose sur l'analyse de phénomènes optiques. En effet la lumière porte en elle toutes les informations sur les causes qui l'ont produite. Ainsi, lorsqu'on éclaire une suspension de particules, les caractéristiques de la lumière qui est transmise, absorbée ou diffusée, dépendent du nombre de particules, de leur forme, de leur taille et de leur déplacement. Les différentes méthodes développées pour l'évaluation objective de la mobilité des spermatozoïdes se partagent en méthodes recourant ou ne recourant pas au microscope (méthodes respectivement qualifiées de méthodes directes ou de méthodes indirectes).

Figure 1 : Différences de battement flagellaire et trajectoire résultante de la tête du spermatozoïde selon son microenvironnement, dans le plasma seminal (A), dans un milieu capacitant (B), lors de l'interaction avec la zone pellucide (C) et dans le mucus cervical (D).

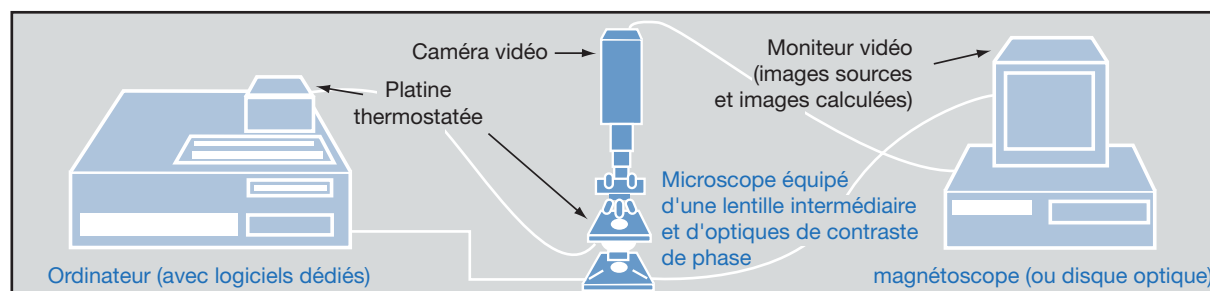


Les méthodes indirectes reposent sur des principes physiques. Elles estiment, entre autres paramètres la vitesse moyenne sur l'ensemble d'une suspension de spermatozoïdes. Par exemple, dans les méthodes basées sur des principes de spectrophotométrie, la vitesse moyenne calculée est liée aux changements de densité optique de la suspension. Ces méthodes sont rapides et automatisables, mais elles souffrent de ne fournir aucun renseignement sur les caractéristiques individuelles des spermatozoïdes. Du fait de la grande hétérogénéité du sperme humain, elles ont peu été utilisées dans l'espèce humaine. Il faut cependant noter qu'il existe sur le marché des appareils fondés sur ces principes pour analyser concentration et mobilité globale des spermatozoïdes de manière précise et reproductible. Les méthodes directes permettent surtout la mesure de paramètres du mouvement fondés sur la cinématique des têtes des spermatozoïdes résultant de la dynamique flagellaire (Figure 1). Cette mesure présente, comme l'ont montré différents travaux, une valeur diagnostique et pronostique dans les situations d'infertilité masculine lors d'évaluations *in vivo* et *in vitro*.

Les systèmes CASA

Au cours des deux dernières décennies, les technologies de vidéo et d'analyse d'image par ordinateur ont permis le développement et la commercialisation de nouveaux appareils capables de reconnaître individuellement les spermatozoïdes, de suivre leur déplacement et donc de calculer des paramètres caractérisant leur cinématique, c'est à dire, la géométrie de leurs mouvements, en fonction du temps (Figure 2). Grâce à leurs possibilités de mesures en temps réel et leur simplicité relative d'emploi, ces systèmes - usuellement qualifiés de systèmes CASA pour Computer-Aided Sperm Analysis - se sont imposés par rapport à des techniques plus anciennes et plus lourdes dédiées uniquement à l'analyse du mouvement telles la microphotographie ou la microcinématographie. Il faut souligner qu'au delà de l'analyse de la mobilité et du mouvement, et selon leur principe de fonctionnement, ces systèmes sont en mesure d'analyser d'autres caractéristiques, par exemple la concentration, recourant ou non à une sonde fluorescente, ou encore, la morphométrie et la densitométrie des têtes des spermatozoïdes. À ce jour, il est considéré que l'atout principal des systèmes CASA pour le laboratoire de biologie de la reproduction est l'analyse semie-automatisée de la mobilité et du mouvement des spermatozoïdes. Utilisés de façon adéquate, des résultats comparables entre laboratoires peuvent être obtenus. En dehors des applications de recherche (ou en toxicologie), les systèmes CASA contribuent (dans un nombre limité de cas rares) au diagnostic de dyskinesies flagellaires. Les progrès constants des technologies microscopiques, vidéo et informatique, l'abaissement de leur coût et le fait que de nombreux tests d'évaluation des spermatozoïdes sont fondés sur le microscope font que ce type d'approche devrait de plus en plus trouver sa place en biologie de la reproduction.

Figure 2 : Configuration d'un système de microvidéographie assistée par ordinateur (couramment appelé système CASA pour Computer Aided Sperm Analysis) pour l'analyse du mouvement (et éventuellement d'autres caractéristiques) des spermatozoïdes.



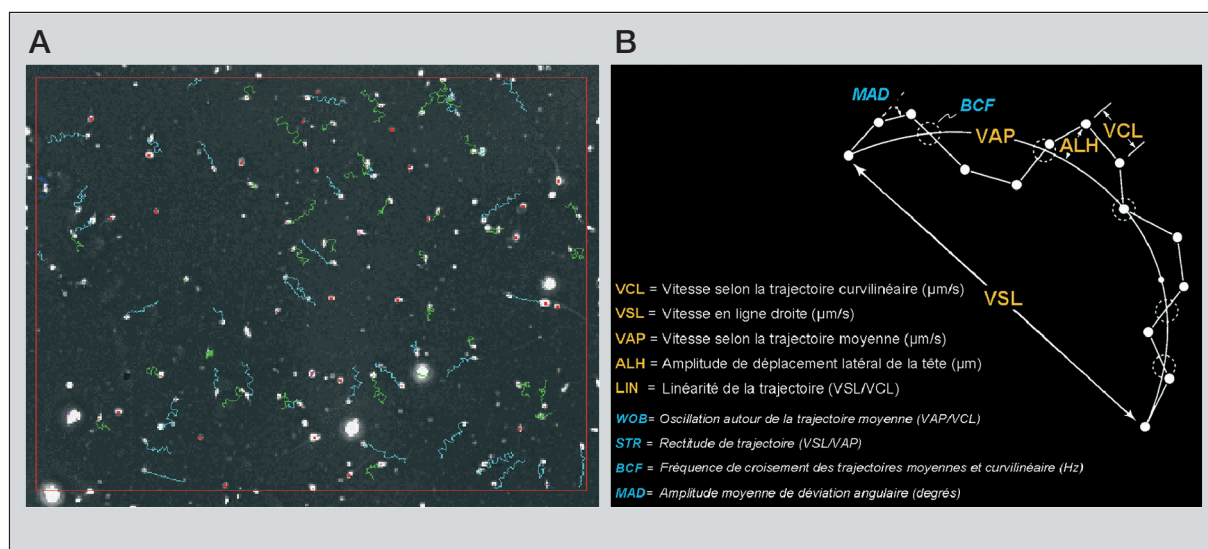
Remarque

Il existe à ce jour plusieurs options matérielles et logicielles commercialisées, du simple logiciel dédié à une analyse précise comme celle des paramètres du mouvement (il faut donc dans ce cas disposer du reste de la chaîne matérielle, ordinateur, caméra, microscope, etc...) à des systèmes compacts incluant tous les composants (microscopie, vidéo, matériel et logiciel informatique dédié) et proposant différents tests fondés sur l'analyse microscopique d'image en dehors de l'analyse du mouvement.

Principe de l'analyse

Une fois l'échantillon en place, une image en contraste de phase du champ contenant les différentes cellules à analyser est formée, restituée sur le moniteur, numérisée puis binarisée afin de ne traiter par la suite que les éléments d'intérêt de l'image en l'occurrence, les têtes des spermatozoïdes à partir desquelles les trajectoires seront reconstruites. Une précalibration des tailles minimum et maximum des têtes des spermatozoïdes permet d'éliminer d'emblée des débris (taille inférieure) ou d'autres cellules (taille supérieure) présents dans la préparation et pouvant présenter la même brillance que la tête d'un spermatozoïde. Lors de la saisie et de l'analyse, le logiciel dédié calcule en temps réel les coordonnées en X et en Y du centre de gravité de chacune des têtes (centroïde) de spermatozoïdes présentes dans le champ et renouvelle l'opération à la fréquence d'acquisition des images, en général, 50 ou 60 Hz. Ces coordonnées sont séquentiellement accumulées en mémoire. L'opération est répétée sur plusieurs champs afin de tenir compte d'une éventuelle hétérogénéité d'un champ à l'autre et de disposer d'un nombre suffisant de spermatozoïdes analysés. Lors de l'étape finale, le logiciel reconstruit les trajectoires (Figure 3A) à partir desquelles, il calcule un ensemble de caractéristiques cinématiques qui ont fait l'objet d'une standardisation (Figure 3B). L'ensemble des données ainsi acquises permet de disposer de paramètres du mouvement spermatozoïde par spermatozoïde permettant d'afficher les distributions (histogramme) pour chacun des paramètres et de fournir les valeurs moyennes et écart-types.

Figure 3 : Trajectoires reconstituées de spermatozoïdes humains sur le moniteur d'un système CASA* (A), Nomenclature et définition des caractéristiques de vitesse et de forme de trajectoires mesurées (B).**



*Ecran d'un système IVOS Hamilton-Thorn ; ** Nomenclature OMS

Limites de la technique et recommandations

Il ne s'agit en aucun cas d'une analyse automatisée. Aussi la fiabilité des résultats dépend en premier lieu de la maîtrise du système par son utilisateur, de son réglage optimal qui doit être périodiquement contrôlé à l'aide de bandes vidéo de contrôle et/ou d'un pool de paillettes congelées conservées à cet effet. En dehors de cela, un certain nombre de facteurs, inhérents au système d'analyse ou dépendants des conditions de l'analyse, peuvent influencer les résultats de l'étude. Par exemple, la valeur du seuil de détection appliqué a une répercussion sur la détection des spermatozoïdes: celle-ci sera sous-estimée avec un seuil trop bas ou surestimée avec un seuil trop élevé. La fréquence d'acquisition affecte certains paramètres comme ALH ou VCL : trop peu d'images acquises par unité de temps revient à lisser les trajectoires. Par ailleurs, le choix du facteur de lissage des trajectoires est important pour le calcul de VAP et ALH : plus il est élevé, plus la trajectoire est lissée. Les conditions d'analyse doivent être parfaitement contrôlées. Ainsi, par exemple, la valeur des paramètres de vitesse augmente en fonction de la température et/ou d'une diminution de la viscosité du milieu environnant. La dilution ou le remplacement du plasma séminal par un milieu synthétique salin aura tendance à augmenter les valeurs des vitesses. Une chambre d'observation insuffisamment profonde, (< 20 µm pour un sperme natif) contraint le mouvement tridimensionnel des spermatozoïdes. Pour toutes ces raisons, il est indispensable de standardiser l'analyse du mouvement en respectant certaines recommandations ayant fait l'objet de consensus (OMS, ESHRE, etc...).

Procédures recommandées *(valables quel que soit le système CASA utilisé)*

- Collecter les spermatozoïdes au laboratoire et les maintenir à 37°C jusqu'à l'analyse
- S'assurer du bon réglage des optiques du système CASA
- Choisir la calibration adaptée à la situation compte tenu des caractéristiques du mouvement variables des spermatozoïdes selon les milieux (sperme frais, spermatozoïdes après sélection, etc... ; en général le constructeur propose des calibrations pour les situations d'analyse les plus courantes)
- Attendre la liquéfaction complète et faire l'analyse dans l'heure qui suit le prélèvement
- Pour des spermatozoïdes préparés par migration ascendante ou gradient de densité, faire l'analyse au minimum 1/2 h après la sélection
- Déposer 5 µl de l'échantillon dans une chambre à usage unique (préchauffée à 37°C) permettant une épaisseur calibrée de la préparation (telle que cellule Leja, microcell, etc...)
- S'assurer que la chambre d'analyse, la platine thermostatée sont bien à 37°C au moment de l'analyse
- Analyser au minimum 100 spermatozoïdes mobiles, si possible 200, répartis sur plusieurs champs (si la concentration est faible ou si la mobilité est basse, un grand nombre de champs sera nécessaire)
- Préférer l'analyse à partir d'un support enregistré plutôt qu'à l'état frais : il est souvent utile de pouvoir ultérieurement revenir à la saisie d'image pour par exemple contrôler la validité de l'analyse
- Conserver les données individuelles (spermatozoïde par spermatozoïde)
- Si des tests statistiques doivent être faits, utiliser de préférence des tests non paramétriques du fait de la distribution non normale de plusieurs des caractéristiques du mouvement.

Il n'existe pas de valeurs de référence absolues des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes, les difficultés étant les mêmes que celles concernant les caractéristiques usuelles du sperme ([Annexe 5](#)). Cependant diverses études ont indiqué des valeurs relatives au delà desquelles il existe possiblement une anomalie structurale et ou fonctionnelle des flagelles et/ou des chances réduites voire nulles de conception naturelle mais parfois aussi en IIU ou en FIV et ce d'autant plus qu'un nombre important de spermatozoïdes présente des anomalies du mouvement.

Indications du test, valeur diagnostique et pronostique des paramètres du mouvement

Il faut tout d'abord noter qu'en France, ce test n'est pas à la nomenclature (il a récemment été proposé en BHR, [Annexe 8](#)). Dans le cadre du bilan spermologique effectué pour diagnostiquer les causes d'une infertilité, l'analyse du mouvement n'est pas demandée en première intention. C'est souvent l'observation de la mobilité au microscope optique au cours d'un spermogramme qui « alerte » l'observateur et suscite la demande d'un tel examen.

Les anomalies du mouvement sont loin d'être toutes répertoriées. À ce jour sont bien caractérisées deux dyskinésies d'origine structurale, touchant les structures axonémales ou périaxonémales du flagelle. La première est liée à un défaut au niveau de l'axonème : il s'agit de l'absence de bras externe de dynéine. Cette pathologie se caractérise par un mouvement spermatique très lent (VSL, VCL diminuées de moitié par rapport à des valeurs contrôles) sans modification majeure de la courbure flagellaire. La migration des spermatozoïdes dans le mucus cervical est nulle, pauvre ou retardée et le taux de fécondation *in vitro* est faible alors que les spermatozoïdes sont capables de pénétrer les ovocytes dépellucidés de Hamster et donner des grossesses par ICSI. La deuxième dyskinésie connue est liée à des anomalies du périaxonème : il s'agit des spermatozoïdes dits glissants. Les structures périaxonémales maldisposées contraignent la courbure flagellaire qui ne peut s'accroître. Ainsi l'amplitude du mouvement de la tête est faible (très faible ALH : lorsque ALH est inférieur à 2 µm, le spermatozoïde est incapable de pénétrer un mucus cervical ovulatoire) et la fréquence de rotation cellulaire est basse : le spermatozoïde donne l'impression de glisser dans le milieu alors qu'il progresse normalement (VSL normale). Ces spermatozoïdes incapables de pénétrer le mucus cervical et la zone pellucide peuvent dans une certaine mesure pénétrer les ovocytes dépellucidés de hamster (25% de fécondation) et donner des grossesses par ICSI. Dans les deux dyskinésies décrites, si l'anomalie concerne tous les spermatozoïdes mobiles, les hommes sont inféconds, souvent depuis de très nombreuses années, l'anomalie n'ayant souvent pas été mise en évidence lors de spermogrammes considérés comme normaux ou subnormaux. Dans ces situations, l'analyse du mouvement doit être complétée par un examen en TEM des structures flagellaires pour confirmer l'origine ultrastructurale du déficit fonctionnel.

Lorsque le sperme est incubé dans un milieu « capacitant » après sélection par migration ascendante ou gradient de densité, il est naturel qu'une fraction de la population (10-20%) exprime le mouvement dit hyperactif ([Chapitre I](#)). Celui-ci se caractérise par une faible linéarité (LIN < 65%) une large amplitude de la tête (ALH > 7,5 - 8 µm) balayant très rapidement l'espace (VCL >100 µm/s). L'absence de cette sous population a fait évoquer le rôle possible de plusieurs facteurs de régulation du mouvement.

La valeur pronostique des paramètres du mouvement a été recherchée lors d'études reliant les caractéristiques du mouvement spermatique analysées par CASA à l'établissement de grossesses obtenues *in vivo* ou après FIV, en l'absence de tout facteur d'infertilité féminine. Dans une étude récente, il a été montré que le taux de grossesse naturelle était relié au paramètre VSL, la relation étant continue, sans valeur seuil. D'autres études en FIV font aussi ressortir des corrélations positives entre le taux de fécondation et les paramètres ALH, VSL, VAP, VCL.

Bibliographie

- Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD and Baker HWG (2003) Automated semen analysis : « zona pellucida-preferred » sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. Hum. Reprod. 18, 1643- 1649.
- Jouannet P et Serres C (1995) Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. Médecine Sciences 11, 555- 562.
- ESHRE Andrology Special Interest Group (1998) Guidelines on the application of CASA methodology in the analysis of spermatozoa. Hum Reprod 13, 142-145.

Etude de la fixation des spermatozoïdes à la ZP

Les tests *in vitro* de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide ont été développés dans le but 1) d'estimer le pouvoir de fixation des spermatozoïdes d'un patient comparativement à des spermatozoïdes d'un homme fécond, 2) de déterminer un indice de fécondation pronostique pour la FIV, 3) d'étudier une relation entre les caractéristiques spermatiques habituelles et la fixation des spermatozoïdes à la ZP et 4) d'étudier (principalement en recherche) des récepteurs spermatiques et leurs ligands pellucidaire.

Description des tests

Deux types de tests de fixation des spermatozoïdes ont été proposés :

1. Un test de fixation croisé fondé sur l'incubation des spermatozoïdes d'un patient et d'un donneur fertile, marqués avec des fluorochromes différents (FITC et TRITC, par exemple) avec un ovocyte entier dans les conditions de la FIV (Competitive sperm-zona binding test)
2. Un test d'incubation, dans les conditions de la FIV, des spermatozoïdes du patient et d'un donneur fertile avec chacun une moitié d'une même zone pellucide (ZP) (Hemi-Zona-Assay ou HZA).

Remarque

Ce type de test ne pourra être réalisé que par une minorité de laboratoires, laboratoires associés ou collaborant avec un centre d'AMP pratiquant la FIV. Il semblerait que le meilleur matériel expérimental soit représenté par les ovocytes non inséminés, puis par des ovocytes inséminés et non fécondés parmi une cohorte où le taux de clivage est > 50%. Les ovocytes après ICSI peuvent également être utilisés, la décoronisation dans la hyaluronidase ne leur faisant pas perdre leur potentiel de fixation.

Conditions de conservation des ovocytes

Les ovocytes en métaphase II (MII) non fécondés en FIV conventionnelle peuvent être utilisés pour des tests de fixation à la ZP, après avoir obtenu le consentement des patients pour la recherche.

Modes opératoires

- Les ovocytes peuvent être congelés. Ils sont tout d'abord incubés 3 min à température ambiante dans une solution de PBS contenant du DMSO (3,5 M), du sucrose (0,25 M) et du sérum humain à 20% et plongés directement dans l'azote liquide. La conservation peut être supérieure à 1 an.
- Les ovocytes peuvent également être conservés dans des solutions hypersalines à 4°C pendant plusieurs semaines, soit la solution composée de MgCl₂ à 1,5 M, PVP à 0,1% (PM 36 000 Da) et Hepès à 40 mM ou bien, la solution de Tris 20 mM, Dextran (PM 200-275) 0.5% et (NH₄)₂SO₄ 2M (pH ajusté à 7,2 – 7,4). Lors de la réalisation du test de fixation à la ZP à partir d'ovocytes conservés dans une solution hypersaline, il est impératif de dessaler suffisamment les ovocytes en les lavant dans plusieurs bains successifs de milieu de culture utilisé en FIV (type Fercult, part exemple) à 37°C sous CO₂.

Test de Fixation Croisé

Procédure

Préparation des fluorochromes

- Peser 1 mg de FITC (Sigma, réf. F-7250)
- Peser 0,5 mg de TRITC (Sigma, réf. T-2018)
- Dissoudre chaque fluorochrome dans 100 µl de KOH 0,1 M (Sigma réf. P-6310) et diluer rapidement dans 5 ml de PBS-Dulbecco (Sigma, réf. D-5652) 1% de glucose (Merck, art.8337).

Préparation et coloration des spermatozoïdes

Remarque préliminaire

Il est tout d'abord recommandé de tester la dilution à utiliser en fonction de la toxicité des fluorochromes pour la vitalité des spermatozoïdes.

- Après liquéfaction du sperme témoin (donneur) et du patient, centrifuger 10 minutes à 500 g, éliminer le surnageant et le remplacer par le même volume de milieu capacitant; mesurer les différentes caractéristiques spermatiques ([Chapitre III](#))
- Incuber pendant 2 heures environ à 37°C sous air/CO₂(5%) afin d'initier la capacitation
- Incuber les spermatozoïdes avec les fluorochromes à la dilution appropriée (par exemple, FITC au 1/2 avec les spermatozoïdes du témoin et TRITC au 1/4 avec les spermatozoïdes du patient) pendant 5 à 15 minutes à 37°C à l'obscurité, puis séparer les spermatozoïdes mobiles sur gradient de densité ([Chapitre VI](#)) et les laver 2 fois avec du milieu de culture pour FIV (centrifugation 10 min à 600g).
- Mesurer les concentrations et mobilités finales des spermatozoïdes du témoin et du patient.

Ovocytes

- Du fait de la variabilité de la fixation d'un ovocyte à l'autre, utiliser au minimum 4 ovocytes par test
- Dessaler si nécessaire les ovocytes conservés en les lavant dans du milieu de culture pour FIV par 5 passages successifs pendant plusieurs heures
- Transférer les ovocytes dans le milieu de culture pour FIV.

Co-incubation spermatozoïdes- ovocytes

- Déposer les spermatozoïdes du témoin et du patient colorés par les deux fluorochromes différents (environ 250 000 spermatozoïdes de chaque population) dans un puit d'une boîte de culture 4 puits

- contenant 500µl de milieu de culture pour FIV
- Mettre 4 ovocytes par puits
 - Incuber 3-4 heures à 37°C sous CO₂(5%)
 - Laver les ovocytes en milieu de culture pour FIV (ou simplement PBS/BSA 0,5%) par passages successifs d'une goutte à l'autre (5 bains minimum) en aspirant et refoulant à l'aide d'une pipette de décoronisation (diamètre de 250 µm) ou bien d'une pipette 20 µl
 - Monter les ovocytes ainsi lavés entre lame et lamelle dans un volume de liquide suffisant pour les immobiliser sans toutefois les écraser.

Lecture

- Lire au microscope à fluorescence au grossissement final x400 ou x600.

Remarque

L'incubation des spermatozoïdes et des ovocytes peut aussi s'effectuer dans des microgouttes de 30 µl de milieu de culture sous huile.

Test sur demie zone pellucide (HZA)

La conservation des ovocytes est effectuée dans les mêmes solutions que pour le test de fixation à la zone pellucide décrit précédemment. Le cas échéant, le dessalage s'effectue en lavant les ovocytes dans du milieu de culture pour FIV par 5 passages successifs pendant plusieurs heures.

Procédure

Dissection de la Zone pellucide (ZP)

- Disséquer les ovocytes à l'aide d'un micromanipulateur
- Sectionner la ZP en deux parties à peu près égales.

Préparation des spermatozoïdes

- Sélectionner les spermatozoïdes sur gradient de densité (**Chapitre VI**)
- Remettre les spermatozoïdes en suspension dans le milieu capacitant
- Ajuster la concentration à environ 250 000 spermatozoïdes mobiles/ml.

Incubation des spermatozoïdes avec les demies zones pellucides

- Déposer les spermatozoïdes du témoin et du patient chacun dans une micro-goutte de 50 µl de milieu de culture sous huile dans une boîte de pétri stérile
- Déposer une demie zone pellucide dans chaque micro-goutte
- Incuber les préparations à 37°C sous CO₂ (5%) pendant 4 heures
- Récupérer les demi-zones pellucides dans plusieurs gouttes de 50 µl de milieu de culture avec une pipette 20 µl
- Détacher le spermatozoïdes faiblement fixés (fixation non spécifique) en procédant à des aspirations-refoulements répétés dans une pipette de décoronisation d'un calibre > 200 µm.

Lecture

Chaque demie zone pellucide est mise sur une lame avec une goutte de milieu de culture pour FIV

contenant 10% de glycérol et recouverte d'une lamelle. L'espace entre lame et lamelle doit être entièrement rempli de milieu. La lamelle est ensuite lutée sur la lame avec du vernis à ongle.

Le comptage s'effectue au microscope à contraste de phase au grossissement final x 400 muni soit d'un oculaire à quadrillage ou d'une caméra et d'un moniteur dont l'écran peut être recouvert par un transparent quadrillé. Les résultats sont exprimés en nombre de spermatozoïdes fixés par unité de surface de la ZP. Ce système de comptage permet de relativiser les éventuelles inégalités de surface des 2 demies ZP.

Quel test choisir ?

Test de Fixation Croisé

Avantages :

- Compétition des spermatozoïdes patient/témoin pour un site de fixation à la ZP
- Co-incubation possible avec un inhibiteur de l'interaction spermatozoïde-zone pellucide (utilisé surtout dans la recherche)
- Travail sur ovocyte entier plus facile
- Reproductibilité du test.

Inconvénients :

- Exploration de la seule fixation primaire du spermatozoïde à la ZP
- Toxicité des fluorochromes.

Test sur demie zone pellucide (HZA)

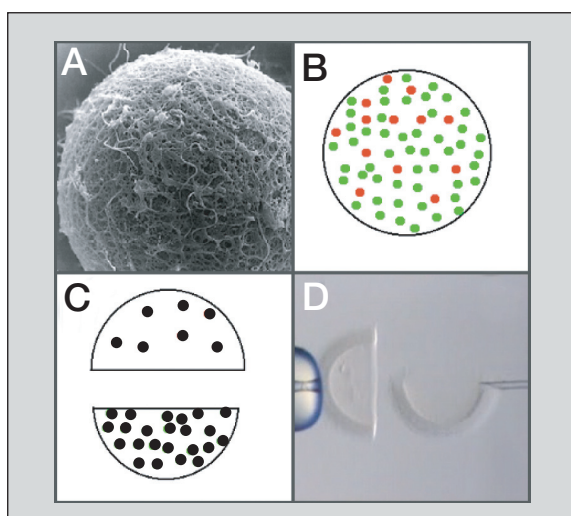
Avantages :

- Co-incubation possible avec un inhibiteur de l'interaction spermatozoïde-zone pellucide
- Exploration possible de la fixation primaire ou secondaire du spermatozoïde à la zone pellucide.

Inconvénients :

- Technique difficile (couper 2 demies ZP de façon équivalente ; traiter les demies ZP en même temps) et pas toujours reproductible (principalement étapes de lavage)
- Interprétation des résultats parfois problématique, car la fixation des spermatozoïdes à la ZP n'est pas toujours homogène sur toute la surface de la ZP.

Figure 3 : Les deux tests développés pour tester la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide (ZP). Photomicrographie en microscopie électronique à balayage de spermatozoïdes fixés à la zone pellucide (A). Principe du test de fixation croisé sur ZP entière (vert : spermatozoïdes témoins marqués par le fluorochrome 1, rouge : spermatozoïdes du patient marqués par le fluorochrome 2) (B). Principe du test de fixation sur demies ZP (C). Photomicrographie de la microdissection d'une ZP en 2 demies ZP de taille similaire (D).



Bibliographie

- Blazak WF, Owerstreet JW, Katz DF, Hanson FW. (1982). A competitive in vitro assay of human sperm fertilizing ability utilizing contrasting fluorescent sperm markers. *J. Androl.* 3, 165-171.
- Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD. (1988). The hemizona assay: development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human zona pellucida to predict fertilizing potential. *Fertil. Steril.* 49, 688-693.
- Franken DR, Kruger TF, Oehninger SC, Kaskar K, Hodgen GD. (1994). Sperm binding capacity of human zona pellucida derived from oocytes obtained from different sources. *Andrologia* 26, 277-281.
- Liu DY, Lopata A, Johnson WIH, Baker HWG. (1989). A human sperm-zona pellucida binding, sperm characteristics and in vitro fertilization. *Human. Reprod.* 4, 696-701.
- Oehninger S, Mahony M, Ozgür K, Kolm P, Kruger T, Franken D. (1997). Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril.* 67, 1121-1127.

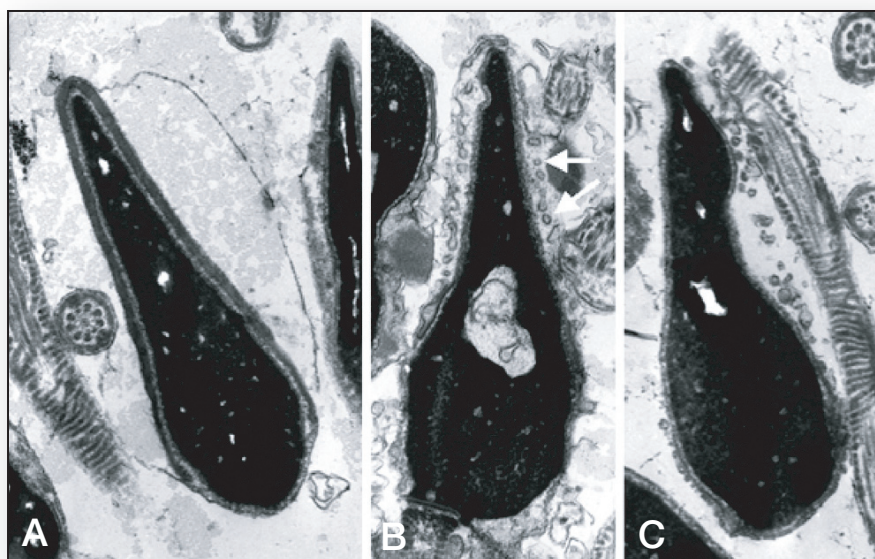
Etude de la réaction acrosomique

L'acrosome est un granule de sécrétion dérivé de l'appareil de Golgi. Il est formé à un stade précoce de la spermiogénèse, par confluence des vésicules golgiennes et contient une grande variété d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques, glycohydrolases, protéinases, phosphatases, estérases, phospholipases et sulfatases. La réaction acrosomique (RA) est un phénomène d'exocytose du contenu acrosomique. Elle survient au contact de la zone pellucide (ZP) après fixation spécifique des spermatozoïdes. Les transformations morphologiques que la RA occasionne ont été particulièrement bien étudiées en TEM ([Figure 1](#)). La matrice acrosomique se gonfle et devient diffuse ce qui entraîne une expansion importante de l'acrosome entre les membranes acrosomiques externe et interne. Ceci est suivi de l'apparition de nombreux points de fusion entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique. Il apparaît alors des vésiculisations membranaires et la membrane acrosomique interne est exposée. Les conséquences de la RA sont le relargage des enzymes de l'acrosome, indispensable à la traversée de la zone pellucide et la modification et/ou l'exposition de nouvelles protéines de la membrane plasmique au niveau du segment acrosomique équatorial et du segment post acrosomique, nécessaires à la fusion avec la membrane ovocytaire.

Chez l'homme, la RA induite par la ZP a été étudiée à partir de spermatozoïdes détachés de la surface de la ZP ou bien à partir de spermatozoïdes exposés à des protéines extraites de ZP humaines. Ainsi, il existe des patients inféconds présentant des caractéristiques du sperme sans particularités et une incapacité de leur spermatozoïdes à faire la RA au contact de la ZP. Aussi certains patients avec une oligozoospermie et/ou une tétrazoospermie ont des spermatozoïdes pour lesquels il est impossible d'avoir une RA induite par la ZP alors qu'ils se fixent normalement à celle-ci. Liu et Baker (2003) ont défini

une pathologie masculine caractérisée par une concentration spermatique normale, une liaison satisfaisante des spermatozoïdes à la ZP mais une incapacité totale ou partielle à effectuer la RA en présence de ZP intacte. Chez ces patients, les taux de fécondation obtenus en FIV sont faibles alors qu'ils sont normaux en ICSI. Ce test pourrait donc être utilisé en pratique courante chez des couples dont l'infertilité est idiopathique de façon à les orienter directement vers l'ICSI et éviter une paucifécondation ou un échec de fécondation total en FIV. Malheureusement, la difficulté d'obtention de ZP humaines (et la spécificité d'espèce empêchant l'usage de ZP d'autres espèces mammifères) limite considérablement les possibilités de réaliser de tels tests au laboratoire. Aussi des méthodes mieux adaptées au laboratoire ont été développées pour étudier la RA en situation spontanée et/ou induite. La mesure de la RA induite par un ionophore calcique après marquage par des lectines conjuguées à un fluorochrome a été préconisée. La nature de l'inducteur a fait l'objet de nombreux débats. Si la zone pellucide en est l'inducteur physiologique principal, il existe aussi d'autres agents stimulant la RA. Ces différentes molécules, plus disponibles que la ZP, sont présentes *in vivo* (progestérone, fluide folliculaire, GABA) ou sont de simples outils pharmacologiques (ionophore calcique A23187).

Figure 1 : Aspect en microscopie électronique à transmission (TEM) d'une tête de spermatozoïde ayant un acrosome intact (A), un acrosome en cours d'exocytose (B) avec une vésiculation (flèche) et, en fin de réaction acrosomique (C) exposant ainsi la membrane acrosomique interne (Photos J.P Bisson)



Méthodologie

Chez l'homme, contrairement à d'autres mammifères comme le cochon d'Inde, et dans une moindre mesure le hamster, la microscopie optique ne permet pas de différencier les spermatozoïdes ayant fait la réaction acrosomique des spermatozoïdes ayant un acrosome intact. La microscopie électronique est la technique de référence mais la lourdeur de sa mise en oeuvre la rend inutilisable en pratique courante. Aussi, plusieurs méthodes évaluant la RA, la plupart fondées sur une révélation à l'aide de marqueurs

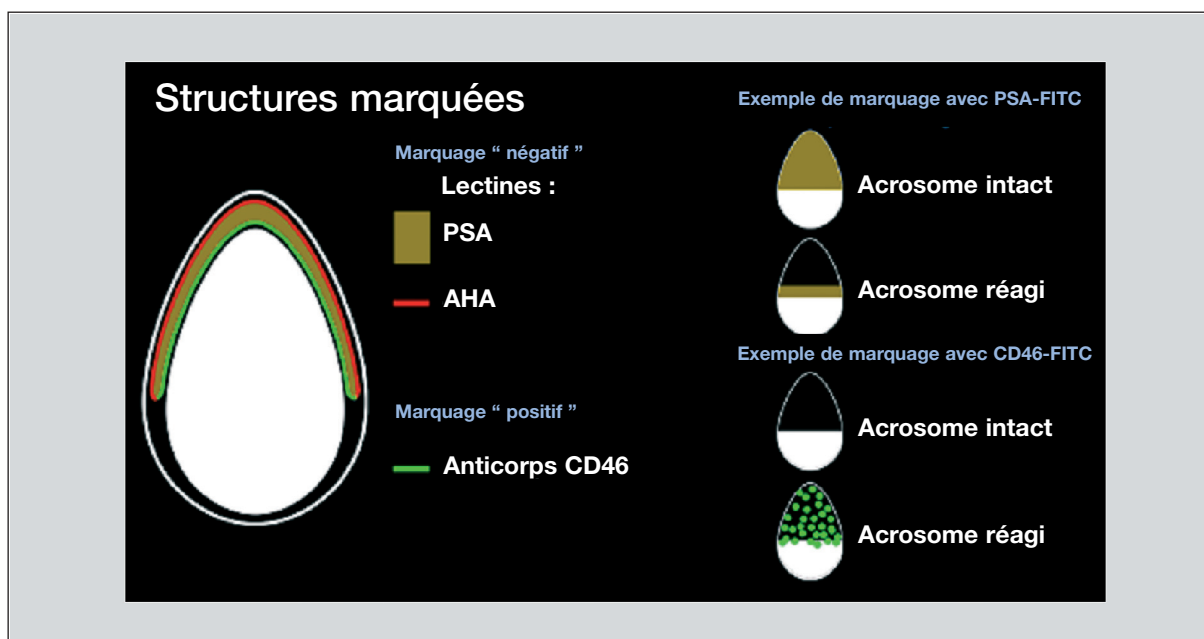
fluorescents, ont été proposées. Elles peuvent être schématiquement divisées en deux groupes selon le type de marquage qui dépend de l'élément cellulaire marqué (Figure 2) :

- Dans un premier groupe, utilisant le plus souvent des lectines couplées à des fluorochromes comme *Pisum sativum* agglutinin (PSA) ou *Arachis hypogaea* agglutinin (AHA), il y a disparition du marquage fluorescent du contenu acrosomique ou de la membrane acrosomique externe des spermatozoïdes ayant effectué la RA (coloration « négative ») ; ces méthodes mettent en évidence non seulement la perte complète du contenu acrosomique mais aussi le stade initial de la RA, c'est à dire la vésiculation.

- Dans un second groupe (« coloration positive »), il y a un marquage des glycoprotéines de la membrane acrosomique interne le plus souvent à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques associés à un fluorochrome : l'accomplissement de la RA fait apparaître une fluorescence; ces méthodes ne détectent donc que l'étape finale de la RA, lorsque la membrane acrosomique interne est exposée.

Afin de différencier une perte du contenu acrosomique liée à la mort cellulaire d'une réelle RA, permettant de mesurer ainsi de manière précise le taux de RA, il est généralement préconisé d'effectuer un double marquage en associant un marqueur de vitalité dont le choix dépend du fluorochrome sélectionné pour le marquage négatif ou positif de l'acrosome (Figure 3B).

Figure 2 : Marquage de la RA en fonction des structures cellulaires marquées



Marquage de la RA avec la lectine PSA-FITC ou l'anticorps anti-CD46-FITC

Procédure

Préparation initiale des spermatozoïdes quelle que soit la méthode

- Sélectionner les spermatozoïdes mobiles par migration ascendante ou gradient de densité (Chapitre VI)
- Remettre en suspension dans un milieu capacitant, à la concentration finale de 10×10^6 spermatozoïdes/ml

- Incuber les spermatozoïdes à 37°C, sous 5% CO₂ dans l'air pendant 4 heures ou à température ambiante dans l'obscurité pendant 16 heures afin de permettre leur capacitation.

Induction de la RA par le ionophore calcique A23187 à 10 µM final

- Préparer une solution 2mM de ionophore A23187 à partir de la solution stock 1mM (Sigma C75-22) diluée dans du DMSO (Sigma D5879)
- Diluer au 1/2 dans le milieu de culture choisi (5 µl de milieu de culture + 5 µl de A23187 2mM)
- Préparer une solution de DMSO par dilution au 1/2 dans le milieu de culture choisi (5 µl de milieu de culture + 5 µl de DMSO)
- Incuber les spermatozoïdes préalablement incubés dans le milieu capacitant avec le ionophore A23187 10 µM final ou avec la solution de DMSO (contrôle) dans des tubes à fond conique pendant 15 min à 37°C sous CO₂ en réalisant une dilution au 1/100
- Dans un premier tube identifié « contrôle », addition de 198 µl de spermatozoïdes capacités et 2 µl de la solution de DMSO, dans un second tube identifié « A23187 », addition de 198 µl de spermatozoïdes capacités et 2 µl de la solution d'A23187 2mM.

Coloration des spermatozoïdes à l'aide d'un marqueur de vitalité (on propose ici l'éthidium homodimère (HOMO – Réf E1169, Interchim) à 2 µM final compatible avec un marquage FITC de la RA)

- Ajouter 2 µl d'HOMO (solution mère à 200 µM) dans chacun des 2 tubes « contrôle » et « A23187 »
- Laisser incuber pendant 3 min. à 37°C sous CO₂
- Laver les spermatozoïdes : dans chaque tube ajouter 500µl de PBS à 1% de BSA
- Centrifuger pendant 2 min à 600g, enlever le surnageant en conservant environ 5 µl au fond du tube.

Alternative 1 : marquage de la RA par la PSA-FITC (Figure 3 A et B)

- Préparer une solution d'éthanol à 95% en diluant 100ml d'éthanol absolu avec 5ml d'eau distillée à conserver à 4°C
- Déposer 5 à 10 µl de la suspension spermatique sur des lames à puit
- Laisser sécher (soit à température ambiante soit dans une étuve à 37°C)
- Perméabiliser les spermatozoïdes en incubant les lames 30min au minimum dans la solution d'éthanol
- Préparer la solution de travail de 10 µg/ml de PSA-FITC (Sigma L0770) en diluant au 1/100^{ème} la solution mère à 1mg/ml dans du PBS
- Recouvrir chaque puit avec 20 µl de la solution de travail PSA-FITC
- Incuber pendant 15min à température ambiante dans le noir
- Rincer les lames dans du PBS
- Monter les lames : déposer environ 10 µl de citifluor sur chaque puit, recouvrir la lame d'une lamelle 60mm x 24mm préalablement lavée à l'alcool, sceller sur chaque bord (à l'aide de vernis à ongle, par exemple).

Alternative 2 : marquage de la RA par le CD46-FITC (Figure 3C)

- Additionner l'anticorps primaire anti-CD46-FITC (Ancell corporations, Ref. 197040) à 10 µg/ml final, soit une dilution au 1/50^{ème} à partir de la solution initiale
- Incuber pendant 45 min. à 37°C à l'obscurité
- Ajouter 500 µl de PBS à 1% de BSA dans chaque tube et centrifuger 2 min à 600g
- Enlever le surnageant et renouveler le lavage une fois

- Récupérer les culots finaux
- Les fixer par ajout de 100 µl de PBS + 1% formaldéhyde (les spermatozoïdes fixés peuvent être conservés à + 4°C à l'obscurité pendant une semaine au maximum avant la lecture).

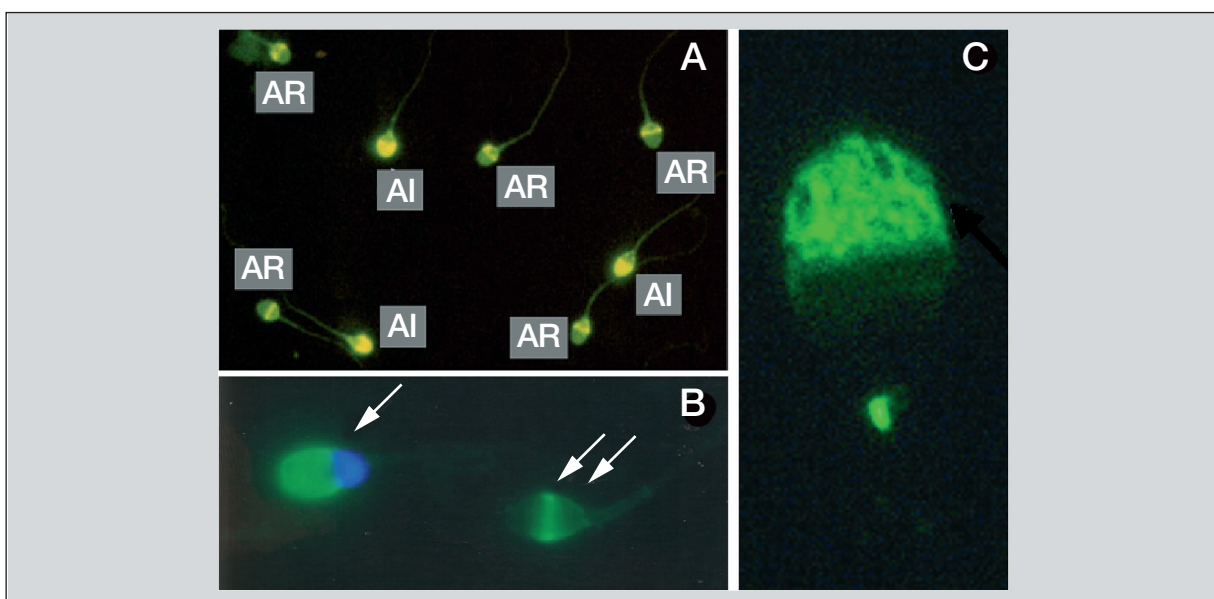
Evaluation du pourcentage de RA en microscopie à fluorescence

La lecture en microscopie de fluorescence nécessite un filtre d'excitation à 488 nm et un filtre d'émission à 540 nm pour la FITC (et un filtre d'émission à 625 nm si l'éthidium homodimère est utilisé pour l'évaluation conjointe de la vitalité). La préparation est examinée de manière standardisée (champs jointifs, balayage en méandre) au grossissement final x600 voir x1000 (à objectif immersion) et au moins 200 spermatozoïdes sont classés dans le but de minimiser l'erreur de mesure. Afin de fournir l'évaluation la plus précise, il peut être utile de renouveler l'évaluation sur 200 spermatozoïdes d'une seconde préparation, comme cela a préalablement été décrit pour l'évaluation de la mobilité, par exemple (Chapitre III). L'évaluation conjointe de la vitalité fournit des résultats plus précis avec PSA ou AHA - FITC. Un spermatozoïde ayant effectué la RA présente une bande de fluorescence à la jonction des régions acrosomique et post-acrosomique (segment équatorial, Figure 3 A et B) ou bien une absence totale de fluorescence. Toute autre forme de fluorescence correspond à des acrosomes anormaux.

Si l'on recourt au CD46-FITC, la méthode d'évaluation du pourcentage de RA est comparable à celle décrite ci-dessus pour la PSA-FITC. Dans ce cas, un spermatozoïde ayant effectué la RA présente une fluorescence punctiforme de la région acrosomique (Figure 3C). L'absence de fluorescence de la région acrosomique indique que le spermatozoïde n'a pas effectué la réaction acrosomique. La méthodologie décrite ci-dessus s'applique à la RA spontanée et induite par un ionophore calcique.

On exprime la capacité d'induction de la RA par un ionophore calcique par la différence entre le % de RA induite et le % de RA spontanée.

Figure 3 : Détection de la RA. Simple marquage à la PSA-FITC (A) ; AI, acrosome intact, AR, acrosome réagi. Double marquage, PSA-FITC et Hoechst 33342 (Vitalité, bleu) (B) ; spermatozoïde non acrosome réagi et mort (flèche), spermatozoïde acrosome-réagi vivant (2 flèches). Spermatozoïde présentant une fluorescence intense due à la liaison de l'anticorps CD46-FITC avec la membrane interne de l'acrosome (C).



Résultats, interprétations

Il n'existe pas de norme en la matière. On estime cependant généralement que 15% représente une capacité d'induction significative. Des valeurs inférieures à 10% sont considérées comme anormales. D'autre part, 20% et plus de RA spontanée indiquent une réaction acrosomique prématurée qui pourrait peut-être expliquer des échecs inexplicables de fécondation en FIV. La cause de cette RA prématurée est inconnue et serait liée à une fragilité de la membrane plasmique, diminuant prématurément sa stabilité et augmentant sa propension à fusionner. Une valeur entre 10 et 15% plaide pour une anomalie spermatique.

Remarque

La RA est un phénomène cellulaire se prêtant assez bien à une évaluation par cytométrie en flux (cellules en suspension, marquages en tout ou rien, ...). Depuis une quinzaine d'année, plusieurs publications ont fait état de mesures rapides et reproductibles de la RA par cytométrie en flux, recourant soit au marquage par les lectines soit au marquage par anticorps monoclonal (GB24, CD46). Deux intérêts majeurs de cette approche non décrite ici sont l'évaluation du phénomène sur un grand nombre de cellules (5000 et plus) diminuant ainsi l'erreur de mesure et d'autre part, la possibilité d'étudier conjointement, sur les mêmes cellules, d'autres propriétés structurales et fonctionnelles des spermatozoïdes.

Bibliographie

- Cross NL, Morales P, Overstreet JW and Hanson FW. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gam. Res., 15, 213-226.
- D'Cruz OJ, Hass GG Jr. (1992). Flow cytometric quantitation of the expression of membrane cofactor protein as a marker for the human sperm acrosome reaction. Fertil Steril. 58, 633-636.
- ESHRE Andrology Special Interest Group (1996). Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. Hum. Reprod., 11, 1463-1479
- Liu DY, Baker HW (2003) Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. Fertil. Steril., 79, 74-80.
- Patrat C., Serres C., Jouannet P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. Biology of the Cell, 92, 255-266.
- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. (2005). Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187 : relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. Hum Reprod. 20, 3459-3468.

Evaluation de la capacité fusiogénique et du pouvoir de pénétration / décondensation des spermatozoïdes : le Hamster test

Si l'interaction entre spermatozoïde et ZP est strictement spécifique d'espèce, il n'en est pas de même en ce qui concerne la membrane ovocytaire. En 1976, Yanagimachi a montré que les spermatozoïdes humains capités étaient capables d'interagir avec des ovocytes de hamster dépellucidés, de les pénétrer et de commencer à y décondenser leur chromatine. Il est alors apparu que cette observation pouvait être la base d'un test évaluant de manière globale les modifications fonctionnelles successives conduisant de la capacitation à la capacité de décondensation de la chromatine du spermatozoïde dans l'ovocyte, prélude indispensable à la formation du pronucleus, à la syngamie et à la première division embryonnaire, avec cependant une étape non testée : celle de la fixation à la ZP (d'où le développement de tests évaluant cette capacité). Résultant de ces observations, Yanagimachi a proposé un test à ajouter à l'arsenal diagnostique des infertilités/infécondités du couple, test qualifié de test de pénétration des ovocytes dépellucidés de hamster ou plus simplement, Hamster-test. Depuis lors, de nombreuses études fondées sur l'utilisation de ce test ont mis en évidence des corrélations positives entre les résultats du test et la morphologie, le mouvement des spermatozoïdes, etc...

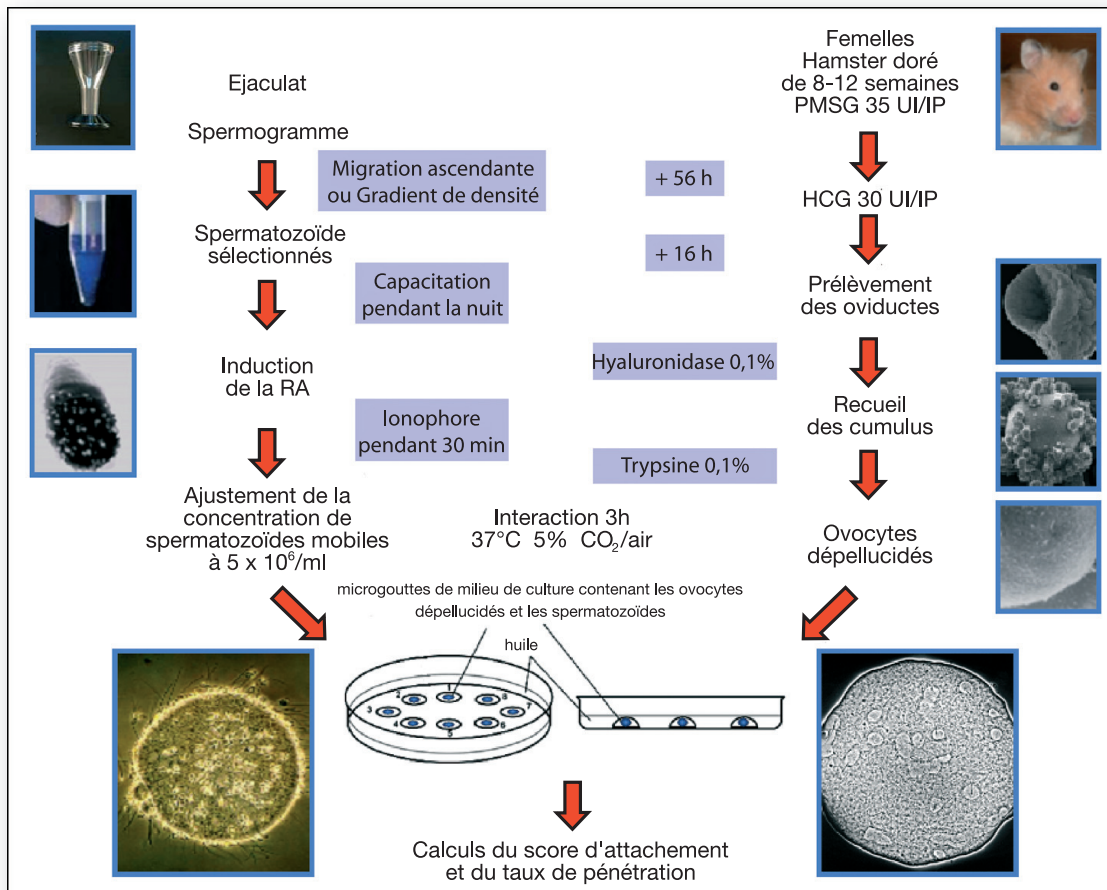
Dans le même temps plusieurs études révélaient des discordances parfois importantes entre le résultat du test et différents paramètres cliniques ou biologiques comme le pronostic de fertilité naturelle ou encore le taux de clivage en FIV. À côté de cela, ces divergences, bien que pouvant s'expliquer en partie par le fait que le test n'explore pas toutes les étapes de l'interaction gamétique, ont été attribuées aux variantes de mode opératoire dans les différentes études, comme par exemple, les conditions de capacitation, le mode d'induction de la RA, le nombre de spermatozoïdes inséminés ou la durée d'incubation conduisant à la proposition d'une procédure standardisée.

Il est depuis lors admis que le hamster test réalisé dans des conditions optimales standardisées informe spécifiquement sur la capacité fécondante des spermatozoïdes, en particulier sur leur aptitude à effectuer leur réaction acrosomique, à fusionner leur membrane avec celle de l'ovocyte et à décondenser leur noyau après pénétration dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Méthodologie

L'ensemble du déroulement du test est schématisé sur la [Figure 1](#).

Figure 1 : Synopsis des conditions de réalisation du test de pénétration des ovocytes dépellucidés de hamster (l'étape finale de lavage des ovocytes et de leur montage sur lame pour l'évaluation de la fixation et de la pénétration des spermatozoïdes n'est pas présentée).



Spermatozoïdes

Procédure

Les différentes étapes de préparation des spermatozoïdes jusqu'à l'induction de la RA ([Figure 1](#)) ont été décrites dans les [Chapitres III et VI](#) et dans le présent Chapitre pour la RA. Après deux lavages par centrifugation et une nouvelle évaluation de la mobilité, la concentration de spermatozoïdes est ajustée à 5 millions/ml et des aliquots de 100 à 500 μ l sont déposés dans les puits de boîtes de culture à puits (ou dans des microgouttes du milieu de culture comme sur la figure), recouverts d'huile de paraffine et mis dans une étuve à 5% CO₂ dans l'air à 37°C, en attente des ovocytes.

Ovocytes

Les ovocytes sont prélevés chez des femelles hamster doré âgées de 8 à 12 semaines.

Procédure

- Induire la stimulation ovarienne par une injection intrapéritonéale de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophine, Intervet, Angers), suivie 56 heures plus tard d'une injection de 30 UI d'HCG (Organon, France)
- Prélever les cumulus ovocytaires dans les oviductes 16 heures après l'injection d'HCG
- Décoroniser les cumulus à l'aide de hyaluronidase à 0,1% (Choay)
- Traiter les ovocytes à la trypsine à 0,1% (Type XII – Sigma).

Ce traitement abouti à la dépellucidation des ovocytes.

Mise en contact des spermatozoïdes et des ovocytes dépellucidés

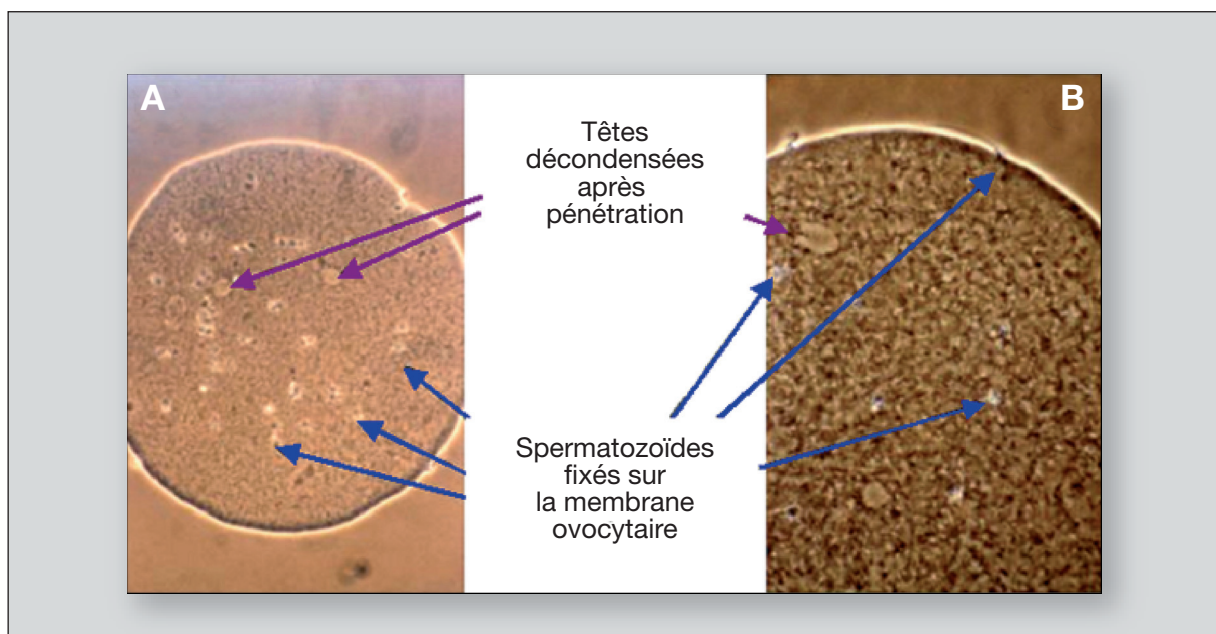
Procédure

- Transférer les ovocytes par lots de 30 à 50 dans les puits contenant les suspensions de spermatozoïdes
- Incuber pendant 3 heures dans l'étuve à 5% CO₂ dans l'air à 37°C
- Recueillir les ovocytes et les rincer abondamment dans 3 bains successifs de milieu de culture afin de les débarrasser des spermatozoïdes qui ne sont pas fermement liés à la membrane ovocytaire
- Déposer les ovocytes lavés par lots de 10 à 15 sur lame dans des gouttes de 10 µl de milieu, gouttes qui sont ensuite délicatement recouvertes d'une lamelle, préalablement préparée avec une pointe de vaseline à chaque angle.

Observation et évaluation de la fixation et de la pénétration

- Observer au microscope à contraste de phase au grossissement final x400 (Figure 2)
- Pour chaque ovocyte, compter le nombre de spermatozoïdes fixés à la membrane ovocytaire
- Pour chaque ovocyte, compter le nombre (éventuel) de têtes décondensées dans le cytoplasme
- Calculer le taux de pénétration des spermatozoïdes (nombre moyen de spermatozoïdes pénétrés par ovocyte).

Figure 2 : Ovocytes de hamster dépellucidés après 3 heures d'incubation avec des spermatozoïdes humains. Contraste de phase, grossissement final x160 (A) x400 (B).



Remarque

En pratique, il est conseillé d'inclure 3 à 4 femelles et de pooler les ovocytes dans chaque test afin de pallier une éventuelle hétérogénéité des cohortes ovocytaires recueillies.

D'autre part, le sperme d'un sujet témoin fertile connu doit être testé, traité et incubé dans le même temps et dans les mêmes conditions que les spermatozoïdes des patients.

La mise en œuvre de ce test nécessite de disposer d'une animalerie conforme à une législation stricte, ce qui peut constituer un facteur limitant. Elle implique également un personnel habitué et habilité à travailler avec des animaux de laboratoire.

Le matériel indispensable à la réalisation de ce test est d'usage habituel dans la plupart des laboratoires de biologie de la reproduction et le coût global du test est plus lié au temps qui lui est consacré qu'aux dépenses en consommables.

Interprétation du test

Tenant compte des conditions standardisées de réalisation du test, un taux de pénétration des ovocytes supérieur ou égal à 15% est considéré comme normal par la plupart des auteurs. En pratique clinique, ce test reste un outil efficace pour définir parmi les couples ayant recours à une AMP et dont l'homme présente des caractéristiques spermatiques normales ou subnormales, ceux qui justifient d'une prise en charge en ICSI. Un test négatif (0% de têtes décondensées dans une cohorte ovocytaires au moins égale à 30) révèle un déficit fonctionnel majeur des spermatozoïdes. Un tel résultat devrait orienter l'AMP vers l'ICSI plutôt que la FIV.

Dans un domaine plus expérimental, ce test est utilisé pour évaluer l'effet de traitements ou de substances ayant un effet inhibiteur sur l'interaction gamétique.

Bibliographie

- Aitken J (1994). On the future of the hamster oocyte penetration assay. *Fertil. Steril.*, 62, 17-19.
- Liu DY and Baker HW (1994). Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum. Reprod.*, 9, 673-9.
- Wolf JP, Bulwa S, Ducot B, Rodrigues D and Jouannet P (1996). Fertilizing ability of sperm with unexplained in vitro fertilization failures, as assessed by the zona-free hamster egg penetration assay : its prognostic value for sperm-oolemma interaction. *Fertil. Steril.*, 65, 1196-1201.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ (1976). The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15, 471-476.

Tests évaluant la qualité nucléaire des spermatozoïdes

Le noyau des spermatozoïdes de mammifère incluant l'homme présente deux grandes particularités : la première est son contenu génétique issu de la méiose qualifié d'haploïde, 23 X ou 23 Y vs 46 XX ou 46 XY dans les cellules somatiques, la seconde résulte de son remodelage lors de la spermiogénèse aboutissant à une forme particulière et à une organisation spécifique de son ADN. La particularité de l'équipement nucléo-protéique des spermatozoïdes concourt aux phénomènes moléculaires de condensation, de compaction et d'organisation spécifique de la chromatine dans le noyau. Dans les spermatozoïdes, le remplacement des histones par les protamines conduit à une perte de l'organisation classique de l'ADN en nucléosomes parce que les protamines réorganisent l'ADN de manière très différente de ceux-ci. Cependant, les spermatozoïdes matures maintiennent une organisation spécifique de l'ADN. Cette organisation particulière et très compacte de l'ADN et des protéines associées en relation avec la matrice nucléaire participe à la protection de l'ADN. Chez le rongeur, il a aussi été montré que l'organisation tridimensionnelle de la molécule est fondamentale pour le fonctionnement des gènes intervenant dans les premières étapes du développement embryonnaire.

Chez l'homme, il a été noté que les spermatozoïdes de patients inféconds présentent souvent une chromatine immature et/ou un ADN fragmenté. Les patients pour lesquels des AMP sont indiquées, particulièrement lorsqu'il s'agit d'ICSI ont en moyenne des taux augmentés de fragmentation de l'ADN de leurs spermatozoïdes en comparaison à ce qui est observé chez des hommes féconds. Des corrélations entre fragmentation de l'ADN et taux de fécondation en FIV et en ICSI ont été mises en évidence mais ces données sont controversées. Par contre, sachant que des spermatozoïdes ayant un ADN endommagé peuvent féconder des ovocytes c'est surtout le retentissement de cet ADN fragmenté sur le développement embryonnaire ultérieur qui pose question, comme le suggèrent plusieurs études récentes. L'observation de taux sensiblement plus faibles de blastocystes après ICSI par rapport à la FIV indique le possible rôle de l'ADN paternel dans le développement précoce de l'embryon.

Un certain nombre de tests de la qualité génétique et nucléaire du spermatozoïde ont été développés ([Tableau 1](#)). En dehors de l'analyse du contenu chromosomique du spermatozoïde (FISH), les différentes techniques proposées au cours des deux dernières décennies se répartissent en techniques évaluant l'état constitutionnel de la chromatine (organisation, de la chromatine, composition en nucléoprotéines, etc...) et les techniques évaluant les dégâts subis à l'ADN. Les facteurs en cause peuvent être génétiques ou d'origine toxique. Malheureusement beaucoup encore de ces tests n'ont pas subi une évaluation complète. En dépit de l'intérêt potentiel indéniable des tests de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, l'utilisation de leurs résultats, qu'il s'agisse des techniques sur lame ou par cytométrie en flux, dans le cadre du diagnostic et de l'AMP tout comme la validité des diverses valeurs seuils proposées restent à ce jour des sujets de controverse intense. Lors de la refonte du manuel de l'OMS portant sur l'analyse du sperme humain (à paraître), un panel international d'experts a considéré qu'il était encore trop tôt pour décrire les méthodes d'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes comme des méthodes validées pour le diagnostic. Le présent cahier ne décrit pas les différentes procédures publiées auxquelles le lecteur pourra se référer.

Tableau 1 : Différentes approches pour l'évaluation de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humains.

Anomalies génétiques du spermatozoïde	quantitatif : FISH qualitatif : Caryotype
Défauts de condensation de la chromatine	TEM / Bleu d'aniline / CMA3, Electrophorèse des protéines nucléaires Groupes thiol
ADN simple brin (natif ou après dénaturation)	Acridine orange par FCM (SCSA) ou par microscopie de fluorescence
ADN fragmenté	TUNEL assay par FCM ou sur lame COMET assay DNA ladders (électrophorèse)
ADN oxydé	HPLC, 8-OHdG par FCM
Adduits	HPLC + spectrométrie de masse Anticorps, autoradiographie

(FCM : cytométrie en flux)

Evaluation de la maturité nucléaire par la coloration au bleu d'aniline acétifié

C'est le seul examen explorant un aspect de la fonction nucléaire qui peut être pratiqué après entente préalable. Il est côté B50. Ce test permet de distinguer des têtes de spermatozoïdes non colorées de têtes de spermatozoïdes partiellement ou totalement colorées (Figure 1). La coloration serait en relation avec la persistance de nucléoprotéines riches en lysine, responsable d'une condensation défectueuse de la chromatine. De nombreuses publications ont montré l'intérêt du test pour le diagnostic et le pronostic.

Figure 1 : Frottis après coloration au bleu d'aniline. Spermatozoïde coloré à chromatine immature (flèche) ; les autres spermatozoïdes ont une chromatine probablement mature.



Indication

Ce test est théoriquement indiqué dans les stérilités inexplicables, les échecs de fécondation en FIV/ICSI et l'absence de grossesse répétée en FIV/ICSI.

Procédure

Produits, petits matériels et équipements nécessaires

- PBS Dubelco 1X ou 10X (Eurobio)
- Glutaraldéhyde EM (pour microscopie électronique) 25%, 100 ml (Taab labo-Eurobio)
- Bleu d'aniline ref 21999183 (Prolabo)
- Alcool absolu ref 20821296 normapur (Prolabo)
- Baume Entellan pour microscopie ref 7960 (Merck)
- Acide acétique
- Eau distillée

Si l'on prépare soit même son tampon phosphate il faut :

- Phosphate monosodique $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ normapur (Prolabo)
- Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ normapur (Prolabo).

Équipement :

- Microscope équipé d'un objectif x100 à immersion
- pH-mètre

Petit matériel :

Pipettes 5 ml, 10 ml / burettes 200 ml / fioles jaugées de 250ml / flacon de 200ml / bacs borel / lames rodées / lamelles 24 x 50 / portoir de lames pour coloration / huile à immersion

Préparation des réactifs

Tampon phosphate 0,2M pH 7,2-7,4

Solutions mères : (1) Phosphate monosodique 0,2M soit 7,8g dans une fiole jaugée de 250ml complétée à 250ml avec de l'eau distillée et (2) Phosphate disodique 0,2M soit 8,89g dans une fiole jaugée de 250ml complétée à 250ml avec de l'eau distillée

Solution fille : 21ml (1) + 129 ml (2), pH ajusté à 7,2-7,4

On peut alternativement utiliser une solution de PBS du commerce prête à l'emploi.

Solution de glutaraldéhyde 0,2M (soit 0,75% ou encore 3% de la solution du commerce à 25%) en tampon phosphate

Retirer 4,5 ml des 150 ml de la solution fille de tampon phosphate (ou prélever 145,5ml dans une solution de PBS du commerce) et ajouter 4,5 ml de la glutaraldéhyde à 25%.

Cette préparation doit être renouvelée tous les 15 jours-3 semaines

Bleu d'aniline à 5% en solution aqueuse acétifiée avec 4% d'acide acétique

Dans une fiole en verre, préparer le colorant acétifié en ajoutant 2,5 g de bleu d'aniline à 48ml d'eau distillée et 2ml d'acide acétique. Contrôler le pH qui doit se situer aux alentours de 2,5-3.

Confection et fixation des frottis (la même procédure peut s'appliquer aux spermatozoïdes sélectionnés après avoir pris soin de laver dans du PBS)

Lavage

- Après liquéfaction du sperme, prélever 0,2 à 0,5ml de sperme dans un tube conique en fonction de la concentration spermatique et du volume disponible

- Ajouter environ 5 ml de PBS à pH 7,4, centrifuger 10 min à 600g
- Rejeter le surnageant, reprendre le culot dans 5 ml de tampon PBS, centrifuger à nouveau 10 min à 600g
- Reprendre le culot dans un volume de façon à obtenir une concentration satisfaisante pour la lecture des frottis
- Réaliser 2 frottis et identifier les lames
- Bien laisser sécher
- Les frottis ainsi préparés peuvent être conservés en vue de la coloration plus tard, à condition de les placer à l'abri de la poussière de l'humidité et de la lumière.

Fixation

- Immerger les lames dans une solution de glutaraldéhyde à 0,75% pendant 30 min
- Rincer à l'eau courante 5 min
- Effectuer 2 passages dans 2 bacs d'eau distillée
- Bien laisser sécher.

Coloration des frottis (en bacs borel en verre)

- 5 min dans le bleu d'aniline acétifié
- Rincer à l'eau courante 5 min
- Effectuer 3 passages dans 3 bacs d'eau distillée
- Immerger 1 min dans l'alcool à 70°
- Immerger 1 min dans l'alcool à 95°
- Immerger 1 min dans l'alcool pur
- Effectuer 2 passages dans 2 bacs de toluène
- Montage des lames éventuel (voir procédure dans [Chapitre III](#)).

Lecture et expression des résultats

- A l'objectif x100 à immersion
- Evaluer 200 spermatozoïdes selon 2 grandes catégories: têtes non colorées et têtes partiellement ou intégralement colorées ([Figure 1](#))
- Donner le résultat en % de spermatozoïdes présentant une tête non colorée (qualifiés de matures)

Il n'existe pas de valeur seuil clairement établie. Se référant à plusieurs publications, 70% et plus de spermatozoïdes matures (non colorés) pourraient constituer un seuil plausible.

Bibliographie

- Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 1990 ;13 : 452-62
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003 ; 80 : 895-902
- Zini A, Sigman M. (2009) Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 30, 219-229.

**Méthodologie (4) :
tests de sélection/survie,
préparation
des spermatozoïdes,
aspects diagnostiques
et thérapeutiques**

Principe et objectifs

Les techniques de sélection/préparation de spermatozoïdes visent à mimer *in vitro* les étapes de filtration/sélection des spermatozoïdes qui s'opèrent lors de leur remontée dans le tractus génital féminin. Deux conséquences essentielles de cette filtration/sélection sont l'élimination du plasma séminal contenant des facteurs décapacitants et son remplacement par un micro-environnement favorable à l'expression du pouvoir fécondant qui débute par la capacitation ([Chapitre I](#)). Cette filtration retient plus ou moins les débris cellulaires, spermatozoïdes morts ou immobiles et autres cellules présentes dans le sperme. Elle favorise également l'élimination d'agents infectieux, sauf les germes intracellulaires comme les mycoplasmes ou d'autres qui se fixent aux spermatozoïdes (E. Coli, Ureaplasma Urealyticum,...).

Au total, les étapes de filtration/sélection des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femme, comportent de nombreux aspects quantitatifs et qualitatifs contribuant à l'expression de la fécondance. On conçoit alors que pour un patient infécond donné, la réalisation d'un test mimant la sélection physiologique des spermatozoïdes présente un intérêt diagnostique lorsqu'une ou plusieurs des caractéristiques initiales de ses spermatozoïdes sont altérées. Le test à visée diagnostique est le plus souvent prescrit dans le cadre d'un bilan qui oriente déjà vers l'AMP du fait d'un délai d'infécondité important et/ou des altérations marquées de la production et/ou de la qualité spermatique constatées sur plusieurs examens. De plus, la procédure de sélection *in vitro* revêt une importance capitale en thérapeutique, puisqu'elle va permettre de disposer de la sous population de spermatozoïdes optimale nécessaire à l'AMP (IIU, FIV, ICSI). Quelle que soit la technique utilisée, la fraction de spermatozoïdes sélectionnés/préparés est resuspendue dans un faible volume de milieu iso-osmolaire voire hyperosmolaire dit capacitant qui contient principalement des protéines captant le cholestérol comme l'albumine humaine, des substrats énergétiques comme le pyruvate de sodium ou le lactate de sodium utilisés par le spermatozoïde et du glucose.

Réalisation des tests dans le cadre diagnostic

Aspects pré-analytiques

Les aspects concernant la prise de rendez vous, le délai d'abstinence à respecter, etc...sont communs aux différentes techniques de sélection et ont été précédemment traités ([Chapitre III](#)) et l'essentiel de l'équipement de laboratoire et du petit matériel nécessaire à la réalisation du test est présenté dans l'Annexe 1.

Remarque

Il est souhaitable que si un laboratoire réalise ces procédures dans un but diagnostique mais aussi en thérapeutique, les matériels et modes opératoires les plus proches soient utilisés

Il faut penser impérativement à sortir tous les milieux nécessaires stockés à 4°C à l'avance et vérifier

que lors des étapes préparatoires ils sont à température ambiante

Les tests de sélection diagnostique par migration ascendante ou gradient de densité décrits dans la nomenclature (improprement dénommés « test de migration-survie » dans le cas du gradient de densité) comportent après l'étape de sélection une estimation de la survie des spermatozoïdes (voir description plus loin)

Dans l'utilisation diagnostique de ces tests, un spermogramme-spermocytogramme avant sélection fait partie intégrante du test; il permettra de juger de la qualité et du rendement de la sélection

La technique de sélection à utiliser est souvent précisée sur l'ordonnance; dans la négative, le biologiste devra décider de la technique qui convient le mieux sur la base d'examen antérieurs et de l'observation initiale du sperme.

Procédures

Migration ascendante (Figure 1)

La technique de migration ascendante (ou « swim-up », car technique décrite la première fois par des auteurs anglo-saxons) est fondée sur un principe de sélection active mettant en jeu la mobilité des spermatozoïdes à partir d'un culot au dessus duquel est ajoutée une phase de milieu de culture. Elle doit donc permettre de récupérer une sous-population de spermatozoïdes de mobilité améliorée par rapport à la mobilité dans l'échantillon initial. En théorie, les spermatozoïdes les plus mobiles (véloces) vont migrer vers la surface (« swim-up »), tandis que les spermatozoïdes morts, immobiles, peu mobiles, autres cellules et débris cellulaires resteront dans le fond du tube.

Préalablement à la sélection, les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal et de ses facteurs décapacitants par un simple lavage.

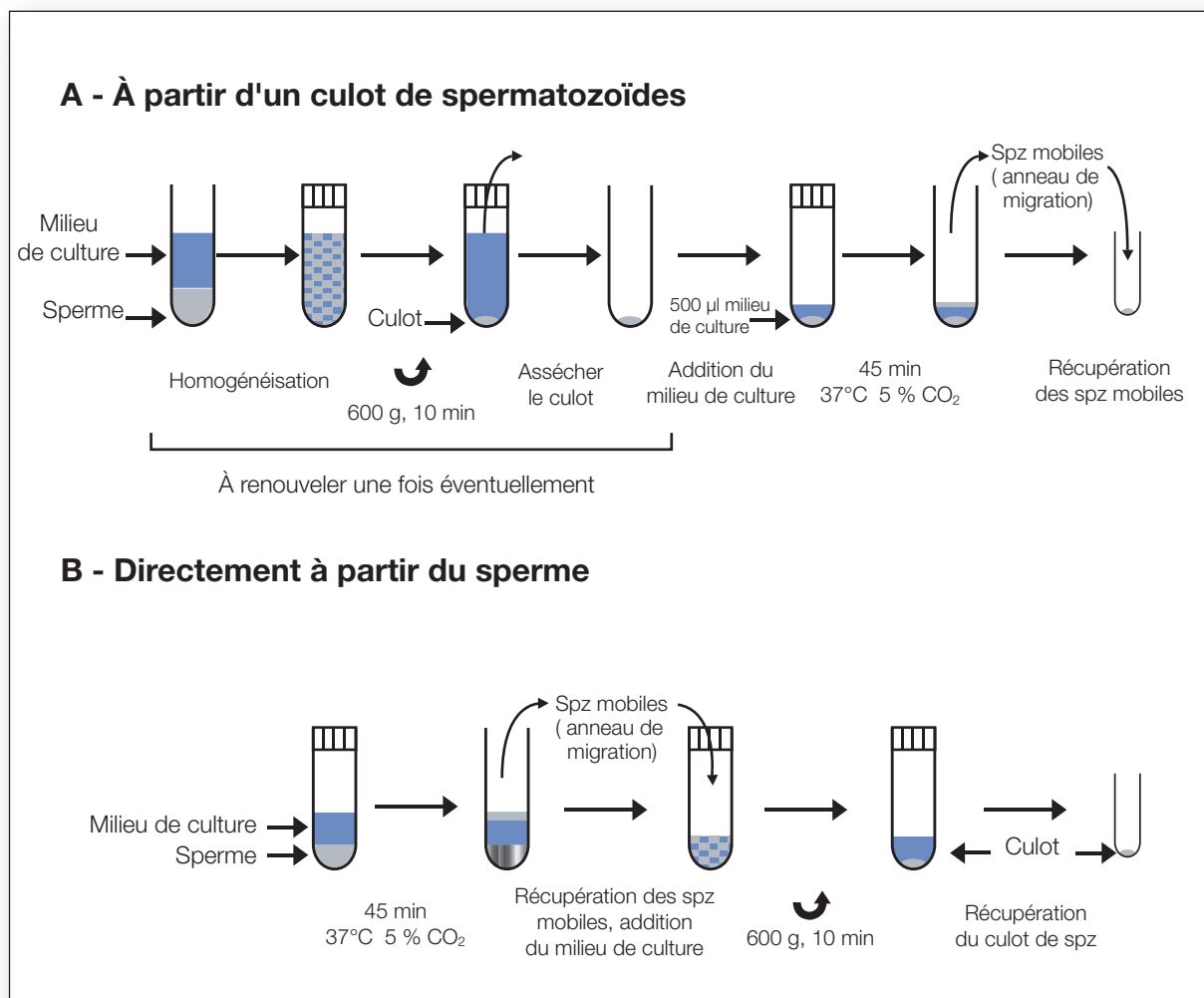
Lavage préalable à la migration

- Dans un tube à fond rond, déposer le volume de milieu de lavage (qui peut être le milieu capacitant choisi pour les étapes ultérieures de migration et survie), puis le volume de sperme utilisé, en respectant la proportion, 3/5^{ème} de milieu de lavage pour 2/5^{ème} de sperme (exemples : 1,5ml de milieu de lavage pour 1ml de sperme testé ou 6ml de milieu pour 4ml de sperme testé)
- Homogénéiser
- Si le volume de sperme utilisé est supérieur à 4ml, plusieurs tubes seront préparés
- Centrifuger 10 min à 600 g
- Dès l'arrêt de la centrifugeuse, aspirer avec précaution le surnageant à l'aide d'une pipette en veillant à ce que l'extrémité de la pipette ne touche pas le culot et à ce qu'il n'y ait pas de reflux.

Migration ascendante des spermatozoïdes

- Déposer délicatement 500µl du milieu capacitant sur le culot de spermatozoïdes en évitant de les remettre en suspension
- Laisser migrer les spermatozoïdes pendant 45 min, soit à température ambiante en tube fermé, soit dans une étuve à 37°C, bouchon non vissé ou non clipé en fonction du type de tube, sous 5% de CO₂
- Aspirer délicatement, à l'aide d'une pipette, 200 à 300µl du milieu de migration en positionnant l'extrémité de la pipette dans la partie supérieure de la phase liquide (Figure 1)
- La déposer dans un tube stérile de 5 ml

Figure 1 : Principes de la sélection de spermatozoïdes par la technique de migration ascendante (“Swim-Up”).



Analyse de la fraction sélectionnée

- Sur la fraction sélectionnée, les caractéristiques suivantes sont évaluées : volume de la fraction, concentration de spermatozoïdes, vitalité et mobilité selon les principes décrits pour l'évaluation du sperme entier ([Chapitre III](#))
- Par ailleurs, le calcul du nombre total de spermatozoïdes mobiles progressifs ($\times 10^6$), Mobilité P ou « a » + « b » ([Chapitre III](#)), dans la fraction est effectué (volume de la fraction \times concentration dans la fraction \times mobilité P ou « a » + « b »)

Survie des spermatozoïdes sélectionnés : conditions de réalisation et interprétation

- La préparation de spermatozoïdes sélectionnés est gardée soit à température ambiante en tube fermé, soit dans une étuve à 37°C, bouchon non vissé ou non clipé en fonction du type de tube, sous 5% de CO₂, pendant une période de 17h à 24h (en fonction de l'organisation interne du laboratoire, l'évaluation de la survie est faite au bout de 17h ou de 24h environ)
- À l'issue de cette période de survie, une évaluation de la vitalité et de la mobilité est faite ([Chapitre III](#))

Aspects post-analytiques

- Noter sur la feuille de paillasse la technique utilisée, le volume de la préparation spermatique, la concentration et la mobilité, d'éventuelles particularités de la préparation, etc...
- Les résultats sont ensuite reportés sur un formulaire de compte rendu faisant suite à celui de l'examen (spermogramme-spermocytogramme) initial
- La conclusion sur la qualité de la sélection est en partie fondée sur la comparaison des caractéristiques de la fraction sélectionnée avec les caractéristiques du sperme entier.

Remarque

Si lors de l'étape de dépôt du milieu de culture le culot est par inadvertance remis en suspension, il peut être utile de recentrifuger la préparation pendant 2 min à 600g

Afin d'augmenter la surface d'échange à l'interface culot/milieu de culture, il peut être utile de faire la migration avec le tube incliné à 45°, à condition de disposer d'un système de porte tube adapté.

Un calcul du rendement de la sélection peut être fait en comparant le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs après et avant sélection

Une variante du test, notamment en cas de faible vitalité, par exemple, consiste à faire la migration directement à partir du sperme natif (Figure 1B)

Il peut être intéressant de réaliser également un spermocytogramme complet après sélection qui peut amener à moduler la conclusion et un possible choix thérapeutique en AMP ultérieur bien que la nomenclature ne le prévoit pas (notamment lorsque l'analyse initiale du sperme ou un spermogramme antérieur indique de très nombreuses anomalies morphologiques).

Centrifugation sur gradient de densité (Figure 2)

Le principe de la centrifugation sur gradient de densité - classiquement utilisée en biologie cellulaire, gradient de Ficoll par exemple, et adapté aux spermatozoïdes - est de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur densité qui dépend principalement du compartiment céphalique contenant le noyau, la forme générale du spermatozoïde intervenant également dans la sélection (par exemple, un spermatozoïde avec un noyau de densité normale mais un large reste cytoplasmique pourra être retenu dans le gradient).

Le gradient de densité est réalisé à partir d'une solution mère colloïdale de particules de silice recouvertes de silane dont la dilution dans le milieu de culture choisi détermine les caractéristiques de la (ou les) phase(s) utilisée(s). En pratique courante, on utilise un gradient à deux phases, généralement, 90 % et 45%. Selon les fabricants, les solutions de gradient sont à reconstituer ou déjà prêtes à l'emploi. Nous décrivons ci-dessous les modes opératoires lorsque les phases ne sont pas prêtes à l'emploi.

Préparation des phases

Préparer sous un PSM dans des tubes de 15 ml les phases suivantes :

- Dans le tube noté « 90% », ajouter 9ml de la solution mère (100%) et 1 ml du milieu de culture adéquat
- Dans le tube noté « 45% », ajouter 4,5 ml de la solution mère (100%) et 5,5 ml du milieu de culture adéquat
- Bien penser à noter sur chaque tube la phase du gradient préparé et la date du jour de la préparation.

Remarque

Les phases ainsi préparées peuvent être conservées un maximum de 48h à 4°C.

On appliquera le même type de mode opératoire si l'on doit réaliser des phases spécifiques, 80%, 40% ou, des gradients à plus de deux phases, etc...

Préparation du gradient de densité à partir des phases préalablement préparées

- Déposer 1ml de la phase « 90% » au fond d'un tube à fond conique identifié au nom et prénom du patient
- Déposer très délicatement 1ml de la phase « 45% » au dessus de la phase 90% (prendre soin de ne pas mélanger les deux phases en faisant glisser lentement la solution « 45% » le long de la paroi du tube, en inclinant légèrement celui-ci)
- Bien homogénéiser le sperme liquéfié avant son dépôt sur le gradient
- Déposer 1 à 2 ml maximum de sperme au dessus de la phase 45% en faisant glisser le sperme goutte à goutte, le long de la paroi du tube incliné
- Si le volume de sperme utilisable excède 2ml, il est nécessaire de préparer plusieurs tubes de gradients
- Si le volume de sperme utilisable est inférieur à 1ml, il peut être souhaitable de préparer alors des phases de 0,5 ml.

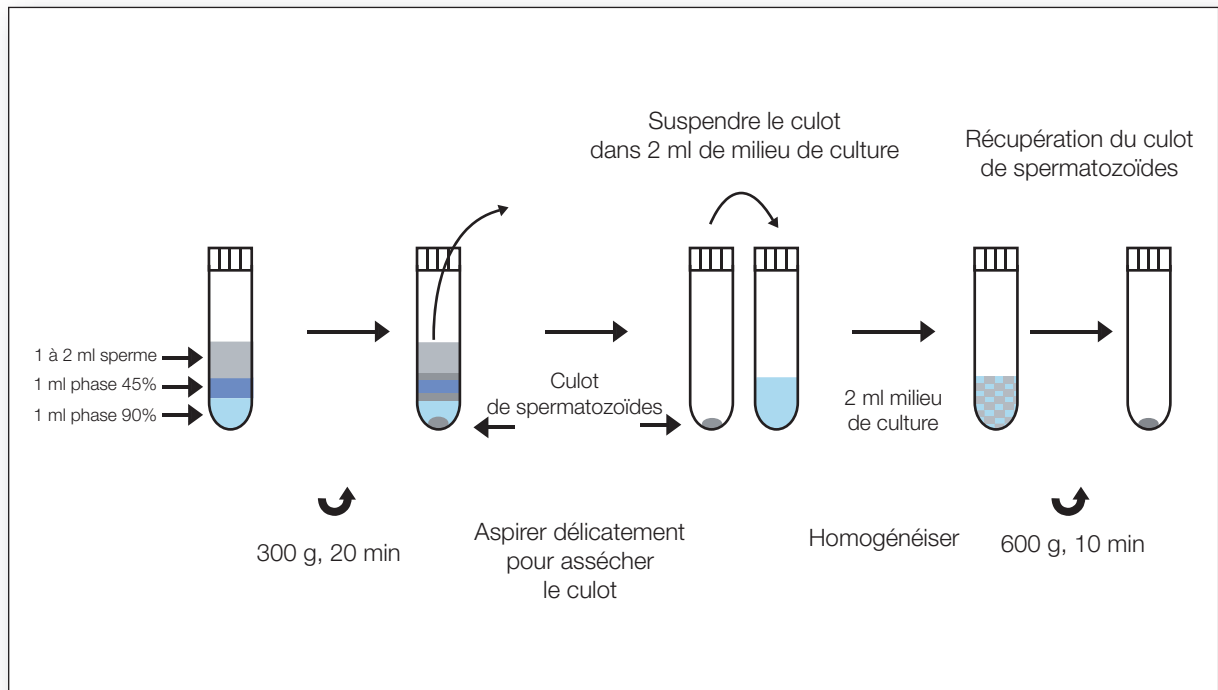
Centrifugation sur gradient de densité et lavage

- Revisser le (ou les) tube(s)
- Centrifuger 20 min à 300g
- Pendant ce temps, déposer 2 ml du milieu de culture choisi au fond d'un (ou de plusieurs) tube(s) à fond conique identifié(s) au nom et prénom du patient
- Après centrifugation, aspirer délicatement à l'aide d'une pipette souple ou tout dispositif d'aspiration similaire, le liquide séminal, la phase « 45% », « l'anneau » de débris cellulaires visible à l'interface des phases « 45% »
- Changer de pipette pour aspirer la moitié supérieure de la phase « 90% » en veillant à ne pas faire de reflux de manière à éviter de remettre le culot formé au fond de la phase « 90% » en suspension
- Aspirer la totalité du (des) culot(s) de centrifugation à l'aide d'une pipette de 200µl et la (les) déposer au fond du (de) tube(s) à fond conique contenant 2ml de milieu de culture
- Revisser le (ou les) tube(s), homogénéiser
- Centrifuger à nouveau 10 min à 600g
- Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette (garder 200 à 300µl de la préparation, soit aspirer environ 1,7 ml à 1,8 ml du surnageant)
- Bien homogénéiser le(s) culot(s)
- Regrouper dans un seul tube les culots si nécessaire.

Analyse de la fraction sélectionnée

- Sur la fraction sélectionnée, les caractéristiques suivantes sont évaluées : volume de la fraction, concentration de spermatozoïdes, vitalité et mobilité selon les principes décrits pour l'évaluation du sperme entier ([Chapitre III](#))
- Par ailleurs, le calcul du nombre total de spermatozoïdes mobiles progressifs ($\times 10^6$), Mobilité P ou « a » + « b » ([Chapitre III](#)), dans la fraction est effectué (volume de la fraction x concentration dans la fraction x mobilité P ou « a » + « b »).

Figure 2 : Principes de la sélection de spermatozoïdes par la technique des gradients de densité



Survie des spermatozoïdes sélectionnés

Comme lors d'une migration ascendante, la préparation de spermatozoïdes sélectionnés est gardée soit à température ambiante en tube fermé, soit dans une étuve à 37°C, bouchon non vissé ou non clipé en fonction du type de tube, sous 5% de CO₂, pendant une période de 17h à 24h (en fonction de l'organisation interne du laboratoire, l'évaluation de la survie est faite au bout de 17h ou de 24h environ) À l'issue de cette période de survie, une évaluation de la vitalité et de la mobilité est faite ([Chapitre III](#))

Aspects post-analytiques

- Noter sur la feuille de paillasse la technique utilisée, le volume de préparation spermatique obtenue, la concentration et la mobilité, d'éventuelles particularités de la préparation, etc...
- Les résultats sont ensuite reportés sur un formulaire de compte rendu faisant suite à celui de l'examen (spermogramme-spermocytogramme) initial ([exemples de compte rendu de test de sélection-survie en Annexe 6](#))
- La conclusion sur la qualité de la sélection est en partie fondée sur la comparaison des caractéristiques de la fraction sélectionnée avec les caractéristiques du sperme entier.

Remarque

Un calcul du rendement de la sélection peut être fait en comparant le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs après et avant sélection.

Il peut être intéressant de réaliser également un spermocytogramme complet après sélection (bien que la nomenclature ne le prévoit pas) qui peut amener à moduler la conclusion et un possible choix thérapeutique en AMP ultérieur (notamment lorsque l'analyse initiale du sperme ou un spermogramme antérieur indique de très nombreuses anomalies morphologiques).

Préparations particulières dans le cadre diagnostique et thérapeutique

Présence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le sperme

Le but est de diminuer significativement la proportion de spermatozoïdes porteurs d'ACAS en diluant l'éjaculat et en réduisant au maximum le temps de contact des spermatozoïdes avec le plasma séminal dilué.

Procédure

- Évaluer au vu des spermogrammes ou tests de sélection antérieurs le volume moyen de l'éjaculat du patient
- Sous le PSM, déposer à l'aide d'une pipette dans le réceptacle destiné au recueil de sperme le volume de milieu de culture équivalent au volume moyen de l'éjaculat
- Noter sur la feuille de paillasse du patient le volume de milieu de culture déposé dans le réceptacle
- Le réceptacle ainsi préparé est remis au patient pour qu'il effectue le recueil de sperme
- Après recueil, mesurer le volume total et le noter dans le cahier de paillasse et sur le réceptacle afin de déduire le volume de sperme émis
- Homogénéiser immédiatement la préparation dans le but de dissocier les agglutinats
- Centrifuger 10 min à 600 g
- Éliminer le surnageant
- Remettre le culot en suspension
- Pratiquer la technique de sélection choisie.

Remarque

Dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, la sélection des spermatozoïdes s'effectue le plus souvent sur un gradient de densité, du fait du meilleur rendement à rechercher en cas d'IIU.

Effectuer un test aux immunobilles sur un échantillon de la préparation finale obtenue après sélection (Chapitre IV)

Éjaculation rétrograde

Il faut préalablement s'assurer que le patient a correctement suivi les consignes d'alcalinisation des urines (Chapitre IV). Les techniques de préparation concernent dans un premier temps l'éjaculation antégrade si elle existe et dans un second temps, l'éjaculation rétrograde. Si l'éjaculation antégrade contient des spermatozoïdes, la sélection se fera selon l'une des techniques précédemment décrites. Les urines recueillies après orgasme sont traitées immédiatement s'il n'y a pas d'éjaculation antégrade ou si les caractéristiques initiales du sperme (recueil antégrade) sont insuffisantes se basant sur un test de sélection antérieur (moins de 1×10^6 spermatozoïdes mobiles progressifs sélectionnés).

On procède comme suit :

- Homogénéiser immédiatement les urines
- Evaluer la mobilité selon la procédure déjà décrite
- À l'aide d'une pipette souple stérile, déposer les urines dans un tube conique stérile
- Centrifuger 10 min à 300g puis éliminer le surnageant
- Aspirer le culot et le mettre en suspension dans 1ml de milieu de culture dans un tube à hémolyse
- Le déposer ensuite sur un gradient de densité discontinu selon la procédure précédemment décrite.

Sperme congelé

L'étape de décongélation de la (ou des) paillette(s) de sperme est réalisée selon la procédure décrite dans le [Chapitre VII](#). Le contenu de la paillette est déposé sur un gradient discontinu de densité en ne disposant que 500 µL par gradient. Pour la tracabilité, le fourreau de la paillette est retiré et collé sur le cahier de paillasse.

Éjaculats cumulés

Si des examens antérieurs indiquent une insuffisance spermatique importante qui souvent touche à la fois le nombre de spermatozoïdes éjaculés et leur qualité, la réalisation d'un second recueil à une heure d'intervalle du premier peut être utile dans le but d'obtenir un nombre suffisant de spermatozoïdes utilisables pour une AMP. Il est donc important d'évaluer l'intérêt de ce double recueil lors d'une première étape diagnostique. Cette procédure sera répétée dans un but thérapeutique lorsque son intérêt est démontré. La sélection s'effectue alors en mélangeant les deux prélèvements, après avoir mesuré les caractéristiques initiales du sperme sur chaque prélèvement.

Remarque

Cette approche n'est pas spécifiquement réservée aux AMP de type FIV ou ICSI : en effet, elle peut être utile dans le cadre de l'IU lorsque l'examen direct d'un premier éjaculat laisse craindre que le rendement de la sélection soit insuffisant.

Suspicion de prélèvement micro-biologiquement contaminé en IU

Si l'histoire du patient fait craindre que le prélèvement de sperme soit micro-biologiquement « contaminé » le jour d'une IU en dépit de traitements antérieurs, la sélection de spermatozoïdes mobiles peut être faite sur un gradient de densité discontinu à plusieurs couches, par exemple, 90%, 80%, 70%, 60%, 50 et 40%. Il a été montré que ce mode opératoire réduit considérablement la quantité de germes présents dans la préparation finale. Les modalités de confection du gradient sont les mêmes que pour le gradient à deux couches décrit précédemment sauf que l'on dépose six couches de 1ml chacune.

Sélection/préparation des spermatozoïdes dans le cadre thérapeutique (avant IIU)

Les techniques utilisées sont fondamentalement les mêmes, migration ascendante ou centrifugation sur gradient de densité. Toutes les étapes doivent être accomplies dans des conditions de stérilité optimales. Les règles de bonne pratique relatives à la préparation de spermatozoïdes dans le cadre de l'AMP sont énoncées dans l'arrêté du 11 avril 2008. Nous donnons ci-dessous quelques extraits de ce texte en rapport avec la préparation de spermatozoïdes avant IIU que peuvent réaliser les laboratoires d'analyse de biologie médicale agréés.

Extrait de l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'AMP :

« ...Toute structure autorisée à pratiquer les activités biologiques d'AMP est équipée au minimum du matériel suivant pour le traitement du sperme en vue d'insémination :

- une hotte à flux laminaire vertical, en accord avec la réglementation en vigueur*
- une centrifugeuse répondant aux normes en vigueur*
- un microscope droit*
- un incubateur. ... »*

«...Les éléments cliniques et biologiques spécifiques aux inséminations sont :

- les documents de suivi de l'induction de l'ovulation et la détermination du moment estimé de l'ovulation*
- le rang de la tentative*
- l'origine du sperme, frais ou congelé*
- la date et l'heure du recueil de sperme, de sa préparation et de l'insémination*
- les paramètres du sperme utilisé pour l'insémination et le nombre de spermatozoïdes à mobilité progressive inséminés. ... »*

« ... Les IAC constituent une AMP à part entière. Elles sont précédées d'une vérification de la perméabilité tubaire, d'un spermogramme-spermocytogramme éliminant notamment une téatospermie sévère, d'une spermoculture récente et d'un test de migration-survie des spermatozoïdes. Le nombre total de spermatozoïdes mobiles progressifs disponibles est au moins égal à un million avec une survie spermatique positive à vingt-quatre heures. ... »

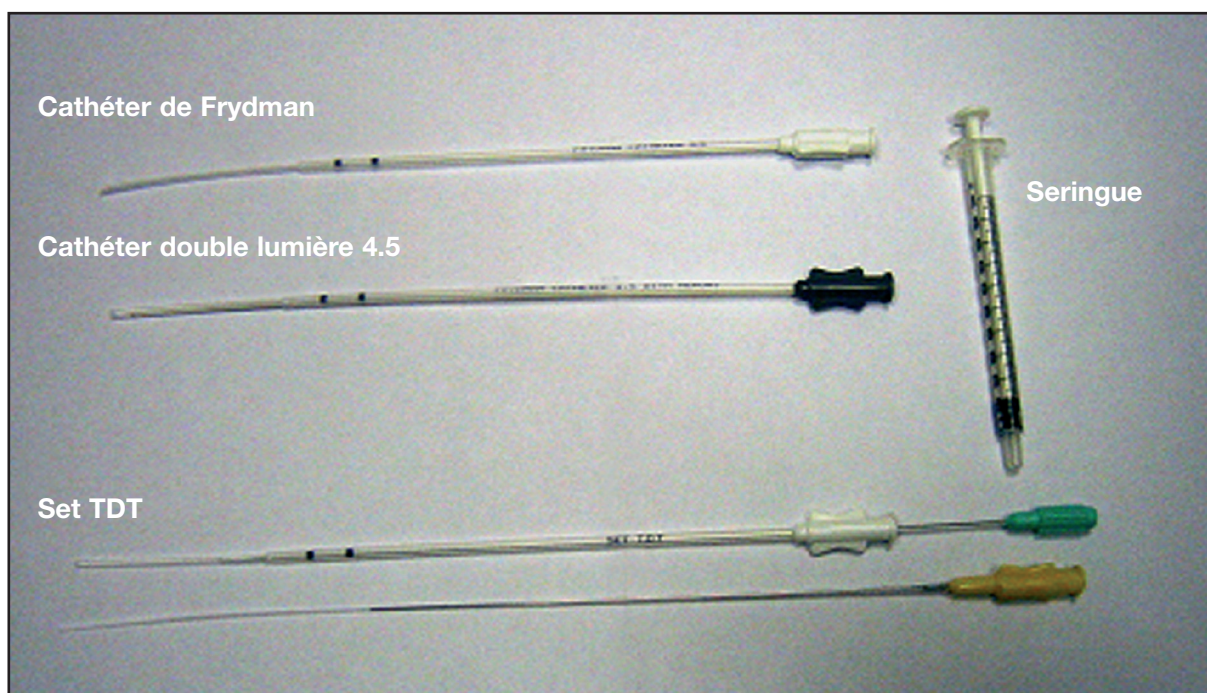
« ...Le recueil et la préparation de sperme sont réalisés dans un laboratoire d'AMP autorisé. Le sperme est recueilli dans des conditions d'asepsie satisfaisantes. Les procédures d'hygiène du recueil font l'objet d'une information spécifique aux patients et sont affichées dans la pièce destinée au recueil, en plusieurs langues en tant que de besoin. Chaque flacon de recueil et chaque tube à centrifuger portent le nom des deux membres du couple ou un numéro d'identification. L'analyse des paramètres spermatiques initiaux et après préparation est indispensable avec, au minimum, l'évaluation de la numération et de la mobilité des spermatozoïdes. Elle fait l'objet d'un compte rendu. En cas d'utilisation de spermatozoïdes congelés, les paramètres spermatiques initiaux sont communiqués par le centre ayant congelé le sperme. L'IAC est

réalisée avec au moins 1 million de spermatozoïdes mobiles progressifs généralement concentrés dans un volume de 0,2 à 0,3 ml de milieu. À défaut, l'indication de poursuivre les IAC est rediscutée. Lorsque la préparation spermatique est transportée, le délai entre la préparation et l'insémination est le plus court possible et suit une procédure écrite qui permet notamment le maintien du prélèvement entre 20 °C et 35 °C dans un contenant étanche. ... »

Remarque

- Si plusieurs préparations le même jour, traiter un seul sperme à la fois
- Signaler au clinicien toute modification inattendue des paramètres spermatiques (à titre d'exemple leucospermie, hémospémie, etc...)
- Les caractéristiques biologiques du sperme préparé sont transmises au clinicien avec le cathéter d'insémination intra-utérine contenant la préparation (Figure 3)
- Le plus souvent, l'insémination est réalisée à distance du lieu de la préparation ce qui nécessite de disposer d'un matériel isotherme emballant le cathéter pour le transport
- L'IUI doit si possible être pratiquée dans les 3 heures suivant la fin de la préparation du sperme

Figure 3: Différents types de cathéters utilisés pour les inséminations intra-utérines



Résultats des tests de sélection des spermatozoïdes et conduite thérapeutique (en bref)

Quelle technique choisir ?

Quelle que soit la technique d'AMP utilisée, le choix d'utiliser telle ou telle technique de sélection dépend surtout des caractéristiques initiales du sperme et du rendement de la technique. Il faut donc toujours disposer d'au moins un spermogramme-spermocytogramme antérieur récent.

Du fait d'un rendement assez faible, la sélection par migration ascendante ne concerne en général que des spermatozoïdes dont les caractéristiques initiales sont jugées satisfaisantes (se basant sur les valeurs de référence de l'OMS et un pourcentage de spermatozoïdes typiques au moins supérieur à 25% selon la classification de David modifiée).

La technique de sélection sur gradient de densité discontinu, bien que plus onéreuse et source de stress oxydatif du fait des étapes répétées de centrifugation, est plus souvent utilisée en routine car elle convient mieux à la majorité des spermatozoïdes préparés en vue d'une AMP. Notamment, le rendement en spermatozoïdes mobiles progressifs récupérés est toujours supérieur à celui obtenu avec la technique de migration ascendante (bien que la sélection ne soit pas fondée sur des différences de mobilité). Il faut cependant savoir que des anomalies morphologiques concernant le flagelle peuvent être concentrées après gradient de densité alors qu'au contraire la migration ascendante de par son principe diminue très significativement leur fréquence.

Remarque

Le stress oxydatif, notamment généré par les étapes de centrifugation, peut être très important et retentir sur la fonctionnalité des spermatozoïdes par exemple lorsque l'échantillon contient de très nombreuses cellules et particulièrement, des leucocytes. Aussi lorsqu'un sperme présente une faible vitalité et ou contient une concentration élevée de cellules et qu'un rendement élevé de la sélection n'est pas le premier objectif, il pourra être utile de réaliser plutôt une migration ascendante (voire la variante sur sperme natif).

Rendement des techniques de sélection et choix de l'AMP la plus appropriée

Le nombre total de spermatozoïdes mobiles est un paramètre important qui conditionne la réalisation de telle ou telle technique d'AMP.

L'insémination intra-utérine (IIU) est la technique la plus fréquemment proposée en première intention lorsque la qualité du sperme et le bilan féminin l'autorisent *a priori*. Etudiant le taux de grossesse dans une large étude rétrospective portant sur plus de 3000 cycles d'IIU avec le sperme du conjoint, Berg *et al.* ont indiqué qu'il fallait disposer dans cette indication de plus de $0,8 \times 10^6$ spermatozoïdes mobiles progressifs

pour espérer être efficace. Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs. Quelque soit la technique de préparation utilisée, une valeur seuil aux environs de 1×10^6 spermatozoïdes mobiles progressifs récupérés semble se dégager. Il y aurait également une limite supérieure du nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs à inséminer mais cette notion demeure controversée à ce jour (au-delà d'un certain seuil, 8 ou 20×10^6 spermatozoïdes mobiles progressifs inséminés, un excès de fausses couches précoces ou de grossesses multiples a été rapporté). Ces résultats ne sont pas confirmés par d'autres auteurs. Le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement typiques évalué dans le sperme initial semble également corrélé aux chances de grossesse après insémination. Au cours d'une étude rétrospective portant sur 330 cycles, distinguant deux groupes de patients en fonction du degré de térazoospermie initiale, Burr et coll démontrent qu'un pourcentage initial de formes typiques < 10% grève considérablement le pronostic après IUI (18% vs 4% de grossesse par cycle).

Pour information

Il est généralement admis que la FIV conventionnelle peut être réalisée lorsqu'au moins 500 000 spermatozoïdes mobiles progressifs peuvent être sélectionnés. En dessous de ce chiffre on considère que l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) est indiquée.

Bibliographie

- Berg U, Brucker C, Berg FD (1997). Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 67, 4, 747-50.
- Burr RW, Siegberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD (1996). The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril*, 65, 127-32.
- Campana A, Sakkas D, Stalberg A, Bianchi PG, Comte I, Pache T, Walker D (1996). Intrauterine insemination : evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod*, 11, 732-6.
- Wainer R, Merlet F, Bailly M, Lombroso R, Camus E, Bisson JP (1996). Facteurs pronostiques des inséminations intra-utérines avec sperme du conjoint. *Contracept Fertil Sex*, 897-903.

**Méthodologie (5) :
congélation/
cryoconservation
des spermatozoïdes**

CHAPITRE VII

Historique

La cryoconservation du sperme a été rendue possible par la découverte que le glycérol protégeait les spermatozoïdes contre les dommages occasionnés par la congélation dans les vapeurs d'azote. L'utilisation clinique de spermatozoïdes humains congelés en présence du glycérol a été rapportée la première fois dans les années 50 (sperme congelé et stocké à -70°C) ; un peu plus tard, ont été rapportées les premières naissances après avoir utilisé des spermatozoïdes congelés et stockés dans l'azote liquide. Depuis plus de 30 ans, en France les CECOS (Centre d'Etude et de Congélation des Oeufs et des Spermatozoïdes humains) représentent l'infrastructure clinico-biologique gérant une partie de l'autoconservation et la totalité du don de spermatozoïdes. L'essor de la FIV puis de l'ICSI a permis d'obtenir des grossesses et des naissances dans des situations où la médiocre qualité du sperme après décongélation ne permettait d'envisager l'insémination, seule technique disponible auparavant. Enfin, des données récentes ont indiqué que des grossesses peuvent être obtenues après des périodes de conservation de 25 ans et plus.

Quelques principes physiques de la congélation/conservation dans les vapeurs d'azote liquide

La descente ou la remontée thermique lors de congélation dans l'azote liquide (-196°C) d'organes tissus ou cellules composés de 60 à 80% d'eau comporte une zone critique se situant quelques degrés en dessous de 0°C . La cristallisation de l'eau en dessous de 0°C entraîne une augmentation de volume d'environ 9 %. Aussi, en cryobiologie, l'obstacle principal à surmonter est la formation de cristaux de glace, la taille de ces derniers dépend de la vitesse de refroidissement, plus le refroidissement est rapide, plus le nombre de cristaux est grand, et plus les cristaux sont petits. La formation de cristaux de glace dans le milieu extra-cellulaire augmente la concentration des solutés dans le reste du liquide extra-cellulaire non encore cristallisé. Cette hypertonie extra-cellulaire va entraîner une déshydratation puis une mort cellulaire. De plus, les cristaux formés emprisonnent les cellules provoquant des dégâts mécaniques au niveau de leurs membranes. La formation de cristaux intra-cellulaires quant à elle peut avoir un effet traumatique direct sur les membranes et sur les organites intra-cellulaires.

La stratégie de résistance au froid repose sur l'utilisation de « cryoprotecteurs » permettant de limiter le taux de cristallisation et la mort cellulaire. Comme leur nom l'indique, les cryoprotecteurs sont additionnés aux cellules dans le but de les protéger des effets délétères de la congélation rapidement évoqués ci-dessus. Leur mode d'action dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Par exemple, ils abaissent la température de congélation au fur et à mesure que leur concentration augmente et, du fait de leur forte hydrophilie, ils interfèrent avec les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace. Du fait de leur capacité à former des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau, ils réduisent la mobilité de ces dernières et augmentent la viscosité de la solution, avec comme principale conséquence une diminution du taux de cristallisation.

On distingue deux catégories de cryoprotecteurs, les cryoprotecteurs intracellulaires dits « pénétrants » et les cryoprotecteurs extra-cellulaires dits « non pénétrants ». Les premiers sont des substances organiques très solubles et de petit poids moléculaire, dérivées le plus souvent d'alcools ou du diméthylsulfoxyde (DMSO). En pénétrant à l'intérieur des cellules, ils augmentent la concentration des solutés intracellulaires diminuant la formation de cristaux à l'intérieur de la cellule. Dans cette catégorie, les plus utilisés en biologie de la reproduction sont le DMSO, le 1,2 propanediol ou propylène glycol (PROH), l'éthylène glycol, et surtout, le glycérol. Dans la seconde catégorie, il s'agit de sucres ou polymères de haut poids moléculaire ne pénétrant pas dans les cellules. Leur principe d'action est

d'entraîner une fuite d'eau intracellulaire par effet osmotique empêchant ainsi la formation de cristaux intracellulaires. Ils sont utilisés en combinaison avec les cryoprotecteurs intracellulaires. Dans cette catégorie, citons les disaccharides tels que sucrose ou tréhalose et les polymères de haut poids moléculaire tels la polyvinylpyrrolidone (PVP), le polyéthylène glycol (PEG), le ficoll et le dextran.

Il faut noter qu'en comparaison à d'autres cellules, le spermatozoïde tolère assez bien la congélation en raison de sa faible teneur en eau (cytoplasme très réduit). La tolérance à la congélation appréciée par la mobilité post-dégel indique une baisse moyenne de 15-20% dans le cas des spermatozoïdes humains.

Indications de la congélation/cryoconservation des spermatozoïdes humains

1/ Don de spermatozoïdes

En France et de manière régie par les textes réglementaires, les donneurs sont des hommes féconds ayant au moins un enfant, âgés de moins de 45 ans qui acceptent de donner de manière bénévole et anonyme leur sperme dans le but de permettre à un couple infécond du fait d'une infertilité masculine de devenir parents. Les impératifs de sécurité sanitaire et la nécessité de tenir compte des caractéristiques phénotypiques des deux membres du couple imposent la congélation du sperme.

2/ Conservation avant traitement à risque stérilisant

Cette indication concerne les hommes qui vont devoir subir un traitement ou une intervention comportant un risque d'infertilité ultérieure, parfois simplement transitoire mais aussi possiblement définitive sans que cela ne soit prédictible, par exemple lors de protocoles de chimio- et de radiothérapie.

3/ Avant une AMP

Elle est proposée aux hommes ayant des difficultés pour réaliser le prélèvement de sperme, parfois à ceux ayant une qualité spermatique très faible pouvant être insuffisante le jour de la tentative d'AMP (indication controversée) ou encore, plutôt une indication de confort, à des hommes susceptibles d'être absents le jour de la FIV ou de l'ICSI. Cette indication concerne aussi les spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires prélevés chirurgicalement à fin d'AMP du fait d'une azoospermie (moins fréquemment le prélèvement chirurgical et l'AMP sont programmés de manière synchrone et donc sans passer par la congélation).

4/ Avant une vasectomie

Ce geste chirurgical est considéré comme irréversible, même si des tentatives de reperméation (vaso-vasostomie) aboutissent parfois à l'obtention de grossesse ; aussi, la conservation préalable de spermatozoïdes est souvent proposée aux patients ayant recours à cette intervention dans le but de garder la possibilité d'une éventuelle paternité future.

Préalables réglementaires à la cryoconservation de sperme (en dehors du don)

Tout patient devant bénéficier d'une cryoconservation doit prendre un rendez-vous dans un laboratoire autorisé pour l'activité de congélation et de conservation du sperme. Un dossier spécifique comprenant le résultat de sérologies HIV 1&2, Hépatite B, Hépatite C et Syphilis (TPHA/VDRL) datant de moins de 6 mois, un consentement et un contrat signés par le patient, une copie d'une pièce d'identité du patient, est constitué.

Information et consentement (extrait de l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation)

“ ... Le patient, le titulaire de l'autorité parentale s'il s'agit d'un mineur ou le tuteur si la personne est placée sous tutelle donne par écrit son consentement. La restitution ultérieure des paillettes n'est faite qu'au patient lui-même. Au-delà de la première année de conservation, il est nécessaire de s'assurer chaque année de la volonté du patient de poursuivre ou non la conservation. Seul le patient peut exprimer par écrit sa volonté de poursuivre ou de mettre fin à la conservation de ses paillettes. En cas de décès, il est mis fin à la conservation des gamètes ou des tissus germinaux...”

Modalités pratiques de la congélation et de la conservation des spermatozoïdes humains

Les étapes de la cryoconservation sont multiples et indépendantes, elles comprennent : L'analyse du sperme, le choix du milieu cryoprotecteur, le mélange avec le cryoprotecteur, le conditionnement, la congélation, la conservation et, la décongélation.

Liste du matériel (extrait de l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation)

“ ...Pour la congélation et la conservation des gamètes et des embryons et des tissus germinaux, outre le matériel décrit ci-dessus pour la FIV :

- un appareil permettant le conditionnement automatique du sperme en paillettes en cas de volume important d'activité ;*
- une soudeuse de paillette ;*
- un appareil automatisé de descente en température avec bonbonne autoprésurisée ;*
- des cuves de stockage des paillettes dans l'azote liquide ;*
- une cuve d'azote de dépannage.*

Les équipements et les postes de travail sont adaptés en nombre aux locaux et au volume d'activité, notamment en ce qui concerne les incubateurs à CO₂, de façon à éviter des modifications de température et de pH lors d'ouvertures trop fréquentes...”

1/ L'analyse du sperme

Les conditions du prélèvement de sperme et les étapes préanalytique et analytique sont les mêmes que celles décrites dans le [Chapitre III](#). Une sélection des spermatozoïdes peut être utile avant la congélation. Cette dernière se fera comme décrit dans le [Chapitre VI](#).

2/ Le choix du milieu cryoprotecteur

De nombreux milieux cryoprotecteurs adaptés à la congélation de spermatozoïdes ont été testés. Parmi ceux-ci plusieurs sont autorisés et disponibles commercialement (par exemple, Spermfreeze, Cryosperm, Sperm Freezing Medium,...). Bien qu'il n'y ait pas eu à notre connaissance d'études comparatives faites sur un nombre d'échantillons de sperme important, il semble que tous ces milieux présentent une efficacité similaire.

3/ Le mélange avec le cryoprotecteur

La mise en contact avec le milieu cryoprotecteur se fera après liquéfaction du sperme. La quantité

ajoutée au sperme dépend du milieu utilisé (se référer à la notice du fabricant). La dilution est faite à température ambiante, elle doit être progressive afin d'éviter un choc osmotique, soit par adjonction goutte à goutte du cryoprotecteur en agitant régulièrement afin de bien homogénéiser le mélange. Il faut respecter un temps d'équilibration, il se situe le plus souvent entre 5 et 10 minutes (se référer à la notice du fabricant). L'équilibration est faite le plus souvent à température ambiante. Une publication suggère qu'une équilibration à 4°C améliorerait les résultats de la congélation.

4/ Le conditionnement

Actuellement, la majorité des centres autorisés pour les activités de congélation/conservation de sperme humain utilise les paillettes CBS™ Haute Sécurité (Cryobiosystem, France) qui sont conçues pour la cryoconservation d'échantillons biologiques humains. La paillette CBS™ se présente sous forme d'un tube souple transparent en résine ionomère. Elle contient deux parties distinctes séparées par un bouchon de sécurité coulissant en coton de couleur blanche. La première partie contenant le sperme a un volume utile soit de 0,3 ml soit de 0,5 ml. La seconde partie permet l'insertion d'un jonc coloré utile pour repérer plus facilement la paillette dans l'azote liquide. L'identification des paillettes peut se faire à l'aide d'un code-barre ou de tout autre moyen d'identification inscrit sur le fourreau d'identification. Ce dernier pourra être retiré après décongélation permettant d'assurer la traçabilité des échantillons (Figure 1). Les paillettes peuvent être remplies unitairement à l'aide d'un embout stérile et d'une pompe d'aspiration ou d'un micro-aspirateur. La fermeture de la paillette se réalise par soudure grâce à différents appareils comme la soudeuse SYMS. Dans les centres ayant une activité de congélation importante, il existe un système de remplissage de paillette avec soudure automatique et inscription d'un code-barres nommé MAPI (Cryobiosystem).

5/ La congélation

Congélation directement dans l'azote liquide

Procédure

Les paillettes sont positionnées sur un support horizontalement au-dessus d'un container à large col, cylindrique (environ 40 cm de diamètre) de forte capacité, rempli d'azote liquide. Au-dessus du container, il existe un gradient de température en fonction de la distance à l'azote liquide. Les paillettes sont placées 15 à 20 cm au-dessus du niveau liquide. Le support est descendu progressivement vers l'azote liquide sur une période d'environ 10 minutes. Les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide, rangées dans des visotubes de couleur présents à l'intérieur d'un canister et conservées (Figure 1).

Congélation programmée

Actuellement, il existe plusieurs congélateurs programmables sur le marché (Planer, Cryobiosystem), Freezall (Air Liquide, etc..). Ces appareils automatisés sont munis d'une électrovanne assurant une entrée d'azote pressurisée à l'intérieur du système selon le programme utilisé. Le plus souvent la descente en température est programmée selon 3 étapes : à partir d'une température de départ de 20°C ; 1) jusqu'à -10°C avec une vitesse de - 5°C / minute puis, 2) jusqu'à -25°C avec une vitesse de - 10°C / minute puis, 3) jusqu'à -150°C avec une vitesse de - 25°C / minute. Les paillettes sont ensuite immédiatement plongées dans l'azote liquide, rangées dans des visotubes de couleur présents à l'intérieur d'un gobelet positionné dans un canister et conservées (Figure 1).

6/ La décongélation

Procédure

- La paillette, une fois sortie du container, est désinfectée (extérieur) à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool
- La paillette est coupée aux 2 extrémités à l'aide d'une paire de ciseaux désinfectée à l'alcool et uniquement destinée à cet usage
- Le contenu de la paillette est déposé dans un tube à hémolyse
- Le mode opératoire de décongélation dépend en partie du milieu cryoprotecteur utilisé
- Le plus souvent, la décongélation est faite à température ambiante pendant 5 minutes.

Remarque

Dans le cas d'une préparation pour insémination, cette procédure se fera dans des conditions stériles en se référant au Chapitre VI. Dans tous les cas, le fourreau d'identification sera retiré et scotché sur une feuille de traçabilité qui doit accompagner la paillette lors de l'utilisation clinique. Cette feuille mentionne en outre les caractéristiques initiales du sperme, les caractéristiques après décongélation et les résultats des tests de sécurité sanitaires récents.

7/ Test de décongélation

La mobilité est évaluée sur le contenu de la paillette bien homogénéisé, selon la procédure décrite dans le Chapitre III. A partir de cette évaluation, le nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs (« a+b » ou mobilité P) après décongélation par paillette (NSMP) sera calculé de la façon suivante :

$$\text{NSMP} = \frac{\text{Concentration de spermatozoïdes} \times \text{volume de la paillette}}{\text{Facteur de dilution du cryoprotecteur}} \times \text{mobilité P post dégel (\%)}$$

Exemple :

Spermogramme : Volume = 1,7 ml, Concentration = 105×10^6 spermatozoïdes / ml,

Mobilité P ou « a+b » après dégel = 15%.

Facteur de dilution du cryoprotecteur utilisé = 1,7, Volume de la paillette utilisée = 0,3 ml

$$\text{NSMP} = \frac{105 \times 10^6 \times 0,3}{1,7} \times 0,15 = 2,78 \times 10^6$$

Remarque

En cas de mobilité progressive post-dégel nulle, le NSMP est donc égal à 0, ce qui ne signifie pas forcément que les paillettes sont inutilisables. Il faut alors préciser dans la conclusion s'il existe des spermatozoïdes mobiles sur place information capitale pour poser l'indication d'une FIV/ICSI. Dans la même perspective, l'absence totale de mobilité ne signifie pas forcément que les paillettes sont inutilisables : il est alors intéressant de tester (ou de demander au centre d'AMP que soit testé) la vitalité post dégel au moyen du test hypoosmotique (Chapitre III)

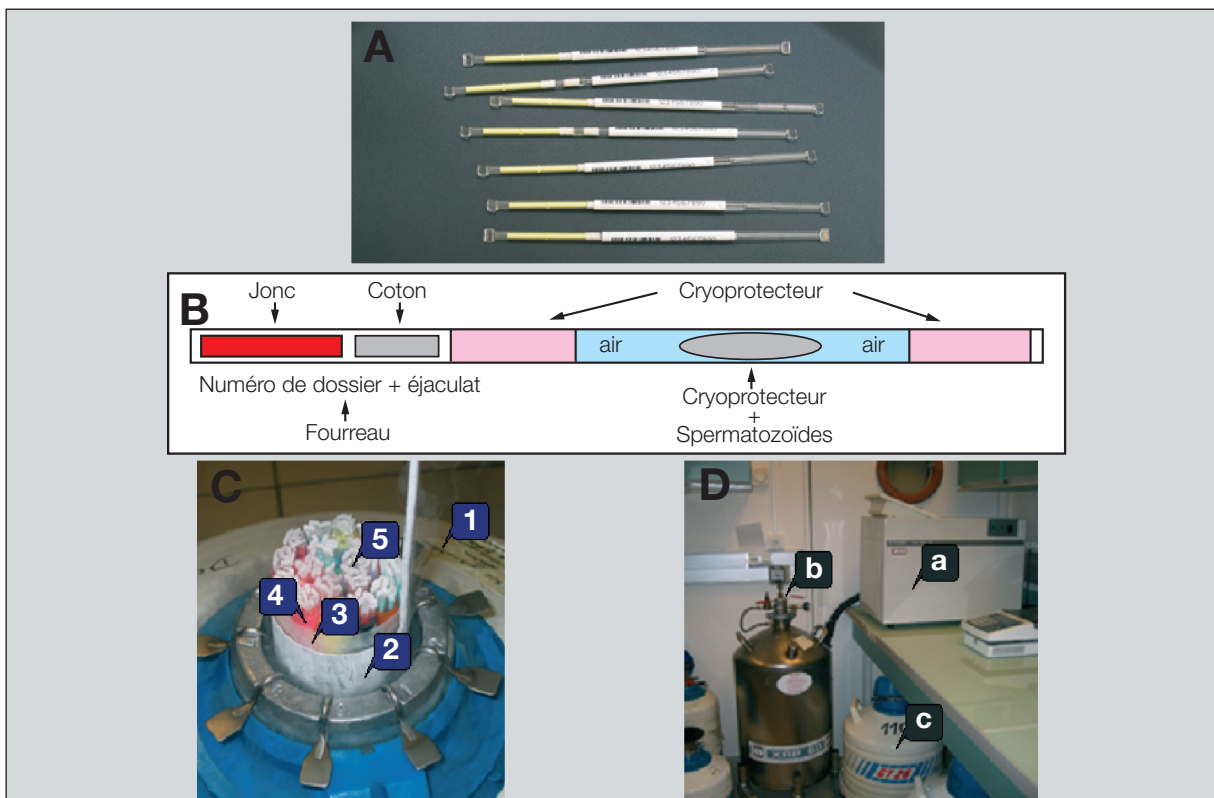
Indication et confection de paillettes dites « en microgoutte »

Cette méthode est proposée le plus souvent en vue d'une AMP de type ICSI dans les cas où les spermatozoïdes sont rares (typiquement, concentration de spermatozoïdes inférieure à $0,5 \times 10^6/\text{ml}$) afin de minimiser le temps de recherche des rares spermatozoïdes dans le volume relativement important de la paillette.

Procédure

- Sélection du sperme comme décrit dans le [Chapitre VI](#)
- Ajouter sur le culot de spermatozoïdes obtenus après sélection environ 0,3 ml de Fercult Hepes (JCD) ou produit similaire
- Ajouter le milieu cryoprotecteur goutte à goutte selon les modalités décrites sur la notice du cryoprotecteur choisi et homogénéiser
- Selon le cryoprotecteur utilisé, le temps de contact est de 5 à 10 minutes maximum
- Monter la paillette à l'aide d'un micro-aspirateur à molette de la façon suivante :
 - aspirer le milieu cryoprotecteur sur une longueur d'environ 1/2 cm
 - faire une bulle d'air
 - aspirer le mélange « sperme + cryoprotecteur »
 - faire une bulle d'air
 - terminer de remplir la paillette de milieu le cryoprotecteur
- Sceller la paillette et identifier la paillette.

Figure 1 : Paillettes Haute Sécurité avec un jonc jaune clair et un fourreau blanc identifiées par un code barre (A) ; schéma du montage d'une paillette « micro-goutte » permettant de concentrer dans un volume réduit les échantillons de sperme de très faible concentration (B) ; organisation du rangement des paillettes (5) dans un container (1). Elles sont placées dans des visotubes (4), eux-mêmes rangés au sein de gobelets (3) placé dans des canisters (2) (C) ; configuration minimale de l'espace de congélation de spermes avec un congélateur à descente thermique programmable (a), relié à un container pressurisé d'azote liquide (b) ; container pour le rangement et le stockage des paillettes à plus ou moins long terme (c) (D).



Stockage et Réglementation des salles de stockage

Registres (extrait de l'arrêté du 11 avril 2008)

“ ... La conservation des gamètes et des tissus germinaux et des embryons fait l'objet d'une inscription dans un registre. Les registres sont conservés dans des conditions de sécurité pendant une durée minimum de trente ans après utilisation clinique. Compte tenu de leur nature, il est conseillé de conserver les registres sans limitation de durée, en veillant strictement à garantir leur confidentialité. S'ils sont sous forme informatique, ils sont conformes aux dispositions législatives et réglementaires..”.

Salles de stockage en azote (extrait de l'arrêté du 11 avril 2008)

“... Les salles de stockage en azote contenant les récipients cryogéniques respectent les dispositions du code du travail sur les locaux à pollution spécifique. L'accès aux salles de stockage est sécurisé et limité au personnel concerné. La porte d'entrée donnant accès à ces salles est signalée par un pictogramme indiquant les risques liés à l'azote et dispose d'un oculus. Ouvrant vers l'extérieur, elle est équipée d'une barre antipanique. Les salles sont organisées de façon à faciliter les manipulations dans et autour des récipients cryogéniques, la circulation du personnel et les interventions en cas d'accident. La conduite à tenir en cas d'incident ou d'accident est affichée à l'entrée de chaque salle de stockage. Une extraction d'air continue, située en partie basse de chaque salle de stockage, compensée par une entrée d'air frais est obligatoire. En cas de forte évaporation d'azote entraînant une baisse significative de la teneur en O₂ de la salle, une extraction d'air forcée est mise en route automatiquement. Celle-ci peut également être déclenchée manuellement. La salle est équipée de capteurs d'oxygène étalonnés régulièrement, permettant la mesure continue de la teneur en O₂. Celle-ci est affichée à l'entrée de la salle. Toute baisse significative de la teneur en O₂ déclenche une alarme locale reportée à une permanence. A défaut d'une possibilité de mise en application immédiate des dispositions précédentes, un plan de mise à niveau validé par le responsable de l'établissement ou du laboratoire est établi...”

Bibliographie

- David G, Czyglik F. (1977) Correlation between initial sperm quality and its ability to tolerate cryopreservation. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 6, 601-610.
- Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. (2005) Successful sperm storage for 28 years. Fertil. Steril, 84, 1017.
- Thépot F, Julliard JC. (1998) French results on medically assisted reproduction with gamete cryopreservation and donation. French Federation of CECOS. Contracept. Fertil. Sex., 27, 452-456.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. (2004) Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology, 48, 146-156.

**Autres approches
diagnostiques
complémentaires
dans le contexte
de l'exploration
des infertilités masculines**

CHAPITRE VIII

Tests génétiques : indications, intérêt pour le diagnostic et le pronostic

Les causes génétiques d'infertilité masculine peuvent toucher le tractus génital ou la spermatogenèse elle-même. S'agissant de cette dernière, son extrême complexité biologique et son caractère séquentiel font qu'une anomalie affectant l'un des très nombreux gènes impliqués interrompra le processus de production des gamètes dans son ensemble et aboutira à un phénotype unique, la diminution ou l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

Le bilan génétique d'un homme infertile sera préférentiellement réalisé en cas d'infertilité idiopathique mais il faut se méfier de certaines autres causes non génétiques, comme une varicocèle ou un antécédent de cryptorchidie, dont la fréquence importante peut masquer une anomalie génique ou chromosomique sous-jacente. En tout état de cause, ce bilan ne devra être lancé qu'après un examen clinico-biologique minutieux permettant de distinguer une infertilité de nature obstructive d'une atteinte de la spermatogenèse. En se limitant aux anomalies génétiques à la portée d'un diagnostic de routine, ce bilan comportera la recherche des anomalies du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dans le premier cas et l'étude du caryotype et du chromosome Y en particulier dans le second.

La technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde ou ICSI a complètement révolutionné le pronostic de l'infertilité chez l'homme. Ainsi, des patients présentant des oligozoospermies extrêmes voire des azoospermies peuvent maintenant avoir des paternités biologiques alors qu'ils auraient été considérés comme définitivement stériles il y a quelques années. Dès lors, déterminer les causes génétiques pouvant être à l'origine de certaines de ces infertilités permet d'apporter un diagnostic sûr et d'éviter des errances médicales pour des couples très désireux d'avoir un enfant. Cela permet également de mesurer le risque éventuel de transmission d'une anomalie grave à un enfant à naître.

Infertilités de nature obstructive : absence bilatérale congénitale des canaux déférents et mucoviscidose

L'absence bilatérale congénitale des canaux déférents (ABCD) représente environ 2% des cas d'infertilité masculine et près de 25% des azoospermies obstructives. Son diagnostic est clinique, échographique et biologique par la constatation d'une azoospermie associée à un effondrement des marqueurs biochimiques séminaux d'origine épидidymaire et vésiculaire. Le fait que cette malformation soit présente chez près de 98% des hommes atteints de mucoviscidose a fait suspecter que les patients inféconds présentant une ABCD isolée pouvaient être atteints d'une forme fruste, ou génitale pure, de cette maladie. Ce type de malformation est à distinguer des ABCD associées à des anomalies rénales (agénésie rénale unilatérale, rein pelvien, etc...) qui ne présentent aucun rapport avec la mucoviscidose. Il est donc nécessaire, au moment de l'échographie de contrôle du diagnostic clinique de ABCD, de demander également une analyse des reins et du tractus urinaire pour connaître le cadre nosologique dans lequel se situe le patient.

La fréquence des sujets porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation du gène CFTR dans la population générale est d'environ 4%. Chez les hommes ABCD, on retrouve une anomalie du gène chez 80%

d'entre eux, la situation la plus fréquente étant la présence d'une mutation grave sur un des allèles (comme la $\Delta F 508$) associée à une mutation mineure sur l'autre ou à un polymorphisme particulier appelé « allèle 5T » dont la fréquence est jusqu'à six fois supérieure à celle trouvée dans la population générale (30% versus 5%). La particularité d'un allèle 5T est d'entraîner une maturation anormale dans 90% des ARNs messagers produits, aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée donc inefficace. Certains sujets dans la population générale sont homozygotes 5T/5T et ne sont pas malades pour autant : ils fonctionnent avec 10% d'ARNs normaux ce qui suffit à la production d'une quantité suffisante de protéine CFTR. Par contre, si un des allèles est inactivé par une mutation grave et que l'autre a son fonctionnement réduit par une mutation mineure ou un allèle 5T, il n'y a plus assez de protéine CFTR normale produite et des signes de mucoviscidose peuvent apparaître, comme une ABCD ou une sensibilité broncho-pulmonaire particulière (bronchites à répétition, sinusite chronique, etc...).

Les patients ABCD peuvent maintenant être pris en charge en ICSI avec prélèvement testiculaire de spermatozoïdes car leur spermatogenèse est le plus souvent normale. Le pronostic pour la descendance est donc lié au statut génétique de leur conjointe chez qui la probabilité d'être hétérozygote est de 1/25 en l'absence d'antécédent familial de mucoviscidose. Il importe donc qu'une étude du gène CFTR soit effectuée dans le couple et non chez l'homme seul. Si cette étude est négative, le risque résiduel de voir naître un enfant atteint de mucoviscidose dépend de la sensibilité du test diagnostique utilisé. En Europe occidentale, les 30 mutations les plus fréquentes sont habituellement recherchées. Cette sensibilité dépend donc de l'origine géographique des patients, origine qu'il faut préciser lors de la prescription du test.

Anomalies chromosomiques et défauts de la spermatogenèse

Par leur fréquence, les anomalies du caryotype représentent une cause génétique majeure de défaut de production des spermatozoïdes. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories, celles affectant le nombre des chromosomes, ou aneuploïdies, et celles touchant leur structure. Si certaines d'entre elles sont associées à un syndrome clinique particulier comme le syndrome de Klinefelter, d'autres peuvent se révéler uniquement par un phénotype d'infertilité.

Selon les critères d'inclusion, notamment la gravité de l'atteinte spermatique et son caractère idiopathique ou non, les fréquences d'anomalies du caryotype retrouvées chez les hommes infertiles sont variables allant de quelques pour cents à plus de 10%, c'est à dire dix à vingt fois celle des mêmes anomalies dans la population générale. Actuellement, un consensus à peu près général fait que l'étude du caryotype ne se justifie que pour les oligozoospermies relativement sévères, ($< 10 \times 10^6$ spermatozoïdes), et pour les azoospermies non obstructives.

Le syndrome de Klinefelter

Classiquement associé à une formule chromosomique de type 47,XXY, le syndrome de Klinefelter représente la cause génétique d'infertilité la plus fréquente puisqu'il affecte environ un nouveau né sur 800 et jusqu'à 10% des patients présentant une azoospermie. En fait, les nombreuses formes en mosaïque, dont la formule 47,XXY/46,XY la plus souvent rencontrée (**Figure 1**), font que certains patients ne présentent qu'une oligozoospermie sévère ou que, pour d'autres, une biopsie testiculaire retrouve des gamètes utilisables en ICSI. L'analyse en hybridation *in situ* fluorescente (FISH) des spermatozoïdes ne révèle que quelques pourcents de gamètes disomiques XY ou XX ce qui montre que ceux-ci sont en fait

produits par des spermatogonies XY. Cependant, l'élévation modérée mais significative du taux de ces gamètes disomiques traduit un environnement testiculaire délétère et un mauvais contrôle de la ségrégation des chromosomes à la méiose dont on peut penser qu'il puisse aussi affecter également d'autres chromosomes comme le 21. L'opportunité d'un diagnostic prénatal en cas de grossesse doit donc être discuté au cas par cas, notamment en fonction des résultats de la FISH sur spermatozoïdes si celle-ci a pu être réalisée (Figure 2).

Les translocations chromosomiques

Parmi les anomalies de structure des chromosomes, les translocations Robertsoniennes entre chromosomes acrocentriques (fusions centriques) (Figure 3) et les translocations réciproques sont retrouvées avec une fréquence 8 à 10 fois supérieure chez les hommes infertiles. La question se pose de savoir comment une anomalie de structure du caryotype peut aboutir à un blocage de la gamétogenèse et ceci préférentiellement dans le sexe masculin. L'explication est probablement mécanique et liée aux mouvements des chromosomes à la méiose dont le moment critique est certainement le stade pachytène au cours duquel les chromosomes homologues vont s'apparier sous forme de bivalents et procéder à des recombinaisons génétiques. À ce stade, les chromosomes X et Y sont également appariés mais sur un segment particulier situé à l'extrémité de leurs bras courts, la région PAR1 (Pseudo-Autosomal Region) mais ils sont surtout inactivés au sein d'une structure facilement identifiable, le corpuscule XY ou vésicule sexuelle. L'étude des chromosomes méiotiques chez des hommes porteurs d'une translocation retrouve très fréquemment une association physique entre les chromosomes transloqués, appariés sous forme de trivalent ou de quadrivalent selon le type de translocation, et le corpuscule XY. Ce contact physique entraîne une diffusion du processus d'inactivation des deux gonosomes aux chromosomes transloqués ce qui aboutit à un déséquilibre d'activité génique et à la mort de la cellule. Chez la femme, la vésicule sexuelle n'existant pas, ce phénomène ne se produit pas ce qui fait que la méiose féminine est beaucoup moins sensible à la présence d'une translocation chromosomique. Il existe cependant une grande variabilité quant à l'atteinte spermatique chez les hommes porteurs d'une translocation chromosomique y compris dans une même famille où des hommes présentant exactement le même remaniement du caryotype peuvent être soit infertiles soit normalement fertiles.

En plus de l'intérêt diagnostique représenté par le fait de déceler une translocation chez un patient infertile, se pose évidemment la question du risque que cette translocation soit transmise à l'état déséquilibré à la descendance obtenue par ICSI. Il est possible de déterminer par FISH le pourcentage de gamètes déséquilibrés mais cela ne donne qu'une indication théorique, le choix du spermatozoïde au moment de l'ICSI se faisant bien sûr à l'aveugle. Cette évaluation du risque doit se faire au cours d'une consultation de conseil génétique pour permettre aux couples de choisir entre un diagnostic prénatal classique (DPN) et un diagnostic pré-implantatoire (DPI).

Microdélétions du chromosome Y

Grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires, véritables bornes jalonnant le chromosome Y, il a pu être décrit des patients dont le chromosome Y paraissait normal au caryotype mais qui étaient porteurs de délétions interstitielles situées dans le bras long, au niveau d'une région connue pour renfermer un facteur dénommé AZF (AZoospermia Factor). Ces délétions, apparaissant *de novo* chez des hommes infertiles, ne sont pas chevauchantes ce qui permet de dire que ce facteur AZF possède une nature multigénique.

Trois sites préférentiels de délétions ont été décrits, définissant les loci AZFa, AZFb et AZFc. La détermination de la séquence du chromosome Y, mettant en évidence de très nombreuses séquences d'origine rétrovirale et de grands segments répétés (amplicons) organisés en palindromes, a révélé que les délétions AZF survenaient par recombinaison anormale entre des séquences homologues situées à des endroits différents du chromosome (recombinaisons homologues non alléliques).

De nombreuses séries de patients azoospermiques ou oligozoospermiques ont été publiées qui montrent que l'incidence des microdélétions du chromosome Y varie de 3% à 28% selon les études du fait de différences d'échantillonnage quant à la gravité de l'atteinte spermatique prise en compte et à son caractère idiopathique ou non. Le chiffre le plus vraisemblable se situe autour de 10%.

Touchant des régions différentes du chromosome Y, les délétions affectent de nombreux gènes et aboutissent à des atteintes testiculaires variables. Les délétions d'AZFa sont le plus souvent associées à la perte des cellules germinales et à un syndrome des cellules de Sertoli seules (SCO), celles d'AZFb à un blocage en méiose et celles d'AZFc à des défauts de la spermatogenèse pouvant être relativement modérés. En effet, certains patients délétés pour AZFc montrent seulement une oligozoospermie, en général sévère, mais qui pourrait expliquer les rares cas de transmission naturelle. Si les relations génotype-phénotype sont bien définies pour les délétions AZFa et AZFb, rendant inutile toute biopsie testiculaire, le diagnostic de l'atteinte testiculaire chez un patient délété pour AZFc doit tenir compte de l'extrême variabilité qui peut exister entre des régions différentes d'un même testicule, voire entre des tubes séminifères voisins, rendant aléatoire le résultat des biopsies. Néanmoins, si des spermatozoïdes sont récupérés chez un patient délété pour AZFc, il est important d'accompagner l'ICSI par un conseil génétique, ne serait-ce que pour prévenir les couples que cette délétion sera transmise à tous les enfants de sexe masculin.

Figure 1 : Mitose 47,XXY et mosaïque 46,XY/47,XXY détectée en FISH chez un sujet Klinefelter (Xc : sonde centromérique du chromosome X ; Yc : sonde centromérique du chromosome Y). Les hommes porteurs de cette mosaïque peuvent produire des gamètes matures utilisables en ICSI.

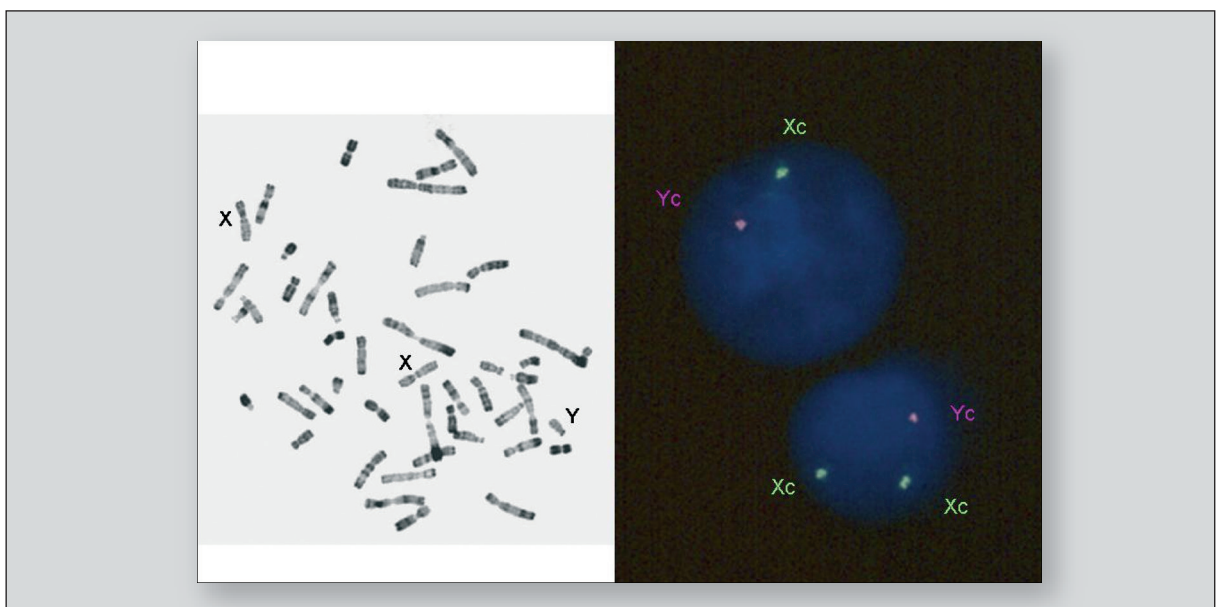


Figure 2 : FISH sur spermatozoïdes avec des sondes spécifiques des chromosomes 13 et 21. Cette technique permet d'évaluer individuellement le taux d'aneuploïdie dans les gamètes.

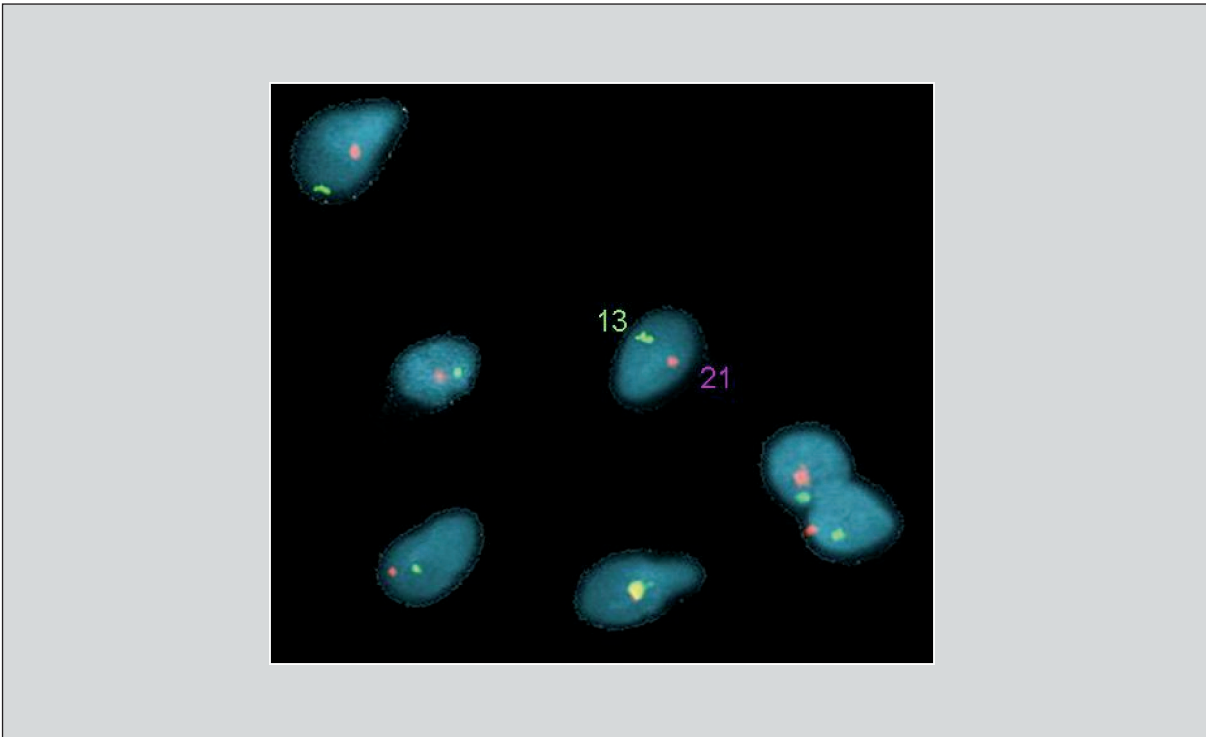
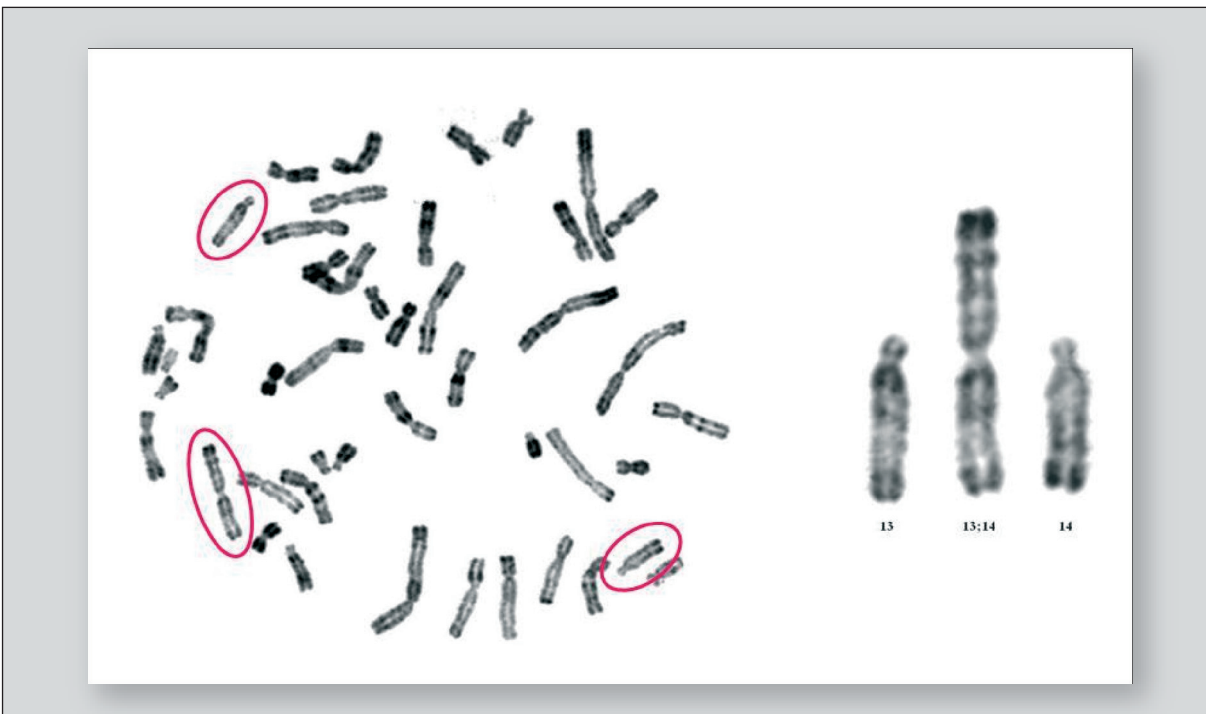


Figure 3 : Translocation Robertsonienne ou fusion centrique entre un chromosome 13 et un chromosome 14. Ce type de translocation s'observe avec une fréquence élevée chez les hommes infertiles.



Dosages hormonaux : indications principales, brefs rappels

Les causes hormonales d'infertilités masculines sont rares, représentant environ 1 % des cas. Il est cependant utile de les dépister, car le traitement hormonal peut dans de rares cas corriger les anomalies de la spermatogenèse et ainsi traiter l'infertilité.

Plusieurs sociétés savantes ont recommandé la réalisation d'un bilan hormonal chez un homme infécond lorsqu'il y a : 1) un spermogramme anormal, notamment une anomalie quantitative témoin d'une spermatogenèse plus ou moins réduite (par exemple lorsque le nombre total de spermatozoïdes est inférieur au seuil de référence de l'OMS, $< 40 \times 10^6$), et/ou 2) une ou plusieurs anomalies de la fonction sexuelle, et/ou 3) des signes cliniques évocateurs d'une endocrinopathie.

Le plus souvent, c'est la présence d'une azoospermie qui conduit à la réalisation d'un bilan hormonal. Il faut cependant penser à la réalisation d'un bilan hormonal lorsque chez un patient infécond s'associent signes cliniques et biologiques (et éventuellement une histoire familiale) évocateurs d'une endocrinopathie.

Quels dosages ?

Les dosages doivent utiliser des techniques parfaitement standardisées et les résultats doivent être interprétés en fonction des normes de référence du laboratoire, normes qui devraient être déterminées à partir d'examens faits chez des hommes en bonne santé et féconds.

Le dosage sérique de l'hormone folliculo stimulante (FSH) permet de faire la distinction entre hypogonadisme, hyper-, hypo- ou normogonadotrope. Il est seulement utile chez des hommes présentant une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (inférieure à 5×10^6 spermatozoïdes par millilitre) qui ont un volume testiculaire normal ou modérément diminué. En cas de suspicion d'altérations de la spermatogenèse, et quand aucune cause n'est identifiée, un taux normal de FSH sérique peut évoquer une obstruction totale ou partielle du transport des spermatozoïdes. Cependant, un arrêt de la maturation au cours de la spermatogenèse peut ne pas être totalement écarté dans ces cas. Une concentration élevée de FSH fait évoquer une atteinte sévère de la spermatogenèse comme le syndrome des cellules de Sertoli isolées (SCSI) ou bien un arrêt de la maturation à un stade précoce avec par exemple la seule présence des spermatogonies ou des spermatocytes de premier ordre. Chez les hommes ayant un volume testiculaire diminué associé à un hypoandrisme, une FSH élevée suggère une atteinte primaire et sévère de la fonction gonadique perturbant à la fois la spermatogenèse et la fonction leydigienne. Si chez ces hommes la FSH est basse, l'hypogonadisme peut être dû à un défaut de la fonction hypothalamo-hypophysaire ou à une tumeur hypophysaire. Pour la classification diagnostique, il n'est pas utile de doser la FSH chez les patients ayant une cause d'infertilité identifiée et une azoospermie ou une oligozoospermie. La mesure de la FSH sérique peut cependant avoir une valeur pronostique. Par exemple, des hommes ayant une oligozoospermie associée à un varicocèle et une FSH élevée ont peu de chance de devenir fertile après cure du varicocèle. Le dosage de la FSH est inutile chez des hommes ayant une concentration de spermatozoïdes supérieure à 5 millions par ml et un volume testiculaire normal.

Le dosage sérique de l'hormone lutéinisante (LH) n'est habituellement pas nécessaire dans l'exploration de routine de l'infertilité masculine. Une valeur basse de testostérone plasmatique associée à une FSH

normale ou basse suffit pour faire le diagnostic d'un hypogonadisme hypogonadotrope. Si un hypoandrisme est d'origine testiculaire, la FSH sera élevée. Certains auteurs ont suggéré qu'un rapport élevé LH/testostérone indiquerait un déficit des cellules de Leydig et serait de mauvais pronostic pour la fertilité mais ceci doit être confirmé.

La concentration de testostérone plasmatique doit être mesurée chez tout homme ayant un hypoandrisme et une FSH normale ou basse. Dans ce cas, une faible concentration de testostérone (typiquement inférieur à 200 ng/dl) indique un hypogonadisme hypogonadotrope d'origine soit hypophysaire soit hypothalamique. La mesure de la testostérone plasmatique peut être utile pour le suivi clinique, notamment du traitement androgénique, d'hommes ayant des signes d'hypoandrisme avec FSH élevée, mais n'a pas d'intérêt pour la classification diagnostique. La mesure de la testostérone plasmatique est aussi indiquée chez des hommes ayant des troubles sexuels (libido diminuée, troubles de l'érection) dans la mesure où ceux-ci peuvent être dus à une faible production d'androgènes. Il est à noter qu'un excès de testostérone, par exemple suite à un apport exogène, freine l'axe gonadotrope et entraîne une diminution de la sécrétion de testostérone intratesticulaire. L'excès d'androgènes est responsable dans 70 % des cas d'une azoospermie et 30 % d'une oligozoospermie.

La mesure de la concentration sérique de prolactine plasmatique doit être aussi demandée chez les hommes ayant des troubles sexuels, comme une baisse de la libido ou des troubles de l'érection ou les hommes ayant un hypoandrisme avec une faible concentration de testostérone et une FSH normale ou basse. Quand la prolactine est élevée, un contrôle est obligatoire. Il peut être utile de prélever à l'aide d'un cathéter trois ou quatre échantillons de sang à un quart d'heure d'intervalle et de ne tenir compte que de la valeur la plus basse: un stress, même mineur comme la pose d'une aiguille intraveineuse, peut augmenter transitoirement la concentration sérique de prolactine. Si la prolactine reste élevée, il faut interroger le patient sur une prise éventuelle de tranquillisants, de sulpiride ou de tout autre traitement pouvant augmenter la prolactinémie. La fonction thyroïdienne doit aussi être évaluée car une hyperprolactinémie peut être associée à une hypothyroïdie. Lorsqu'on trouve à plusieurs reprises une prolactine élevée inexplicée, un examen radiologique de la région hypothalamo-hypophysaire est nécessaire pour rechercher une éventuelle tumeur. Il peut s'agir d'un adénome à prolactine, d'une tumeur de la région hypothalamique comme le craniopharyngiome ou d'une tumeur responsable d'une compression de la tige pituitaire.

La mesure des précurseurs androgéniques d'origine surrénalienne ou testiculaire et des métabolites des androgènes comme la 5-alpha-dihydrotestostérone ou l'oestradiol n'est généralement pas utile. Cependant, la mesure de l'oestradiol est indiquée s'il existe une gynécomastie qui peut être due à une tumeur surrénalienne ou testiculaire. De plus un rapport modifié oestradiol/testostérone fait évoquer des anomalies au niveau de l'aromatase, quelques publications ayant associé ces anomalies avec l'infertilité masculine, mais le sujet demeure controversé.

L'inhibine B est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Sertoli. Elle forme un hétérodimère composé de deux sous-unités alpha et bêta : alpha-bêta A formant l'inhibine A et alpha-bêta B formant l'inhibine B, majoritaire chez l'homme. La régulation de sa sécrétion est encore mal élucidée et fait intervenir les cellules germinales. Elle exerce une inhibition sur la sécrétion de la FSH. La concentration sérique d'inhibine B est corrélée à la concentration et la mobilité des spermatozoïdes éjaculés et au volume testiculaire. L'inhibine B représente donc un marqueur de la spermatogenèse. La technique

actuelle de dosage immuno-enzymatique utilisant deux anticorps spécifiques (type Elisa) permet de distinguer les deux types d'inhibines. Le taux normal d'inhibine B chez l'homme fertile se situe selon les études approximativement entre 100 et 300 pg/ml.

L'AMH est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Sertoli. Sa sécrétion est apicale et basale, la sécrétion apicale étant la plus importante expliquant ainsi une concentration plus élevée d'AMH dans le liquide séminal que dans le plasma. Le dosage d'AMH dans le liquide séminal pourrait être un marqueur de la maturité des cellules de Sertoli et donc de la spermatogenèse.

Bibliographie

- Drodowski M, Belaisch J, Vermeulen A. Endocrinologie masculine. Doin éditeur, collection Progrès en andrologie, 1998
- Fulla Y, Auger J, Allali S, Nonnenmacher L, Jouannet P. (2001). L'inhibine B sérique, marqueur sensible de la production spermatique chez l'homme. Andrologie, 11, 75-99.

Imagerie : indications, principes, iconographie sommaire

L'échographie scrotale est indiquée dans les infertilités d'origine sécrétoire ou excrétoire.

L'échographie des voies génitales complétera le bilan comprenant notamment une échographie par voie endoréctale chez les patients azoospermiques ou oligozoospermiques chez lesquels on suspecte un facteur obstructif.

Enfin, chez certains patients seront réalisées des IRM de carrefour urogénital pour mieux préciser les anomalies visualisées lors de l'échographie endoréctale.

Infertilités d'origine sécrétoire (non obstructives)

À l'interrogatoire sont retrouvés des antécédents de cryptorchidie, d'orchite ou de torsion testiculaire, par exemple. Les testicules sont normaux ou atrophiques à la palpation.

Testicules

Typiquement, l'échographie révèle les testicules hypotrophiques (<10 ml). Plus rarement absents, il faut tenter de les localiser le long des canaux inguinaux ou dans le pelvis. Parfois les testicules sont de volume normal mais il existe des perturbations de l'échostructure du parenchyme testiculaire. Parmi ces anomalies, deux entités se dégagent ; les microlithiases et le nodule testiculaire. Les microlithiases sont des petits spots hyperéchogènes (1 à 2 mm) sans cône d'ombre postérieur. Elles correspondent à des calcosphérites des tubes séminifères.

Il existe 3 stades :

grade 1 : quelques rares microlithiases, <10 par champs d'exploration

grade 2 : entre 10 et 20 microlithiases par champs d'exploration

grade 3 : plus de 20 microlithiases par champs d'exploration.

Il est recommandé de surveiller par une échographie annuelle les patients présentant un grade III car on ignore encore aujourd'hui si les microlithiases sont un facteur prédisposant au développement d'une tumeur.

Un nodule hypoechogène est retrouvé chez 0,5 à 1,5% des patients. S'il est inférieur à 5 mm, une simple surveillance suffit. S'il est supérieur à 5 mm, il peut s'agir d'un séminome ou d'une tumeur non séminomateuse (cellules de Sertoli ou Leydig). Il sera alors proposé une biopsie testiculaire ou un traitement chirurgical.

Cordon spermatique

Le reflux sanguin est à l'origine d'une augmentation de température du testicule. La recherche d'une varicocèle est donc systématique car elle peut aggraver une infertilité sécrétoire. L'atteinte est unilatérale à gauche dans 85% des cas. Pour qu'elle soit significative, il faut observer un reflux de plus de 2 secondes lors d'une manœuvre de valsalva. Le traitement d'une varicocèle peut faire appel à la chirurgie (ligature veineuse) ou à la radiologie interventionnelle (embolisation).

Infertilités d'origine obstructive (excrétoires)

Elles sont liées à une lésion canalaire depuis l'épididyme jusqu'aux canaux éjaculateurs. Les testicules sont cliniquement et échographiquement normaux.

Malformation des voies séminales

Il s'agit des absences uni ou bilatérales des canaux déférents. En cas d'atteinte bilatérale, elle s'associe à une hypospermie. L'échographie testiculaire confirme l'absence uni ou bilatérale des corps et queue des épididymes avec parfois des signes de rétention (dilatation de tube épididymaire, du rete testis ou spermatocèle). Par voie endorectale, on retrouve une absence des ampoules déferentielles, voire des vésicules séminales atrophique ou dystrophique. Il faudra également rechercher une agénésie rénale associée.

Infections du tractus génital

La porte d'entrée des inflammations / infections est le plus souvent prostatique. Cependant, elles diffusent souvent au reste du tractus et peuvent entraîner des sténoses canalaires. On recherche alors

une atteinte des voies séminales sous la forme de lésions hyperéchogènes voire calcifiées, d'une retraction des vésicules séminales. La prostatite chronique se manifeste par un aspect hétérogène hypo ou hyper échogène associé à des calcifications de la zone périphérique.

Kyste du carrefour urogénital

Ils peuvent être d'origine Wolffienne ou Mullerienne et sont parfois compressifs. Les kystes Wolffiens intéressent les canaux éjaculateurs et contiennent des spermatozoïdes. Les kystes Mulleriens sont plus volumineux (>15mm). Lorsqu'ils sont compressifs, ils entraînent une dilatation d'amont et notamment des canaux éjaculateurs.

Figure 1 : Tumeur testiculaire (séminome) découverte en échographie lors d'un bilan d'infertilité

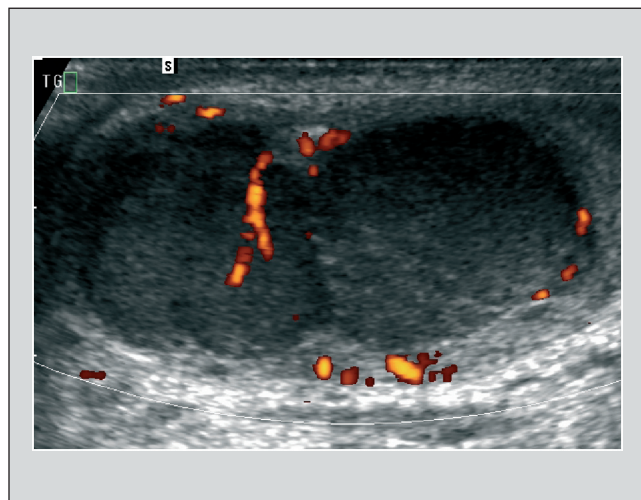


Figure 2 : Microlithiases testiculaires en échographie : grade I (2a) et grade III (2b)

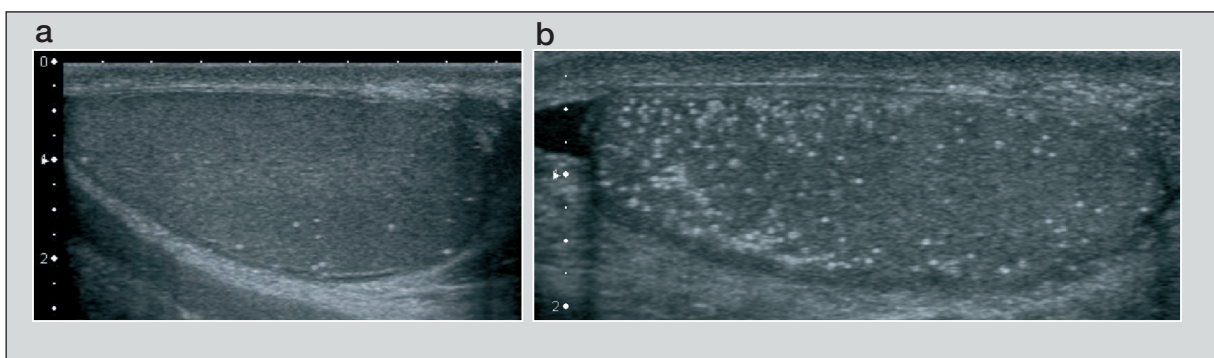


Figure 3 : Varicocèle gauche significative lors de la manœuvre de Valsalva (Echodoppler couleur et pulsé)

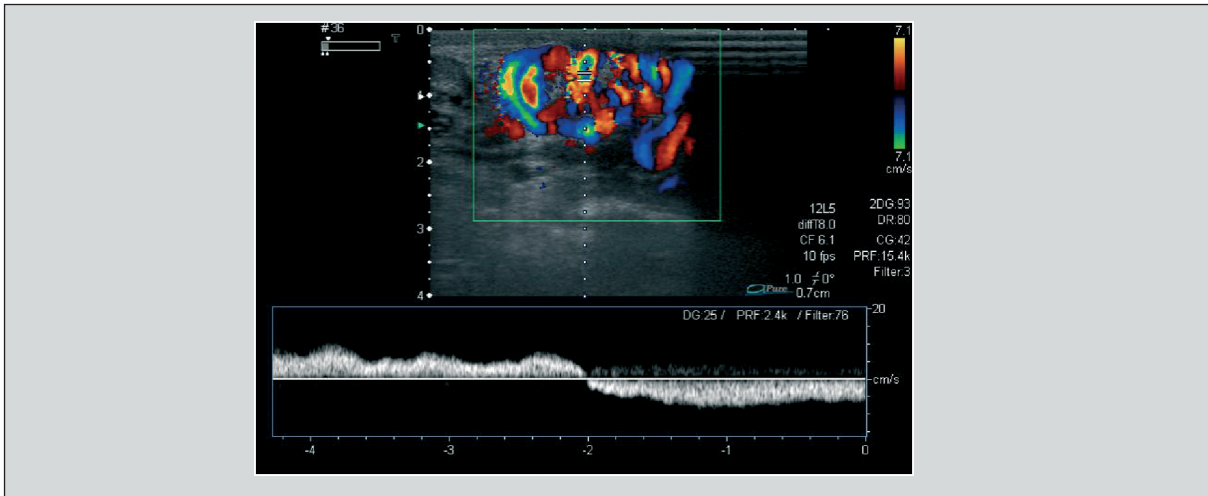


Figure 4 : Retentissement proximal d'un obstacle (échographie) : dilatation épидидymaire (a) du rete testis (b) et spermatocele (c)

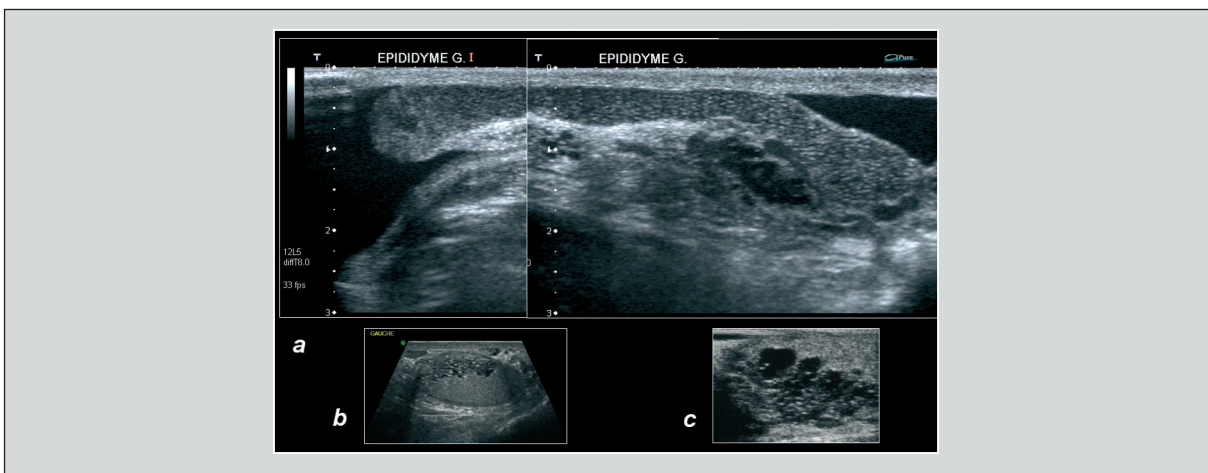


Figure 5 : Remaniement post infectieux de la tête de l'épididyme (a) et nodule post inflammatoire caudal (b)

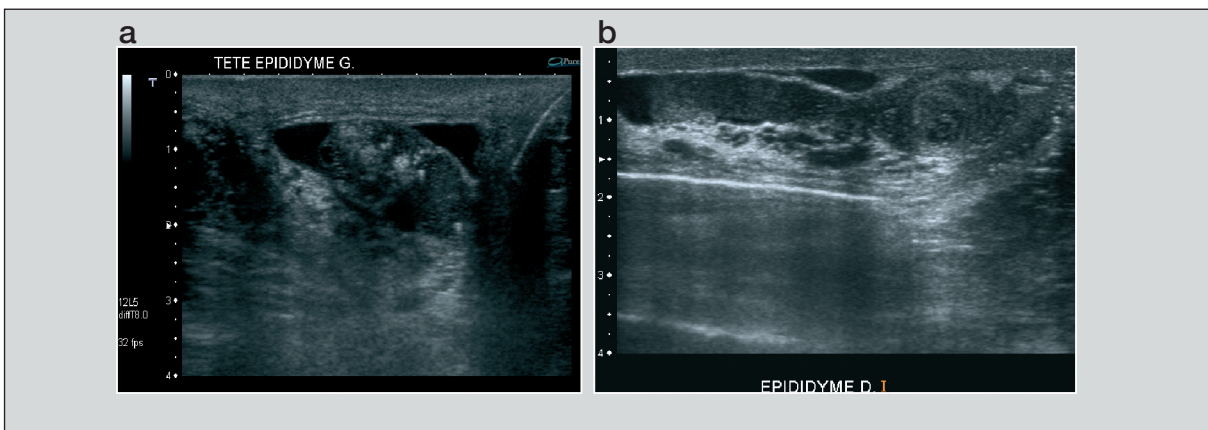


Figure 6 :
Séquelles infectieuses de la vésicule séminale et de l'ampoule déférentielle (échographie voie endorectale)

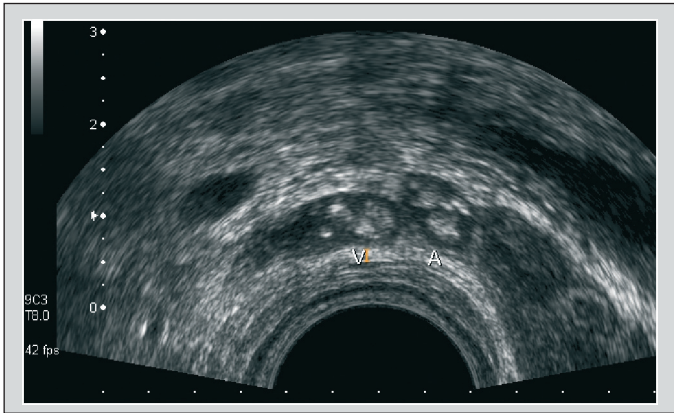


Figure 7 :
IRM : Atrophie de la vésicule séminale droite post infectieuse

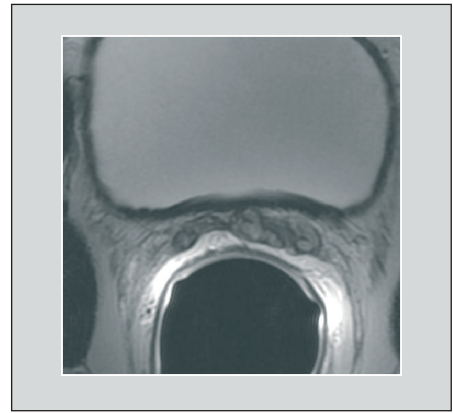


Figure 8 : IRM : Sténose distale des canaux éjaculateurs avec dilatation des vésicules séminales

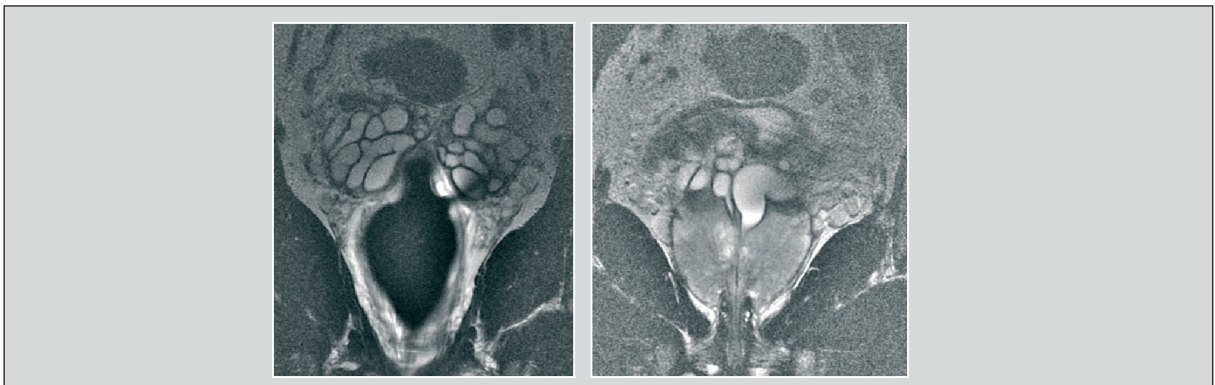


Figure 9 : Séquelles de prostatite (échographie voie endo rectale)

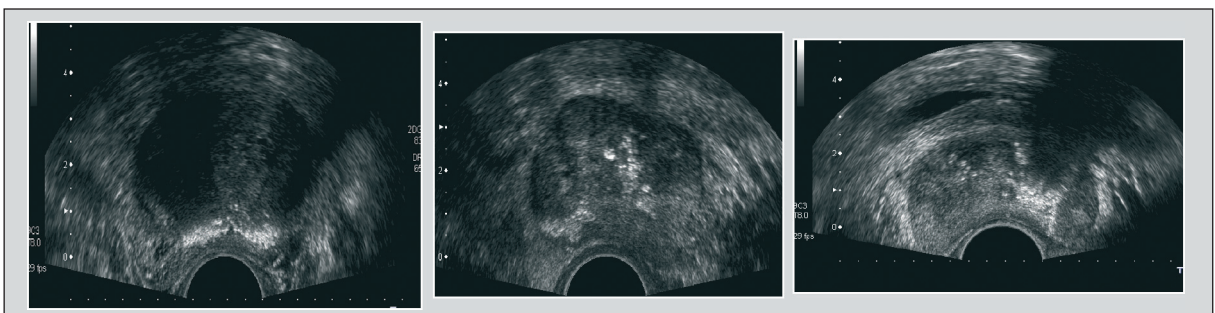


Figure 10 : Absence congénitale bilatérale des canaux déférents (échographie voie endorectale)

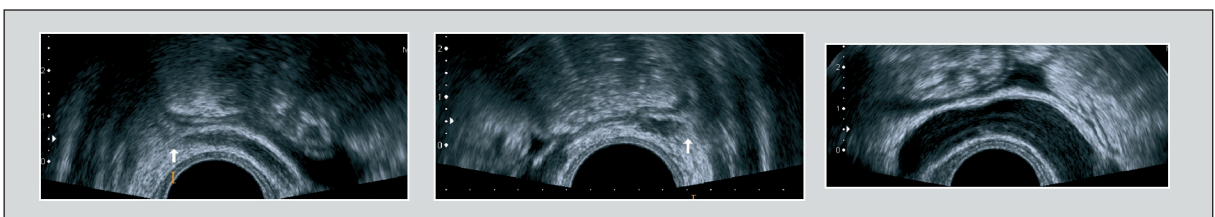


Figure 11 : Kyste median Mullerien (a) et Wolffien (b) (échographie voie endorectale)

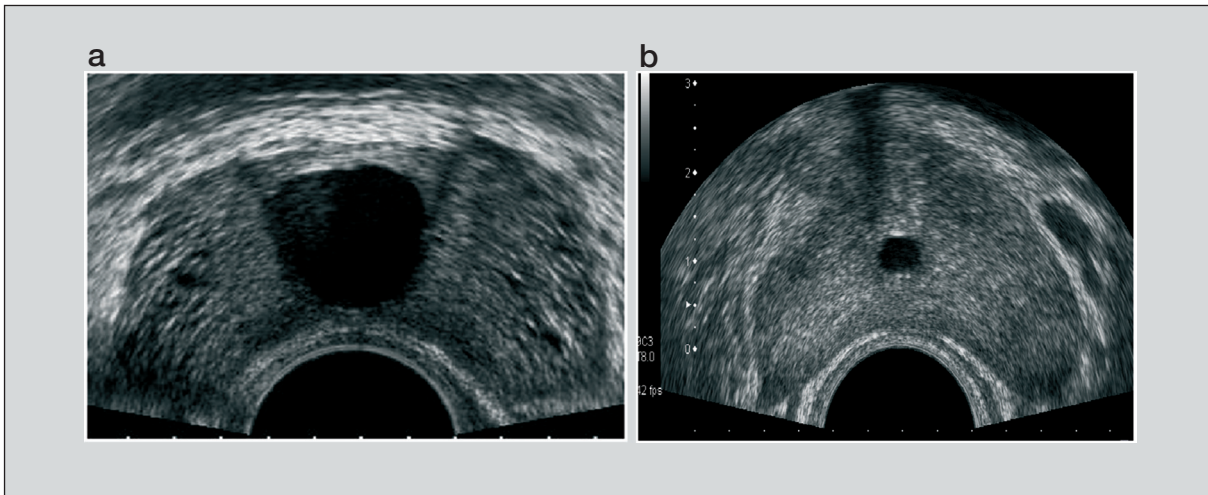
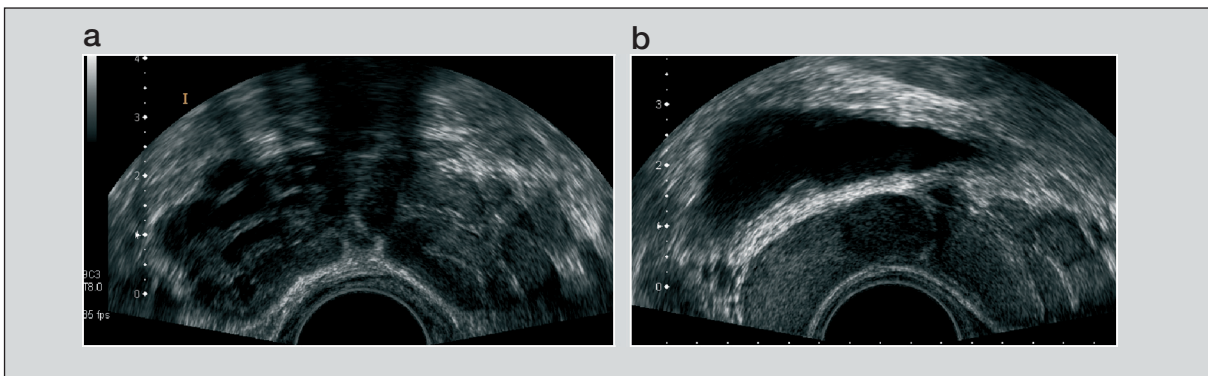


Figure 12 : Kyste médian (a) compressif avec dilatation des vésicules séminales d'amont (b) (échographie voie endo rectale)



ANNEXES

1 - Equipement et matériel au laboratoire de BDR

Le laboratoire doit disposer d'une pièce permettant à l'homme d'effectuer les gestes de désinfection préalables au recueil et de recueillir son sperme dans de bonnes conditions.

Equipements

- Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- Réfrigérateur / congélateur
- Armoire à solvants
- Centrifugeuse et ultracentrifugeuse
- Etuve
- Incubateur CO₂
- Microscope équipé d'optiques de contraste de phase, d'objectifs x10 (et/ou x20), x40 et, x100 à immersion, oculaires x10 dont un avec micromètre, et, de platine thermostatée
- Balance de laboratoire
- Osmomètre
- Agitateur Vortex
- Compteur
- Pipettes automatiques
- Pipette à déplacement positif
- Hémocytomètre (cellule de Neubauer modifiée ou cellule de Malassez)
- Petit matériel de laboratoire courant (lames, cônes etc..).
- Matériel de sécurité (gants, masques, blouses, trousse de première urgence..) et de désinfection
- Réceptacles stériles (réceptacles à col évasé dédiés au recueil de sperme)
- Préservatifs spéciaux sans spermicide
- Milieux et réactifs pour le diagnostic, la sélection, la préparation ou la congélation des spermatozoïdes.

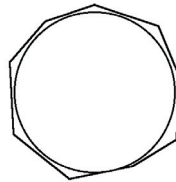
2 - Réglage d'un microscope

Réglage de l'uniformité de l'éclairage du champ microscopique

Lorsque l'image semble non uniformément éclairée, il est probable que les optiques ne soient plus en ligne, à l'usage, le microscope se dérègle.

Procédure (méthode de Köhler)

- Mettre 1 lame vierge sur la platine
- Sélectionner l'objectif pour lequel le réglage est désiré ainsi que la position du condenseur lumière transmise (0)
- Fermer le diaphragme de champ (en bas)
- Fermer le diaphragme du condenseur
- Faire la mise au point : une image polygonale apparaît et les bords doivent être les plus nets possible (si le condenseur est décentré l'image apparaît décentrée et il faut la recentrer à l'aide des vis de part et d'autre du condenseur)
- Régler la position (hauteur) du condenseur de telle manière que les bords (liseré) de l'hexagone soient ni bleu ni rouge et tirent le plus possible vers le jaune
- Réouvrir le diaphragme de champ afin que les bords du diaphragme se situent un peu à l'extérieur des bords du champ comme ci-dessous



- Réouvrir le diaphragme du condenseur : l'illumination du champ est maintenant homogène.

Note

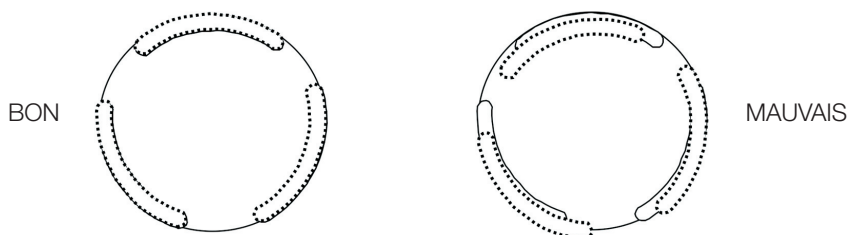
Attention, c'est parfois la lampe qui est en cause et demande à être centrée si le modèle de microscope le permet.

Réglage du contraste de phase

Ce réglage doit être fait à chaque fois que l'image en contraste de phase ne donne pas des contrastes nets et apparaît non uniforme voire en relief : cela est dû à un dérèglement ou un mauvais réglage des anneaux de phase qui ne sont pas en ligne avec le condenseur, l'objectif et la source de lumière.

Procédure

- Sélectionner l'objectif pour lequel le réglage est désiré ainsi que la position du condenseur correspondante (Ph1 pour x10, Ph2 pour x40)
- Oter un des deux oculaires
- Placer le dispositif de réglage de la phase fourni avec le microscope dans le logement de l'oculaire : on observe alors trois fentes courbes alignées sur le bord d'un cercle
- Il faut que la lumière arrive exactement dans l'axe des 3 fentes et pour cela il faut jouer sur les 2 molettes de réglage situées à droite et à gauche du condenseur (ne pas confondre avec les vis de centrage du condenseur) en contrôlant visuellement dans le même temps.



- C'est réglé. Défaire le dispositif oculaire du réglage et remettre l'oculaire.

Savez-vous si des hommes de votre famille ont des problèmes d'infertilité :

Oui Non Ne sait pas

Si oui, précisez :

Dans l'enfance, les testicules étaient-ils bien descendus dans les bourses :

Oui Non

Si non, précisez : à gauche à droite deux côtés

Descente effectuée : spontanément
traitée chirurgicalement à quel âge ? [.:]
traitée médicalement

Le ou les testicules ne sont pas descendus

Avez-vous eu des infections uro-génitales ?

(orchite, épидидymite, blénnorrhagie, « chaude pisse ») Oui Non

Si oui, indiquez : le nombre d'épisodes

la date du dernier épisode

le germe en cause si vous le connaissez

Avez-vous été traité ? Oui Non

Si oui, en quelle année ? [.::]:.]

Avez-vous eu un traumatisme testiculaire important ? Oui Non

Avez-vous eu des calculs urinaires ? Oui Non

Vous a-t-on opéré :

D'une hernie inguinale ? Oui Non

Si oui, de quel côté : à quel âge [.:]

Sur les voies génitales ? Oui Non

Si oui, précisez..... à quel âge [.:]

Avez-vous eu : une hydrocèle Oui Non

opérée ? Oui Non

Si oui, à quel âge [.:]

un varicocèle (varice au niveau des bourses) Oui Non

opéré ? Oui Non

Si oui, à quel âge [.:]

Avez-vous présenté une maladie grave ? Oui Non

Si oui, précisez laquelle :

Avez-vous déjà fait :

Des examens de sperme (spermogramme) ? Oui Non

D'autres examens dans ce domaine ? Oui Non

Si oui, merci de nous faire parvenir les résultats dans la mesure du possible

Dans les trois derniers mois :

Avez-vous été malade ? Oui Non

Avez-vous eu une forte fièvre ? Oui Non

Avez-vous pris des médicaments ? Oui Non

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT VOTRE FEMME

Grossesses ou naissances antérieures en dehors du couple actuel

Y a-t-il eu dans un couple antérieur de la femme	
Une naissance	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui, à quelle date	Mois [.:] Année [.:]
Un début de grossesse	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui, y a-t-il eu :	
Fausse-couche	Mois [.:] Année [.:]
Une interruption volontaire de grossesse	Mois [.:] Année [.:]

A-t-elle eu une maladie ou une affection de l'appareil génital ?

Oui Non

Si oui, précisez :

A-t-elle été traitée pour des infections génitales ou urinaires ?

Oui Non

Si oui, précisez la date:

A-t-elle été opérée au niveau de l'appareil génital ?

Oui Non

Si oui, précisez :

Les cycles (durée séparant 2 périodes de règles) :

Sont-ils : Réguliers Irréguliers

Y a-t-il une ovulation Oui Non

Cochez les examens que votre femme a déjà faits et le résultat si vous le connaissez :

	Normal	Anormal	Ne sait pas
<input type="checkbox"/> Courbe de température	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Test de Hühner	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Dosages hormonaux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Radio de l'utérus (hystérosalpingographie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Coelioscopie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nous vous remercions d'avoir rempli ce questionnaire

4 - Assurance qualité au laboratoire de BDR

Les laboratoires effectuant des actes de biologie médicale pouvant inclure l'analyse du sperme tout comme les laboratoires spécifiquement spécialisés dans ce domaine ont le devoir de produire des résultats fiables nécessaires aussi bien dans la démarche diagnostique que pour l'établissement de stratégies thérapeutiques appropriées. Dans le domaine de l'infertilité, au schéma classique de l'exploration biologique d'un patient pour lequel on suspecte une pathologie se substitue un schéma plus complexe à de nombreux égards: couple généralement en bonne santé versus individu malade ou suspect de maladie, recueil du sperme par masturbation versus prélèvement d'échantillon biologique fait par un tiers, analyse essentiellement subjective versus analyse parfaitement standardisée à l'aide d'un automate et finalement, absence de normes établies de la qualité spermatique versus valeurs seuil au delà desquelles existent des conditions pathologiques.

L'analyse du sperme correspond à un ensemble de procédures de laboratoire complexes dont la plupart repose sur l'évaluation microscopique et donc sur des facteurs humains. Aussi, au laboratoire de biologie de la reproduction, le contrôle de qualité (CQ) des analyses biologiques est encore plus indispensable que pour les autres actes de biologie médicale essentiellement effectués à l'aide d'automates. Le laboratoire effectuant des actes de biologie de la reproduction doit donc mettre en place un programme d'assurance qualité spécifique à ce domaine garantissant que les résultats qu'il produit sont précis et reproductibles quels que soient sa taille et son niveau d'activité. Le contrôle de qualité des analyses biologiques, n'est qu'une étape de l'assurance qualité, concept plus vaste. Tous les événements successifs, de la prescription médicale jusqu'au rendu des résultats, peuvent influencer la qualité des résultats et contribuent donc à la qualité de la prise en charge des patients ainsi qu'à la cohérence inter laboratoire des résultats. L'arrêté du 2-11-94 énonce les principes généraux pour la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). Ce texte stipule que tout laboratoire doit avoir un guide des procédures opératoires détaillées accessible à tous. Ce guide doit notamment décrire les techniques pratiquées mais aussi les mesures de sécurité, de nettoyage, etc...

Dans le domaine de la biologie de la reproduction, les procédures et modes opératoires doivent être établies par chaque responsable de l'assurance qualité dans le laboratoire se référant aux textes réglementaires en vigueur ([voir Annexe 7](#)), aux documents techniques disponibles (manuel de l'OMS, présent Cahier, etc...) et aux possibles spécificités opérationnelles du laboratoire (volume d'activité, personnel impliqué, etc...). Le GBEA ne précise cependant pas les conditions de contrôle de la bonne exécution.

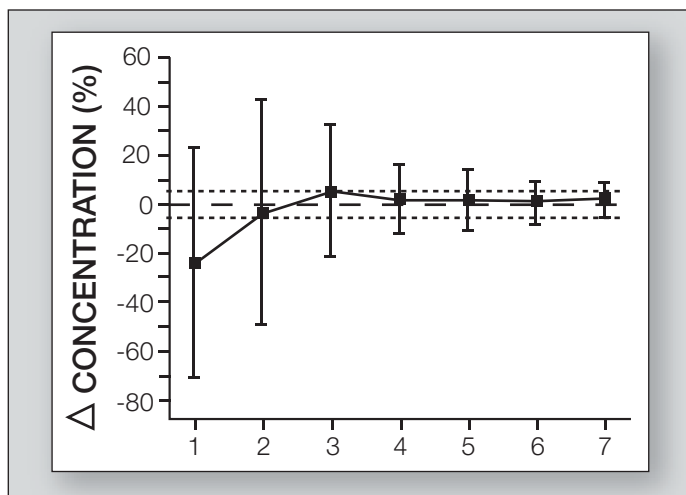
Aussi, il faut dans ce domaine se référer aux documents techniques disponibles. Pour les raisons mentionnées plus haut qui distinguent les spécificités des pratiques de la biologie de la reproduction, l'optimisation des étapes aussi bien analytiques que pré et post analytiques est encore plus cruciale que pour les explorations biologiques classiques ([Tableau 1](#)).

Concernant l'étape analytique, il faut tout d'abord souligner la nécessité impérieuse d'une formation théorique et pratique initiale compte tenu notamment de la spécificité du domaine et de nature subjective des évaluations microscopiques. Dans l'idéal, au terme de cette formation et avant que le technicien novice ne puisse être jugé apte à produire des résultats fiables, il faudrait s'assurer de la concordance de ses évaluations avec celles faites par un (ou plusieurs) technicien(s) expérimenté(s). Un exemple concernant l'évaluation de la concentration est donné ([Figure 1](#)).

Tableau 1 : Assurance qualité en BDR. Exemple pour le spermogramme-spermocytogramme, des actions contribuant à la qualité, et personnel(s) possiblement concerné(s).

Etapas successives habituelles		Exemples d'actions contribuant à l'assurance qualité	Personnel(s) possiblement concerné(s) dans le laboratoire
Etapas pré analytiques	<i>Prescription</i>	Instructions claires sur les modalités de prélèvement données au patient directement ou par téléphone (par exemple, importance de recommander une abstinence sexuelle)	Agent d'accueil / secrétaire ou technicien / biologiste
	<i>Prélèvement</i>	Sperme obtenu par masturbation et collecté dans un réceptacle spécifique, dans le laboratoire Il est important de noter tous les événements au cours des 3 mois précédant qui pourraient moduler voire altérer les résultats	Agent d'accueil / technicien / biologiste
	<i>Transport de l'échantillon</i>	Généralement pas de transport	-
	<i>Conservation de l'échantillon</i>	Pas de conservation (échantillon manipulé dès que la liquéfaction est survenue)	-
	<i>Préparation de l'échantillon</i>	Pas de préparation particulière	-
Etape analytique	<i>Analyse de l'échantillon</i>	Utilisation de procédures standardisées (par exemple celles décrites dans le présent cahier)	Technicien / biologiste
Etapas post analytiques	<i>Validation analytique et biologique des résultats</i>	Copie correcte des résultats sur la feuille de compte rendu à partir de la feuille de paillasse (données manquantes, données aberrantes,...) Validation générale (CQI et EEQ réguliers)	Technicien / biologiste
	<i>Présentation des résultats</i>	Pas de variation attendue compte tenu de l'utilisation d'une feuille de résultats standard	-
	<i>Conclusion et envoi des résultats</i>	Veiller à avoir des délais optimaux pour l'envoi des résultats au médecin prescripteur	Biologiste / Secrétaire

Figure 1 : Comparaison des évaluations de la concentration spermatique sur des séries successives d'échantillons de sperme évaluées par un technicien novice et un technicien expérimenté (d'après Mortimer).



Les différences en pourcentage entre novice et expert sont reportées sur l'axe des Y, les séries successives d'évaluations (minimum 10 à 15 spermatozoïdes) sur l'axe des X. Les traits pointillés désignent la zone d'acceptabilité. Sont présentées les valeurs successives moyennes du delta de concentration avec l'écart-type. On voit ainsi qu'il faut au moins 4 séries de spermatozoïdes analysés pour parvenir à une valeur moyenne et un écart type acceptable et 6 séries pour obtenir des résultats satisfaisants c'est à dire très similaires entre les techniciens novice et expérimenté.

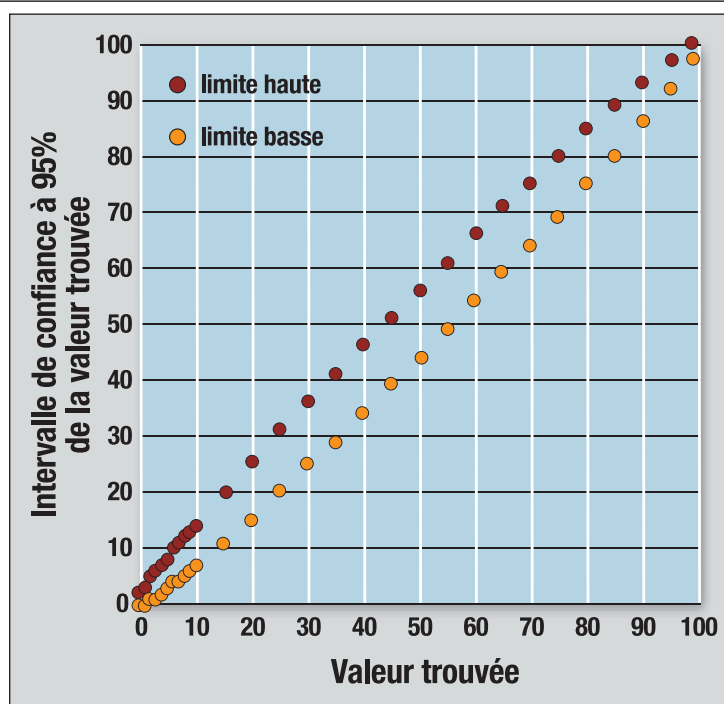
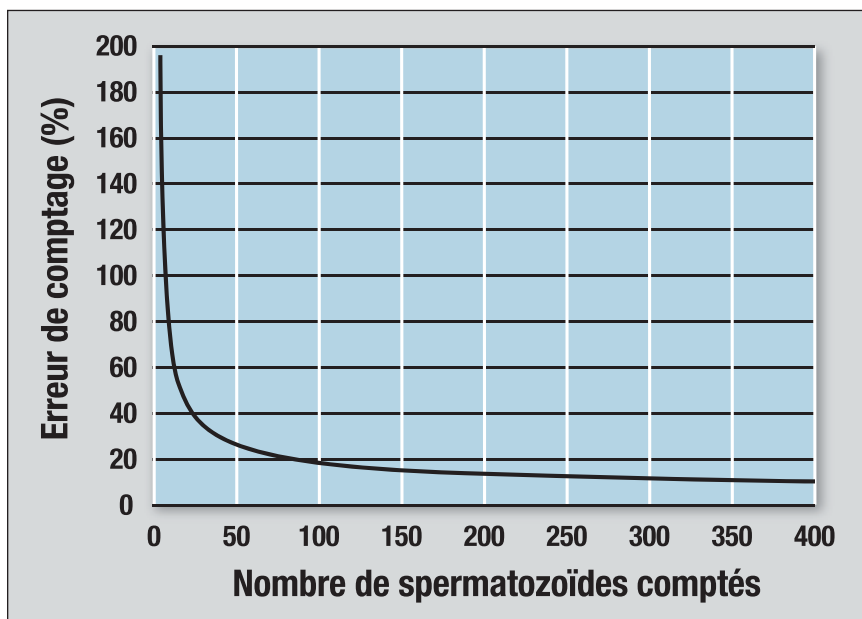
Pour l'évaluation de la morphologie selon la classification de David modifiée, et après une formation théorique suffisante, s'assurant notamment que les définitions des différentes catégories morphologiques sont comprises et utilisées, le technicien pourra lire « à l'aveugle » une trentaine de lames de qualités diverses déjà évaluées par un technicien expérimenté. Un traitement statistique portant sur le degré de concordance entre les évaluations (estimé en première intention par un test de corrélation de Spearman) et la moyenne des différences novice/expérimenté (estimé en première intention par un test de Wilcoxon apparié) permettent une première appréciation de la qualité des résultats fournis par le novice. Cette analyse peut faire ressortir des erreurs systématiques qui doivent être corrigées par un entraînement supplémentaire suivi d'une nouvelle évaluation.

Concernant le rendu des résultats, il peut être utile de définir des procédures standardisées en cas de valeurs critiques pouvant soit nécessiter une action particulière auprès du clinicien prescripteur (par exemple, lors de la mise en évidence pour la première fois d'une azoospermie) soit déclencher une alerte si des données aberrantes ou inusuelles sont produites (par exemple, % de spermatozoïdes mobiles > % de spermatozoïdes vivants).

Erreurs liées à l'échantillonnage et/ou au comptage

Le biologiste doit savoir qu'aussi bien les conclusions d'une analyse que l'interprétation des différences de résultats d'un technicien à l'autre ou pour un même patient, d'un examen au suivant doivent absolument tenir compte des erreurs liées à l'échantillonnage et/ou au comptage. En effet les valeurs produites de concentration (en millions/ml), mobilité ou morphologie typique se fondent sur une évaluation d'un nombre limité de spermatozoïdes (de l'ordre d'une ou plusieurs centaines quand cela est possible). Du à ce petit nombre mais également à l'hétérogénéité du sperme, le postulat que le petit échantillon de spermatozoïdes à partir desquels ces caractéristiques ont été évaluées est représentatif de l'ensemble de l'échantillon ne peut s'appliquer : en fonction du nombre de spermatozoïdes évalués il y a une erreur de comptage plus ou moins importante et un intervalle de confiance plus ou moins large autour de la valeur fournie (Figure 2).

Figure 2 : Erreur liée au comptage (%) en fonction du nombre de spermatozoïdes comptés (A). Intervalle de confiance (en Y) de la valeur trouvée (en X) lorsque 200 spermatozoïdes sont évalués, il peut s'agir par exemple du pourcentage de spermatozoïdes typiques.



Contrôle interne et externe de la qualité

Une autre partie essentielle de l'assurance qualité dans le laboratoire de BDR concerne la mise en place de procédures de contrôle de qualité (CQ) pour déterminer l'exactitude et la précision de chaque méthode analytique. Le contrôle de qualité interne (CQI) a pour but de détecter et corriger si nécessaire les erreurs systématiques et de mesurer et contribuer à réduire la variabilité parfois importante entre les résultats de plusieurs observateurs du même laboratoire. Le CQI concerne la qualité des examens fournis au sein du laboratoire : le laboratoire fournit-il des résultats similaires d'un technicien à l'autre et reproductibles pour chacun des techniciens ? Le CQI est donc essentiel. L'idéal serait de pouvoir disposer d'échantillons contrôlés fournis dans un cadre institutionnel, à défaut disponibles dans le commerce. Malheureusement, dans le domaine de la BDR, de tels échantillons ne sont pas encore disponibles en France. Comme dans d'autres domaines de la biologie, un autre aspect important de la qualité, pour une prise en charge

optimale des patients est celui de la cohérence inter-laboratoire. A défaut, un patient peut être considéré comme infertile sur la base des résultats d'un laboratoire et fertile par rapport aux résultats d'un autre laboratoire. La recherche de cette cohérence est donc primordiale. En BDR, certaines procédures habituelles de l'évaluation de la qualité inter-laboratoire (ou évaluation externe de la qualité, EEQ, ou encore, contrôle de qualité externe, CQE) peuvent être généralisées.

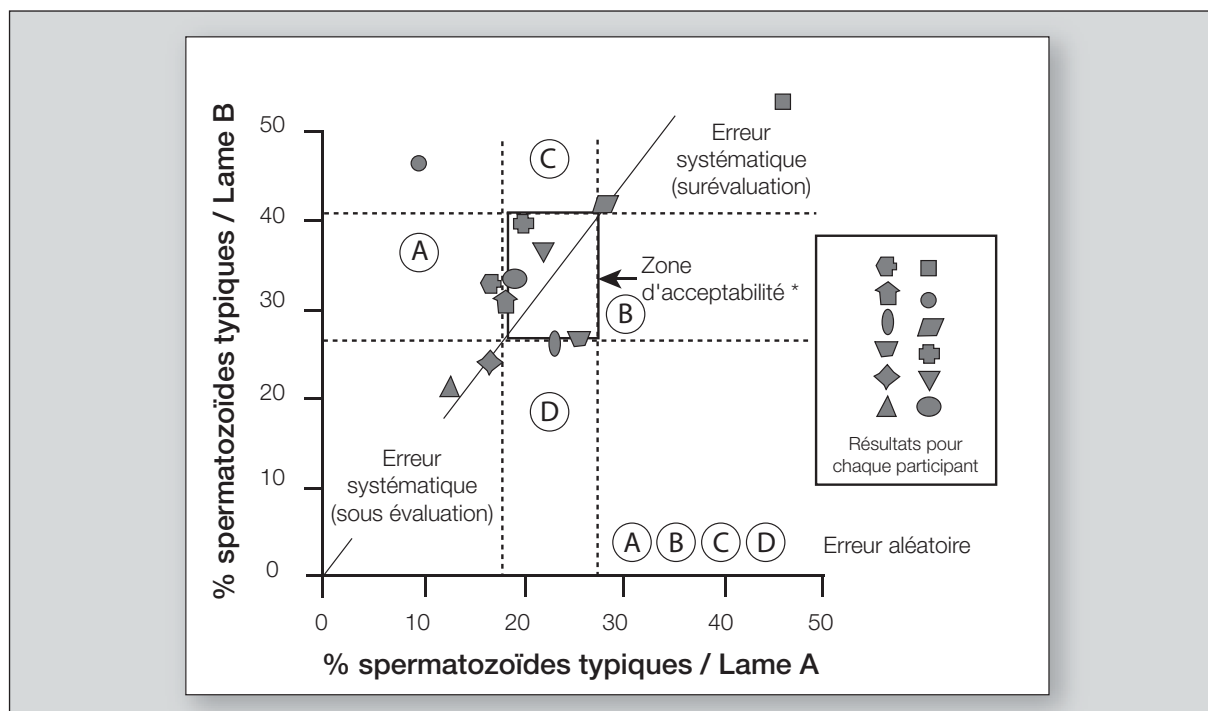
Remarque

La plupart des méthodes publiées pour le contrôle de qualité en BDR concerne majoritairement le spermogramme-spermocytogramme (on se référera par exemple au manuel de laboratoire de l'OMS, voir référence plus loin). Dans les pays où des contrôles de qualité régionaux ou nationaux existent, ils sont aussi focalisés sur l'analyse de routine du sperme. Il est donc nécessaire de mettre en place des contrôles de qualité portant sur les autres caractéristiques mesurées lors des examens complémentaires sur le sperme, par exemple, le test aux immunobilisants ou l'analyse du mouvement des spermatozoïdes par vidéomicrographie assistée par ordinateur. D'une manière plus générale, tous les actes du laboratoire de BDR devraient faire l'objet de procédures régulières de contrôle de qualité.

Propositions générales d'organisation du contrôle de qualité interne des différentes caractéristiques évaluées lors du spermogramme-spermocytogramme

La précision des techniques devrait être testée à intervalles réguliers, une fois par mois par exemple, par l'estimation de la variabilité intra et inter-technicien. L'interprétation de ces mesures doit plutôt tenir compte des causes des différences intra et inter-observateur que du degré de concordance entre observations ou entre observateurs. En dehors du coefficient de variation (CV = écart-type/moyenne (%)) qui résume la variabilité intra et inter observateur, d'autres méthodes peuvent apporter plus d'information en considérant (surtout par expression graphique) les différences entre observations individuelles. Ces méthodes sont multiples et ne sont pas détaillées ici. On pourra se référer au manuel de laboratoire de l'OMS (en anglais). Un exemple de méthode graphique bien connu des biologistes est le diagramme de Youden qui s'applique parfaitement aux caractéristiques du sperme dans des évaluations ponctuelles ou longitudinales (Figure 3).

Figure 3 : Diagramme de Youden lors d'évaluations conjointes du pourcentage de spermatozoïdes typiques sur deux lames de référence.



* Des valeurs de référence pertinentes doivent être utilisées pour définir la zone d'acceptabilité. Dans cet exemple, cette zone a simplement été définie à partir des valeurs moyennes pour chaque lame $\pm 20\%$: ce n'est pas une cible appropriée car elle est très influencée par les valeurs extrêmes.

Remarque

L'utilisation du coefficient de variation, CV, est simple et permet d'apprécier la variabilité en première instance. Il faut toutefois savoir que lorsqu'il s'agit d'événements rares, un faible écart des évaluations influence très fortement le CV.

Volume / pH

La mesure du volume (aspiration de l'éjaculat dans une pipette graduée ou pesée avec tubes prépesés), du pH (bandelettes ; méthode de référence : pH-mètre) ne doivent occasionner que de très faibles écarts intra et inter technicien. Cette variabilité devrait cependant être mesurée.

Concentration

Pour les besoins du CQI, des spermatozoïdes peuvent être poolés. Le pool peut ainsi être aliquoté après une homogénéisation soignée et les aliquotes ainsi constitués congelés pour une mesure régulière de la concentration des spermatozoïdes afin de juger des éventuelles variations au fur et à mesure du temps pour un même technicien et d'un technicien à l'autre. Des aliquotes de spermatozoïdes à l'état frais analysés le jour même peuvent aussi être utilisés sur une période de plusieurs jours après adjonction d'un fixateur. Il est important que le CQI porte sur des échantillons de qualité diverse représentatifs de ce qui est habituellement analysé au laboratoire. La variabilité liée à la confection de la préparation (dilution, montage de l'hémocytomètre, etc...) et la variabilité liée à l'étape de numération elle-même doivent être appréciées séparément et globalement. Le biologiste doit répartir les préparations pour permettre l'estimation à l'aveugle de la variabilité intra et inter technicien. Pour les laboratoires qui en disposent, le résultat de référence peut être celui de la concentration mesurée sur un système CASA, ([Chapitre V](#)).

Mobilité

Pour déterminer le degré de précision des estimations de la mobilité, plusieurs techniciens peuvent analyser de manière indépendante la même préparation de sperme frais. Des aliquotes de sperme (poolées ou non) peuvent être congelées et analysées à intervalles réguliers ou en l'absence de possibilités de congélation, le contrôle peut être fait à partir d'enregistrements vidéo. Ces deux dernières possibilités ne sont pas idéales car les conditions de l'analyse de routine (évaluation du sperme frais au microscope) ne sont pas reproduites. Là encore, il est important que le contrôle porte sur des échantillons de qualité diverse représentatifs de ce qui est habituellement analysé au laboratoire et que le biologiste répartisse les préparations pour permettre l'estimation à l'aveugle de la variabilité intra et inter technicien. Il n'existe pas de méthode objective permettant un résultat de référence similaire au résultat fourni par la méthode de classification visuelle en 4 catégories (a, b, c, d, [Chapitre III](#)). Cependant avec une calibration adéquate, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles total mesuré sur un système CASA pourrait servir de référence pour la somme des catégories «a»+«b» = Mobilité P ([Chapitre III](#)). Une méthode simple pour l'auto-évaluation de la mobilité spermatique a été décrite ([Tableau 2](#))

Tableau 2 : Méthode quantitative d'évaluation de la mobilité totale (« a »+ « b »+ « c » ou mobilité P + NP) pour le contrôle de qualité. (Méthode de B. Keel)

Matériel nécessaire :
<ul style="list-style-type: none">• Hémocytomètre, Ringer, Ringer formolé, Pipette à déplacement positif
Principe :
<ul style="list-style-type: none">• Mettre dans une chambre de l'hémocytomètre le sperme dilué au 20^{ème} dans du Ringer formolé• Mettre dans l'autre chambre une aliquote du même sperme dilué dans du Ringer• Après 1 minute compter dans cette dernière chambre, sur toute la chambre, le nombre de spermatozoïdes immobiles Ni• Compter ensuite dans l'autre chambre, sur toute la chambre le nombre total de spermatozoïdes Nt• Calculer le nombre de spermatozoïdes mobiles Nm = Nt-Ni• Calculer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles = (Nm /Nt) x 100.

Vitalité et Morphologie

Pour l'évaluation régulière de la variabilité du compte des spermatozoïdes vivants et de l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes, soit par le même, soit par différents techniciens, il faut tout d'abord réaliser une collection de frottis colorés à partir d'échantillons de qualité variées (lames montées).

Différents schémas peuvent être proposés, pour apprécier le rôle de la confection du frottis et celui de la lecture dans la variabilité. Par exemple, à partir d'un sperme donné, chaque technicien fait sa préparation puis chacun lit sa lame et celle des autres. L'étude de la variabilité doit porter non seulement sur le pourcentage de spermatozoïdes normaux mais également sur la classification des différentes anomalies morphologiques et sur le calcul de l'IAM. Il n'y a pas de méthode de référence.

Moyennes mensuelles

Si l'activité du laboratoire est suffisamment importante ($\geq 50-100$ examens de sperme par mois), la comparaison des moyennes mensuelles du laboratoire pour la concentration, la mobilité et la morphologie avec les résultats fournis par chaque technicien peut être utile pour détecter s'il existe des infléchissements.

En résumé :

pour qu'un contrôle de la qualité des examens du sperme soit efficace :

- 1) il faut disposer de procédures opératoires standardisées utilisées par l'ensemble des personnels impliqués
- 2) s'assurer par des contrôles préalables que la formation de base théorique et pratique des personnels impliqués est suffisante
- 3) avoir des procédures de contrôle intra- et inter-technicien et une méthodologie d'évaluation parfaitement définies (matériel biologique, organisation du contrôle, méthode utilisée pour avoir un résultat servant de référence, tests statistiques utilisés, interprétation des résultats et procédures pour corriger d'éventuelles déviations, fréquence des contrôles,...).

La standardisation des actes relatifs à la biologie de la reproduction et la mise en place de procédures d'assurance qualité dans les laboratoires ayant ce type d'activité devrait permettre une meilleure prise en charge globale des couples infertiles, avec en particulier des gains au niveau de la durée moyenne nécessaire pour parvenir à un diagnostic suivi du traitement le plus adéquat. D'autre part l'optimisation des différentes étapes doit permettre d'éviter la multiplication des examens (examens complémentaires inutiles dans le contexte ou renouvellement d'examens déjà fait à cause de leur caractère peu fiable). Ces deux points doivent normalement contribuer à un abaissement du coût global « démarche diagnostique/traitement ».

Bibliographie

WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press. 4^{ème} édition révisée (1999). (Une nouvelle édition est à paraître en 2009-2010)

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, Matribi SE, Gony B, Keskes L, Kolbezen M, Lamarte A, Lornage J, Nomal N, Pitaval G, Simon O, Virant-Klun I, Spira A, Jouannet P. (2000) Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod. 15, 2360-2368.

5 - Valeurs de référence des caractéristiques du sperme, terminologie usuelle en cas d'anomalies

Valeurs de référence des caractéristiques du sperme

Les valeurs de référence usuellement utilisées sont celles publiées dans la dernière édition du manuel de l'OMS de 1999, à l'exception de celles de la morphologie (Tableau 1).

Tableau 1 : Valeurs de référence de l'OMS, 1999. (pour une abstinence sexuelle comprise entre deux et huit jours et pour un sperme analysé selon les techniques décrites dans le manuel de l'OMS).

Volume de l'éjaculat	≥ 2,0 ml
pH	7,2 - 8,0
Concentration de spermatozoïdes	20 x 10 ⁶ / ml et plus
Nombre total de spermatozoïdes	40 x 10 ⁶ par éjaculat et plus
Vitalité	≥ 50 % de spermatozoïdes vivants
Mobilité	≥ 50 % de spermatozoïdes progressifs (classes -a- + -b-) ou ≥ 25% de spermatozoïdes rapides et progressifs (-a-)
Morphologie	≥ 30 % de spermatozoïdes morphologiquement normaux*
Leucocytes	< 1 x 10 ⁶ / ml

* Classification de l'OMS de 1992 ; ce chiffre serait sensiblement le même avec la classification de David modifiée (Slama et al., 2002). Dans l'édition de 1999, il n'y a pas de seuil réellement proposé. Une valeur indicative de 15% correspond à ce qui a été trouvé avec la classification dite des critères stricts dans le modèle FIV.

Remarque importante

Le manuel de l'OMS pour l'examen des spermatozoïdes humains et de leur interaction avec le mucus cervical (OMS 1987, 1992, 1999) a largement été diffusé dans les laboratoires de par le monde ayant une activité de biologie de la reproduction. Dans ce manuel, des valeurs seuil concernant les différentes caractéristiques du sperme sont proposées (Tableau 1 ; dernière édition du manuel, 1999 sauf pour la morphologie, édition de 1992). Cependant, l'interprétation et l'application de ces valeurs seuil ont une valeur très relative. En effet, elles résultent d'une compilation à partir de plusieurs populations d'hommes mal définies, les données provenant également de laboratoires dont il n'était pas certain que la méthodologie d'analyse était strictement comparable. Ces données sont donc un pis aller dans l'attente de données plus fiables obtenues à partir de populations homogènes d'hommes féconds, partenaires de femme enceinte ou jeunes pères de famille. Au plan international, il n'y a pas de consensus autour de ces valeurs, certains centres les considérant trop hautes ou trop basses, selon leurs propres valeurs et pour une caractéristique donnée. Par exemple, la valeur "normale" ou de "référence" de la concentration de spermatozoïdes de 20x10⁶/ml (WHO 1987, 1992, 1999) a été considérée trop basse parce qu'il a été récemment montré que la probabilité de grossesse naturelle est essentiellement linéaire avec des concentrations de sperme jusqu'à 40-50x10⁶/ml atteignant un plateau à partir de ces valeurs.

La question des valeurs de référence pour la morphologie spermatique typique est aussi un vaste sujet de controverse notamment lié à la coexistence de plusieurs systèmes de classification fondés sur des critères

différents. Il faut enfin souligner qu'il existe des différences géographiques parfois notables dans les valeurs des caractéristiques du sperme dans des populations par ailleurs comparables.

La nouvelle édition du Manuel de l'OMS à paraître prochainement devrait présenter des valeurs de référence modifiées obtenues à partir de populations homogènes de jeunes pères de famille. Il faut toutefois noter que le caractère non universel des valeurs regroupant des données de plusieurs parties du monde ainsi que le choix d'une méthode d'analyse de la morphologie différente de celle utilisée majoritairement en France conservera un caractère relatif à ces valeurs.

Terminologie

Comme il est souvent difficile de décrire avec des mots et des chiffres toutes les variations du sperme par rapport aux valeurs normales, au début des années 70 une terminologie a été proposée pour identifier le type d'altération concernée. Il est important de remarquer que cette nomenclature concerne seulement certains paramètres spermatiques et n'implique aucun facteur de causalité. Ceci précisé, la terminologie peut être utilisée comme suit (Tableau 2).

Tableau 2 : Terminologie courante en cas d'anomalies des caractéristiques du sperme (en référence aux valeurs seuil proposées par l'OMS, 1999)

Normozoospermie	Caractéristiques de concentration, mobilité et morphologie spermatiques considérées comme normales en fonction des valeurs de référence usuelle (classiquement, les valeurs de référence de l'OMS)
Oligozoospermie	Concentration des spermatozoïdes inférieure à 20×10^6 / ml
Asthénozoospermie	Moins de 50 % des spermatozoïdes présentant une mobilité progressive (MP ou classes "a"+"b" de l'OMS) (ou moins de 25 % des spermatozoïdes ayant un mouvement de type "a")
Térazoospermie	Moins de 30 % des spermatozoïdes présentant une morphologie typique*
Oligo-asthénotérazoospermie	Indique que les trois variables sont perturbées (la combinaison de seulement deux des préfixes beaucoup moins utilisée)
Azoospermie	Absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat
Aspermie	Absence d'éjaculat
Leucocytospermie	$\geq 1 \times 10^6$ /ml

* Classification de l'OMS de 1992 ; ce chiffre serait sensiblement le même avec la classification de David modifiée (Slama et al., 2002)

Bibliographie

WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press. 4ème édition révisée (1999). (Une nouvelle édition est à paraître en 2009-2010)

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. (1998) Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet. 352:1172-1177.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. (2002) Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. Hum Reprod. 17, 503-515.

6 - Comptes rendus de spermogramme - spermocytogramme et de test de sélection-survie

Exemple 1 : Spermogramme-spermocytogramme

INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées			
Numéro de dossier : JC000			
Nom : GRE ...	Prénom : N.	Date de naissance : 17/03/82	
Examen demandé par : Dr ENF ...		Date du test : 02/10/2008	Délai d'abstinence préalable au test : 4 j
		Lieu de recueil : Laboratoire	
SPERMOGRAMME			
VOLUME : 0,3 ml	pH : 6,8	Viscosité :	normale <input type="checkbox"/> augmentée <input checked="" type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/>
CONCENTRATION :			
Examen direct :	0	x 10 ⁶ spermatozoïdes/ml	
Après centrifugation :	0		0,4 x 10 ⁶ cellules rondes/ml
NUMÉRATION TOTALE :	0	x 10 ⁶ spermatozoïdes	
MOBILITÉ :			
		à ... minutes	à ... heures
		sur x spermatozoïdes	sur x spermatozoïdes
Progressifs (P)	Rapide et progressif (a)	%	} a+b : %
	Lent et progressif (b)	%	
Non progressif (NP)	Mobile sur place (c)	%	} a+b : %
Immobilés (I)	Immobilé (d)	%	
VITALITÉ : %	Présence d'agglutinats : <input type="checkbox"/>		
SPERMOCYTOGRAMME			
Sur x spermatozoïdes observés		SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES : %	
TÊTE	PIÈCE INTERMÉDIAIRE	FLAGELLE	
Allongée :	Reste cytoplasmique :	Absent :	
Amincie :	Grêle :	Ecourté :	
Microcéphale :	Angulée/désaxée :	Calibre irrégulier :	
Macrocéphale :		Enroulé :	
Tête multiple :		Multiple :	
Région post-acrosomique anormale :		INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) :	
Flagelles isolés : 0		Polynucléaires : 2	
Spermatozoïdes en lyse : 0		Autres cellules : 1	
Cellules de la lignée germinale : 0		Fragments cellulaires : 0	
CONCLUSION			
Très faible volume. pH acide. Viscosité augmentée. Aucun spermatozoïde observé, à le xamen direct, après centrifugation et, sur frottis après coloration.			
(Dr X. FILE)			

Commentaire

Il faut avant tout s'assurer qu'il n'y a pas eu une perte d'une partie de l'éjaculat. Sinon, ce résultat est fortement évocateur d'une agénésie des canaux déférents (ABCD), possiblement aussi une obstruction des canaux éjaculateurs. Il s'agit probablement d'une azoospermie obstructive (notez que la lecture du frottis ne retrouve pas de cellules de la lignée germinale). Il sera donc nécessaire de contrôler le résultat après 3 mois et, si le résultat est confirmé, un bilan biologique comprenant biochimie séminale et dosages hormonaux sera demandé.

INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées

Numéro de dossier : **OSS117**

Nom : **SOM ...**

Prénom : **A.**

Date de naissance : **13/11/72**

Délai d'abstinence préalable au test : **3 j**

Examen demandé par : **Dr PAP ...**

Date du test : **05/11/2000**

Lieu de recueil : **Laboratoire**

TEST DE SELECTION DES SPERMATOZOÏDES

Méthode : Gradient de densité

Volume de sperme utilisé : 2,0 ml

CARACTERISTIQUES DU SPERME

	Avant sélection	Après sélection	Après 24h	
VOLUME :	3,3 ml	0,75 ml		
CONCENTRATION : (x10 ⁶ spermatozoïdes/ml)	101	34		
MOBILITÉ :				
Progressifs (P)	Rapide et progressif (a) Lent et progressif (b)	30% 25% } a+b : 55%	60% 15% } a+b : 75%	50% 20% } a+b : 70%
Non progressif (NP)	Mobile sur place (c)	5%	5%	5%
Immobiles (I)	Immobile (d)	40%	20%	25%
VITALITÉ :	83%	97%	92%	

NOMBRE TOTAL DE SPERMATOZOÏDES

MOBILES PROGRESSIFS SELECTIONNES : 19,1 X 10⁶

SOIT POUR L'ÉJACULAT ENTIER : 31,5 X 10⁶

SPERMOCYTOGRAMME

Sur 100 spermatozoïdes observés **SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES : 32%**

TÊTE		PIÈCE INTERMÉDIAIRE		FLAGELLE	
Allongée :	0	Reste cytoplasmique :	0	Absent :	2
Amincie :	11	Grêle :	1	Ecourté :	0
Microcéphale :	5	Angulée/désaxée :	9	Calibre irrégulier :	2
Macrocéphale :	0			Enroulé :	2
Tête multiple :	0			Multiple :	0
Région post-acrosomique anormale :	16				
Région acrosomique anormale :	59				

INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) : 1,57

CONCLUSION

Très bonne sélection et survie positive.

(Dr X. FILE)

Exemple 3 : Spermogramme-spermocytogramme + test de sélection-survie

INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées			
Numéro de dossier : JB007			
Nom : TUT ...	Prénom : P.	Date de naissance : 28/02/67	
Examen demandé par : Dr MAM ...		Date du test : 13/07/2008	Lieu de recueil : Laboratoire
SPERMOGRAMME			
VOLUME : 5,5 ml	pH : 7,9	Viscosité :	normale <input type="checkbox"/> augmentée <input checked="" type="checkbox"/> forte <input type="checkbox"/>
CONCENTRATION :	4,8 x 10 ⁶ spermatozoïdes/ml	2,8 x 10 ⁶ cellules rondes/ml	
NUMÉRATION TOTALE :	26,4 x 10 ⁶ spermatozoïdes		
MOBILITÉ :	à 60 minutes	à heures	
	sur 100 spermatozoïdes	sur x spermatozoïdes	
Progressifs (P)	Rapide et progressif (a) 5%	} a+b : 15%	- %
	Lent et progressif (b) 10%		- %
Non progressif (NP)	Mobile sur place (c) 5%		- %
Immobilés (I)	Immobile (d) 80%		- %
VITALITÉ : 44%	Présence d'agglutinats : <input type="checkbox"/>		
SPERMOCYTOGRAMME			
Sur 100 spermatozoïdes observés	SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES : 0%		
TÊTE	PIÈCE INTERMÉDIAIRE	FLAGELLE	
Allongée : 5	Reste cytoplasmique : 11	Absent : 8	
Amincie : 27	Grêle : 4	Ecourté : 1	
Microcéphale : 4	Angulée/désaxée : 24	Calibre irrégulier : 7	
Macrocéphale : 0		Enroulé : 21	
Tête multiple : 3		Multiple : 2	
Région post-acrosomique anormale : 68			
Région acrosomique anormale : 98	INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) : 2,83		
Flagelles isolés : 4	Polynucléaires : 6		
Spermatozoïdes en lyse : 0	Autres cellules : 3		
Cellules de la lignée germinale : 7	Fragments cellulaires : 0		
Remarques :			
CONCLUSION			
Viscosité augmentée. Production spermatique un peu faible. Faibles vitalité et mobilité progressive.			
Aucun spermatozoïde morphologiquement typique observé. IAM élevé. (Dr X. FILE)			

Commentaire

Comme dans l'exemple 2, l'évaluation de la mobilité secondaire n'est pas faite en raison de la demande conjointe de test de sélection-survie.

INTITULÉ DU LABORATOIRE / Biologistes / Coordonnées

Numéro de dossier : **JB007**

Nom : **TUT ...**

Prénom : **P.**

Date de naissance : **28/02/67**

Délai d'abstinence préalable au test : **6 j**

Examen demandé par : **Dr MAM ...**

Date du test : **13/07/2008**

Lieu de recueil : **Laboratoire**

TEST DE SELECTION DES SPERMATOZOÏDES

Méthode : Gradient de densité

Volume de sperme utilisé : 4,8 ml

CARACTERISTIQUES DU SPERME

	Avant sélection	Après sélection	Après 24h
--	-----------------	-----------------	-----------

VOLUME :	5,5 ml	0,25 ml	
-----------------	--------	---------	--

CONCENTRATION :	4,8	0,22	
------------------------	-----	------	--

(x10⁶ spermatozoïdes/ml)

MOBILITÉ :

Progressifs (P)	Rapide et progressif (a)	5% } a+b : 15%	0% } a+b : 10%	0% } a+b : 5%
	Lent et progressif (b)	10% }	10% }	5% }
Non progressif (NP)	Mobile sur place (c)	5%	5%	5%
Immobiles (I)	Immobile (d)	80%	85%	90%

VITALITÉ :	44%	37%	22%
-------------------	-----	-----	-----

NOMBRE TOTAL DE SPERMATOZOÏDES

MOBILES PROGRESSIFS SELECTIONNES : 0,006 X 10⁶

SOIT POUR L'ÉJACULAT ENTIER : 0,007 X 10⁶

SPERMOCYTOGRAMME

Sur 100 spermatozoïdes observés

SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES : 2%

TÊTE	PIÈCE INTERMÉDIAIRE	FLAGELLE
Allongée : 4	Reste cytoplasmique : 1	Absent : 21
Amincie : 12	Grêle : 0	Ecourté : 4
Microcéphale : 1	Angulée/désaxée : 9	Calibre irrégulier : 13
Macrocéphale : 0		Enroulé : 19
Tête multiple : 2		Multiple : 2
Région post-acrosomique anormale : 79		
Région acrosomique anormale : 87		

INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) : 2,59

CONCLUSION

Sélection de quelques milliers de spermatozoïdes mobiles progressifs. Vitalité après sélection non améliorée et chutant à 24h. Pas d'amélioration du profil morphologique après sélection.

(Dr X. FILE)

Commentaire

Le résultat d'un tel test dans le contexte d'une infécondité orientera vers la réalisation d'une AMP par FIV avec micromanipulation (ICSI) compte tenu du très faible nombre de spermatozoïdes supposés fonctionnels dans la préparation.

7 - Aspects réglementaires en BDR et AMP

Texte relatif aux aspects purement diagnostic

L'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) s'applique bien entendu aux actes diagnostics d'analyse du sperme et de biologie de la reproduction.

Textes relatifs à l'AMP

- Arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation
- Décret n° 2008-891 du 2 septembre 2008 relatif à l'importation et à l'exportation des produits du corps humain (inclus l'importation et l'exportation de gamètes)
- Décret n° 2008-588 du 19 juin 2008 transposant en matière de don de gamètes et d'assistance médicale à la procréation la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004
- Arrêté du 18 décembre 2008 fixant les éléments d'information relatifs au signalement d'un incident ou d'un effet indésirable dans le cadre du dispositif de vigilance relatif à l'assistance médicale à la procréation
- Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique
- Décret n° 2006-1660 du 22 décembre 2006 relatif au don de gamètes et à l'assistance médicale à la procréation et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires)
- Décret 2008-588 du 19 juin 2008 (R. 2142-1) relatif à l'autorisation des centres et des praticiens pour les activités cliniques et biologiques d'AMP

(Les dossiers de demande d'autorisation des centres et d'agrément individuel des praticiens peuvent être téléchargés à partir du site de l'Agence de la Biomédecine).

Sites Internet

Tous ces textes peuvent être consultés à partir des sites Legifrance (<http://www.legifrance.gouv.fr>) et de l'Agence de la Biomédecine (<http://www.agence-biomedecine.fr>).

8 - Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM au 9/04/2009)

Diagnostic : Examens de base

0070	Spermogramme et spermocytogramme	B 110
0071	Test post-coïtal (TPC) ou test de Hühner	B 45

Diagnostic : Tests complémentaires

0072	Exploration biochimique de la fonction prostatovésiculaire	B 175
0073	Exploration de la fonction épидидymaire	B 85
D015	Prélèvement de sperme	BHN 50
0074	Etude de l'éjaculat fractionné	B 130
D001	Valorisation complémentaire de étude de l'éjaculat fractionné (car équivalent à 2 spermogrammes)	BHN 90
0075	Test de migration-survie (TMS) des spermatozoïdes	B 120
D002	Valorisation complémentaire de test de migration-survie des spermatozoïdes (car le TMS nécessite une analyse complète de la fraction de spermatozoïdes sélectionnée équivalant à un 2 ^{ème} spermogramme qui n'est pas suffisamment prise en compte dans la nomenclature)	BHN 130
D003	Supplément pour test de migration-survie des spermatozoïdes sur éjaculat cumulé (analyses du 2 ^{ème} prélèvement réalisé à 1 ou 2h d'intervalle)	BHN 190
0076	Recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS) fixés sur les spermatozoïdes	B 50
0077	Recherches indirectes d'ACAS (homme)	B 280
0078	Test de pénétration croisé spermatozoïdes/mucus cervical	B 120
0079	Recherche d'une immunisation anti-spermatozoïdes (femme)	B 280
D004	Supplément pour recherche d'une immunisation anti-spermatozoïdes (femme) lorsque l'on a recours à un mucus cervical témoin	BHN 40
0080	Etude d'une éjaculation rétrograde	B 110
D005	Valorisation complémentaire d'étude d'une éjaculation rétrograde car deux analyses sont effectuées, dans le sperme et dans les urines	BHN 90
D006	Supplément pour étude de la morphologie des spermatozoïdes dans le cadre d'une éjaculation rétrograde	BHN 20
0081	Coloration des spermatozoïdes au bleu d'aniline	B 50

D007	Analyse en microscopie électronique des spermatozoïdes	BHN 2500
D014	Test de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide	BHN 600

Diagnostic : Actes de Recherche

D008	Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par cytométrie en flux	BHR 450
D009	Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par technique TUNEL	BHR 450
D010	Analyse de la réaction acrosomique des spermatozoïdes par cytométrie de flux	BHR 200
D011	Analyse du mouvement des spermatozoïdes	BHR 200
D012	Spermiologie moléculaire par cytométrie en flux	BHR 200
D013	Analyse de la méiose sur gamètes	BHR 850

Assistance Médicale à la Procréation : Biologie interventionnelle thérapeutique dans le cadre de l'insémination intra-utérine (IIU)

0059	Préparation des spermatozoïdes en vue d'IIU, sperme éjaculé ou congelé	B 200
C001	Supplément pour préparation des spermatozoïdes en vue d'IIU, sperme éjaculé ou congelé en cas de nécessité d'un deuxième prélèvement le même jour	BHN 130

Actes avec congélation et cryoconservation de spermatozoïdes

0065	Congélation de sperme au cours d'une AMP ou en vue d'une autoconservation associée à un traitement stérilisant à visée thérapeutique, au maximum 4 éjaculats, par éjaculat	B 350
0066	Cryoconservation de sperme associée à une autoconservation associée à un traitement stérilisant à visée thérapeutique (par patient, par année)	B 150
C014	Délivrance / réception de paillettes	BHN 185
C015	Supplément pour destruction de paillettes	BHN 100

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-54-4
SOUS-TITRE
19, avenue d'Italie 75013 Paris
Dépôt légal : Octobre 2009



CAHIER DE **Formation** Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- N° 1 : Hématologie
- N° 2 : Immunoanalyse
- N° 3 : Parasitologie
- N° 4 : Bactériologie
- N° 5 : Hormonologie - Gazométrie
- N° 6 : G.B.E.A
- N° 7 : Immuno-allergie (1)
- N° 8 : Hémoglobines glyquées - Lipides
- N° 9 : Dosage des médicaments Tome I
- N° 10 : Hématologie Cas illustrés
- N° 11 : Amibes et flagellés intestinaux
- N° 12 : Les maladies à Prions
- N° 13 : Autoimmunité et autoanticorps
- N° 14 : L'exploration de la thyroïde
- N° 15 : Dépistage de la trisomie 21
- N° 16 : Immuno-allergie (2)
- N° 17 : Virus des hépatites A (VHA) et E (VHE)
- N° 18 : Dosage des médicaments Tome II
- N° 19 : Vaginites et vaginoses
- N° 20 : Hémostase et thrombose
- N° 21 : Virus des hépatites B (VHB), Delta (VDH), C (VHC), autres
- N° 22 : Syndrome des anti-phospholipides
- N° 23 : Parasites sanguins
- N° 24 : Biochimie pédiatrique
- N° 25 : Les moisissures d'intérêt médical
- N° 26 : Immuno-hématologie et groupes sanguins
- N° 27 : Les marqueurs cardiaques
- N° 28 : Immunoglobulines monoclonales
- N° 29 : Mycobactéries - Mycobactérioses
- N° 30 : Exploration de la fonction de reproduction - versant féminin
- N° 31 : Les dermatophytes
- N° 32 : Les marqueurs tumoraux sériques des tumeurs solides
- N° 33 : Sport et Biologie
- N° 34 : Borréliose de Lyme
- N° 35 : L'Inflammation
- N° 36 : Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection
- N° 37 : Maladies auto-immunes du foie
- N° 38 : Les vitamines
- N° 39 : Les dosages biologiques dans l'ostéoporose
- N° 40 : Des agents très spéciaux en bactériologie
- N° 41 : Le vieillissement hormonal - Tome 1

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A. et R.S.I.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes (S.d.B., S.N.M.B. et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privé ou hospitalier, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros sont disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6500 exemplaires.