L'exploration du sperme pathologique et de son pouvoir fécondant a-t-elle encore un intérêt à l'heure de l'ICSI ?

HAMAMAH S.

Unité de Biologie de la Reproduction, Département de Gynéco-Obs, Reproduction Humaine, et médecine fœtale, CHU Bretonneau, 37044 Tours cedex

RESUME

L'exploration du sperme pathologique en vue d'une AMP y compris ICSI repose sur des critères essentiellement subjectifs et nécessite un apprentissage prolongé et une mise à niveau régulière. Actuellement, aucune technique d'analyse automatique ou méthode nouvelle n'a supplanté les explorations conventionnelles telles que le spermogramme, spermocytogramme, le test post coïtal, et le test de préparation du sperme in vitro au plan diagnostique que pronostic. L'efficacité des différentes techniques de préparation du sperme pour une AMP a permis d'une part d'augmenter le nombre des spermatozoïdes mobiles, et d'autre part d'influencer la solution thérapeutique dans le traitement de l'infertilité du couple. Mais à l'heure de l'ICSI, la plupart de ces techniques qui évaluent l'état fonctionnel de la cellule spermatique ne sont pas pour autant prédictives et seule la fécondation par la FIV ou par ICSI reste un moyen diagnostique fiable pour apprécier la capacité fécondante d'un sperme.

Mots Clés : Spermogramme, spermatozoïde humain, tests de fécondance.

INTRODUCTION

La réalisation d'un spermogramme, est un des premiers examens de l'exploration de la fertilité du couple. Le spermogramme est informatif lorsque interprété dans le plus large contexte de l'histoire du patient et de son dossier clinique. Une analyse du sperme ne peut pas être définie simplement comme normale ou anormale [1]. Il est important pour le clinicien de connaître les signes cytologiques révélateurs d'une dysfonction testiculaire pour tenter une évaluation approximative de la fertilité masculine.

Les critères de normalité des paramètres d'un sperme ont été définis par l'OMS à plusieurs reprises, la dernière évaluation datant de 1992 : on considère qu'il existe une oligozoospermie si la numération est $\leq$ à $20 \times 10^6/\text{ml}$, une asthénozoospermie s'il y a moins de 50% de spermatozoïdes mobiles, et une tératozoospermie si le pourcentage d'anomalies morphologiques (spermocytogramme) $\geq$ à 30%.

Quelle attitude pratique doit adopter le praticien devant des troubles du nombre, de la mobilité, de la forme des spermatozoïdes constatés lors de la réalisation du spermogramme et quels sont les examens complémentaires à demander avant d'orienter le couple vers l'IAC, la FIV ou l'ICSI ?

ANOMALIES DU NOMBRE DES SPERMATOZOÏDES

1. L'azoospermie

L'azoospermie se définit comme l'absence de spermatozoïdes lors de la réalisation d'au moins trois spermogrammes pratiqués dans des conditions optimales : ce diagnostic ne peut être affirmé que si on examine avec attention le culot de centrifugation avant et après coloration pour infirmer la présence de spermatozoïdes. Il faut être très prudent dans le diagnostic définitif de l'azoospermie, car un phénomène infectieux sévère peut entraîner une azoospermie réversible. Il faudra aussi éliminer les anomalies de l'éjaculation, les anéjaculations ou les éjaculations incomplètes ou tout simplement des éjaculations rétrogrades. Un petit volume de sperme doit à ce moment là alerter le clinicien et une recherche de spermatozoïdes dans les urines systématiquement entreprendre.

La recherche de l'origine excrétoire ou sécrétoire de cette azoospermie s'appuie sur plusieurs paramètres, mais ne peut être envisagée qu'après un examen clinique soigneux : si ni l'interrogatoire, ni l'examen clinique ne fournissent d'indice étiologique et si le spermogramme ne montre pas de cellules de la lignée germinale, l'azoospermie sera plus volontiers en faveur d'une cause obstructive.

Les dosages plasmatiques de FSH peuvent nous éclairer : le taux de FSH est le plus souvent augmenté en cas d'azoospermie sécrétoire et semble normal lorsque la lignée germinale est conservée. Mais les azoospermies normogonadotrophiques nous posent de réels problèmes étiologiques car il existe des azoospermies sécrétoires à FSH normale [2].

Les dosages des marqueurs séminaux dans l'éjaculat nous permettront dans certains cas d'affirmer l'origine d'une azoospermie. Ceux-ci sont normaux dans les azoosper-

mies sécrétoires et pourront être perturbés en cas d'obstruction du tractus génital. Plusieurs marqueurs sont utilisés : la L-carnitine et l' α -glucosidase (épididyme), le fructose (vésicules séminales), le citrate, le zinc ou les phosphatases acides (prostate).

Une obstruction épидидymaire va se caractériser par un taux de carnitine abaissé dans le liquide séminal. Mais le taux de carnitine dépend du niveau de l'obstruction car si l'obstruction est haut placée, il sera normal. Les marqueurs de vésicules séminales et de la prostate permettent de localiser l'occlusion sur le tractus génital et d'établir ainsi une cartographie fonctionnelle du tractus mâle [3]. L'agénésie vésiculodéférentielle et/ou l'obstruction des canaux éjaculateurs se caractérisent par un volume spermatique réduit, un pH spermatique acide et par une chute du taux de carnitine, de fructose et un taux élevé des phosphatases acides montre la participation prédominante de la prostate. Cette situation est en dehors de tout recours chirurgical alors que lors d'une obstruction épидидymaire, une anastomose épидидymo-déférentielle peut être tentée avant de proposer l'ICSI.

L'OLIGOZOOSPERMIE

L'oligozoospermie se définit par une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat ($\geq 40 \times 10^6$ /éjaculat). C'est le cas le plus fréquent de l'infertilité masculine. Les oligozoospermies inférieures à 1 million peuvent être rattachées aux azoospermies et explorées de la même façon que celles-ci. L'oligozoospermie est rarement isolée et souvent associée avec une asthénie et/ou une tératozoospermie. Cette oligozoospermie peut avoir plusieurs étiologies :

- origine testiculaire sécrétoire ou excrétoire (obstruction unilatérale sur le tractus),
- un problème d'éjaculation (incomplète ou rétrograde),

- la présence de bactéries, d'infection ou d'inflammation du tractus accompagnée ou non de leucospermie, et
- la présence d'auto-anticorps dans le plasma séminal.

Cette oligozoospermie n'est pas un obstacle majeur à l'expression du pouvoir fécondant du sperme, il a été montré que au delà de 5 millions/ml de spermatozoïdes, la concentration n'intervenait plus sur le délai d'obtention de la grossesse [4]. En cas d'oligoasthénospermie, l'appréciation de la fécondance du sperme est évaluée en fonction du taux de fécondation.

TROUBLES DE LA MOBILITE

L'asthénospermie se caractérise par une chute de la mobilité des spermatozoïdes. Une mobilité est considérée comme normale au delà de 50 %. Elle est primaire si la chute de mobilité intervient dès la première heure ou secondaire si c'est 4 heures après l'émission du sperme. Comme pour l'oligozoospermie, le diagnostic étiologique est difficile. Il faut prendre soin d'évaluer le pourcentage de nécrozoospermie de façon à éliminer une absence de mobilité due à une absence de vitalité des spermatozoïdes. Il existe des cas où l'asthénospermie est totale [5]. Dans les cas d'asthénospermie plus ou moins importante, on peut évoquer plusieurs étiologies :

- un phénomène infectieux et/ou une absence de fructose,
- l'auto-immunisation par anticorps,
- une dyskynésie flagellaire c'est-à-dire une anomalie des structures flagellaires de l'axonème ou des structures péri-axonémales mise en évidence par l'étude ultrastructurale du flagelle du spermatozoïde, et,
- une anomalie de plasma séminal, notamment une hyperviscosité due à des troubles de la liquéfaction.

ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES

Dans les années 50 les études de MacLeod ont montré l'importance de la morphologie dans l'évaluation de l'infertilité. Les spermatozoïdes humains présentent un fort pourcentage d'anomalies morphologiques ce qui les différencie de toutes les autres espèces. Un sperme est considéré comme "normal" si il possède 30 % de spermatozoïdes de morphologie normale. Cette étude morphologique a été codifiée et quantifiée et la plupart des laboratoires utilisent la classification soit de David [6] qui tient compte des polymalformations des spermatozoïdes, soit de Kruger. L'AMP met en évidence l'importance du % de formes normales dans l'éjaculat, l'étude de Feneux et al a démontré que le 10^e percentile d'hommes féconds se situait à 32 % de formes normales [4]. Il semble exister une certaine constance du profil tératozoospermique chez le même individu pouvant laisser supposer l'existence d'un rapport entre certaines perturbations morphologiques et certaines étiologies. L'établissement du profil tératozoospermique d'un patient nécessite la réalisation de 3 ou 4 spermocytogrammes dans le même centre de référence à trois mois d'intervalle. Si l'interprétation de la tératozoospermie, telle que la microcéphalie totale ou la présence de flagelles courts pose moins de problèmes, en revanche il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit d'anomalies de la tête le plus souvent irrégulière. Il existe des relations significatives entre la fréquence des anomalies de gamètes et les anomalies de certains tests fonctionnels : la mobilité, le test de pénétration dans la glaire, le test de fixation sur la zone pellucide de l'ovocyte. Le taux de clivage en FIV est nettement plus faible en cas de tératozoospermie sévère. La mobilité et la tératozoospermie sont des facteurs déterminants dans l'expression finale du pouvoir fécondant du sperme [7].

L'INFECTION : LEUCOSPERMIE ET/OU BACTERIOSPERMIE

La leucospermie peut être révélatrice soit d'une infection infra-clinique potentiellement à traiter soit des séquelles de celle-ci. Une leucospermie ne peut être prise en compte que si une coloration différentielle à la péroxydase a été effectuée (coloration de Heintz). A partir de quelle concentration peut on parler de leucospermie ? Selon les auteurs la concentration seuil peut varier de 10^3 à 10^6 . Il semble toutefois qu'une valeur supérieure à 10^5 soit considérée comme pathologique [8]. Les leucocytes ont surtout une valeur indicative. Leur présence doit faire soupçonner une infection mais aussi un processus inflammatoire (lithiase prostatique, séquelle d'infection, abstinence trop longue).

Il faut envisager alors une spermoculture et un ECBU du 1er jet d'urine à la recherche de germes. Selon les auteurs, les seuils de positivité sont différents [9]. Certaines infections sont plus ou moins latentes et ne sont découvertes qu'au spermogramme. L'infection est patente lorsque l'on trouve 10^3 germes par ml et certaine lorsque c'est $> 10^5$.

Les infections sont elles réellement responsables de stérilité ? Il semble que les hommes infertiles possèdent un pourcentage plus élevé de leucocytes dans le sperme. Il a été prouvé que la présence de leucocytes dans le sperme était délétère à la fois pour le mouvement des gamètes et la pénétration des ovocytes. Il a aussi été décrit quelques variations du spermogramme : volume augmenté, pH > 8 , numération basse, des flagelles enroulés ainsi que des modifications des paramètres biochimiques du sperme. A l'heure actuelle aucune de ces anomalies n'a pu être reconnue comme vraiment pathognomonique du phénomène inflammatoire mais toute infection diagnostiquée au spermogramme doit être traitée et il faudra effectuer un spermogramme de contrôle après traitement. Les hémospers-

mies (présence de sang dans le sperme) sont souvent dues à des causes organiques (malformations, infections, traumatismes). Elles sont souvent idiopathiques (33 %) et leur cause est généralement bénigne.

L'AUTOIMMUNISATION ANTI-SPERMATOZOÏDE

Les spermatozoïdes peuvent provoquer dans certaines circonstances, la production d'anticorps. Cette auto-immunisation peut être déclenchée par des processus traumatiques ou infectieux des organes génitaux ayant entraîné une réabsorption massive de cet antigène habituellement isolé de la circulation générale. Cependant, souvent dans plus de 50 % des cas, il n'y a pas d'antécédent pathologique ni d'anomalie génitale et seule l'agglutination spontanée des spermatozoïdes dans l'éjaculat évoque cette auto-immunisation.

La fréquence des anticorps dans les populations infertiles est de 3 à 15 % selon les études [10], mais, cette fréquence dépend en grande partie à la fois du mode de sélection des patients et des tests utilisés et ainsi que de leur spécificité. Ces anticorps peuvent être présents à la fois dans le sang périphérique et/ou dans le tractus génital. Ils sont dûs à des immunoglobulines de classe G, M et A. Chez l'homme, dans le plasma séminal, les anticorps peuvent exister à l'état libre dans le plasma séminal soit à l'état lié aux antigènes de surface de la membrane du spermatozoïde. Les signes biologiques d'appel au niveau du spermogramme seront l'auto-agglutination quelquefois associée à des altérations de la mobilité et de la vitalité [11, 12].

Quelques tests simples peuvent être réalisés pour permettre ces dépistages. En routine, les tests les plus couramment utilisés sont des tests d'agglutination en plaque qui évaluent le taux d'anticorps présents dans le plasma séminal ou le sérum du patient

ainsi que les tests dits combinés nécessitant soit l'apport de complément : tests d'immobilisation et de cytotoxicité, soit d'anticorps anti-immunoglobulines humaines qui sont soit marqués par un corps fluorescent (ou par une enzyme "Elisa", ou fixés sur des microbilles de polyacrylamide (immunobilles) ou associés à des particules de latex recouvertes d'anticorps "Mar-test".

Le plus souvent c'est le Mar-test qui est réalisé en premier au cours du spermo-gramme en cas d'asthénospermie ou d'agglutination spontanée, c'est le test de dépistage le plus simple complété ensuite par le test aux immunobilles qui va permettre non seulement de localiser mais aussi de quantifier la présence d'anticorps sur la membrane des spermatozoïdes. Ces deux tests sont les plus utilisés en clinique grâce à leur bonne spécificité et sensibilité [13]. Ils sont plus indicatifs pour l'utilisation de l'AMP ultérieure que d'autres dosages soit directs ou indirects dans le plasma séminal ou dans le sérum peu corrélés à la fertilité.

La présence d'anticorps entraîne souvent une asthénozoospermie associée quelquefois à une nécrozoospermie, mais surtout ils interfèrent avec le transport transcervical ou la migration des spermatozoïdes et/ou compromettent l'interaction avec la zone pellucide de l'ovocyte [14]. Le taux d'anticorps, leur classe ($A > G$), et leur localisation sur la membrane sont autant de facteurs capables d'influer sur le niveau et le degré de l'empêchement et ainsi agir au niveau du pronostic de la fertilité en provoquant un allongement du temps moyen d'obtention de la grossesse. Dans l'état actuel de nos connaissances, les anticorps peuvent être responsables de certaines infertilités masculines. Au delà d'un certain taux, ces anticorps ne se retrouvent que chez les patients infertiles et il y a une corrélation inverse entre le taux d'anticorps et la fertilité ultérieure [15].

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES SPERMATOZOÏDES

La microscopie électronique permet d'examiner l'ultrastructure de la cellule spermatique, mais c'est une technique nécessitant une expérience importante. Il faut noter que les difficultés d'observation ou d'interprétation de cette ultrastructure sont dues à la très grande hétérogénéité de structures à l'intérieur d'une même population spermatique. Pour évaluer justement la contribution des anomalies ultrastructurales cette étude doit être quantitative.

La microscopie électronique a permis d'éclaircir de nombreux cas d'asthénozoospermie en mettant en évidence des défauts ultrastructuraux du flagelle [16]. L'asthénozoospermie a été rapportée chez des patients avec des mitochondries absentes, des pièces intermédiaires allongées ainsi que des anomalies des structures axonémales et péri-axonémales. Tout trouble de la mobilité sans nécrozoospermie et sans autre étiologie peut être dû à une dyskynésie flagellaire. De nombreuses anomalies ont déjà été décrites et répertoriées notamment au niveau du flagelle [17]. Elles sont dues à une anomalie systématisée de l'axonème : absence de bras de dynéine, totale ou partielle, absence de doublet central, désorganisation des doublets ou alors une anomalie péri-axonémale trouble de l'organisation de la gaine fibreuse ou des fibres denses (spermatozoïde glissant; [18].

Toutes ces anomalies ne touchent pas les spermatozoïdes à 100 % sauf dans le cas de la maladie des cils immobiles ou syndrome de Kartagener [5]. Il faut donc faire ressortir celles qui prédominent le plus et définir le profil pathologique, c'est là où se situe la difficulté de l'interprétation de cette microscopie électronique.

L'indication de celle-ci peut être, soit à visée explicative face à des échecs répétés de FIV avec des spermatozoïdes apparemment normaux et/ou prédictive face à :

- une asthenozoospermie, mobilité < 10 % ou mise en évidence d'une anomalie des paramètres du mouvement,
- une térazozoospermie de la tête systématisée : microcéphalie, macrocéphalie, anomalie acrosomique > 90 % du même type d'anomalies,
- la recherche d'une pathologie nucléaire du spermatozoïde.

RADICAUX OXYGENES LIBRES (ROS)

Les radicaux libres (reactive oxygen species ou ROS) présents dans le sperme sont essentiellement l'anion superoxyde O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Les ROS dans le sperme proviennent :

- des cellules rondes, et
- des spermatozoïdes quand ils ne sont plus au contact du plasma séminal, car le plasma séminal inhibe la formation des ROS.

Les ROS peuvent avoir soit des effets positifs, soit des négatifs sur les spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes sont sensibles à ces radicaux oxydants qui peuvent provoquer des altérations membranaires et une chute voire même une perte de mobilité. Cependant, les ROS semblent être capables de stimuler la capacitation et d'induire la réaction acrosomique [25].

EVALUATION DU POUVOIR FECONDANT

L'exploration de l'état fonctionnel des spermatozoïdes reposait dans le passé sur des données spermilogiques courantes, mais maintenant, on peut évaluer un certain nombre de propriétés de la cellule spermatique telles que les caractéristiques de la mobilité, la reconnaissance et la fixation sur la zone pellucide, la fusion des membranes spermatique et ovocytaire et la transformation du noyau en pronucleus mâle dans le cytoplasme ovocytaire. C'est

pourquoi sur la base d'une série de tests de l'évaluation des différentes fonctions spermatiques et non pas sur un seul, on pourrait définir "biologiquement" les capacités fécondantes du spermatozoïde. On utilise en pratique, depuis quelques années une série de tests permettant d'explorer le pouvoir fécondant du sperme. Cependant, la plupart de ces tests qui évaluent une ou plusieurs fonctions spermatiques ne sont pas forcément prédictifs et seule la fécondation en FIV ou en ICSI reste un moyen diagnostique fiable d'apprécier la capacité fécondante d'un sperme.

TEST POST-COITAL OU TEST DE HUHNER (TPC)

Le TPC consiste à étudier la qualité du mucus cervical prélevé après un rapport sexuel afin d'évaluer :

- la pénétration des spermatozoïdes dans le mucus cervical,
- la survie des spermatozoïdes dans l'environnement de la glaire, et
- la possibilité de problème de rapport.

Le test post-coïtal doit être pratiqué pendant la période préovulatoire avec une abstinence de 3 jours avant le rapport étudié. Si le test est positif, il fournit un pronostic favorable et s'il se révèle négatif ou est de mauvaise qualité (spermatozoïdes absents ou peu nombreux, immobiles) il doit être répété et ne pas être considéré comme un test d'infertilité mais comme un examen d'orientation. C'est un test encore critiqué par son manque de standardisation et sa difficulté d'interprétation.

TEST D'INTERACTION SPERME-MUCUS IN VITRO

Il comprend :

- un test entre lame et lamelle utilisant une goutte de sperme et de mucus cervical,

- et un test en tube (Kremer ou test croisé) où une extrémité d'un capillaire rempli de mucus cervical est placée au contact d'un sperme liquéfié.

Lorsque le test d'interaction sperme-mucus s'avère normal, le test croisé est réalisé en parallèle avec des spermatozoïdes et des mucus témoins pour déterminer la part relative de chaque partenaire dans l'infertilité et éviter les fausses interprétations. De plus, ce test permet d'évaluer à la fois le passage des spermatozoïdes et le nombre de mobiles à travers l'interface sperme-mucus et leur migration dans la colonne de mucus (Kremer, 1982).

La réalisation de ces tests nécessite :

- une analyse conventionnelle du sperme utilisé pour le test,
- une glaire cervicale préovulatoire d'un score d'Insler > à 10/15,
- un PH ≥ à 7, et
- une abstinence de 3 jours.

Si un tel test conduit à un déficit fonctionnel des spermatozoïdes, une recherche d'anticorps antispermatozoïdes dans le sperme et/ou dans le mucus cervical sera recommandée. Car la présence des anticorps influence non seulement la pénétration dans le mucus mais également, la survie et la migration des spermatozoïdes dans le mucus cervical [11, 19].

TEST DE CAPACITATION

Pour l'acquisition finale de la fécondance, les spermatozoïdes doivent, après éjaculation, subir un processus de "maturation" dans le tractus féminin, dénommé "capacitation". Malgré de nombreuses études sur la capacitation, la nature précise de celle-ci n'a pas été complètement élucidée. Cependant, on sait que la capacitation peut être définie comme le relargage de protéines de revêtement et/ou la transformation des lipides membranaires aboutissant à :

- une transformation des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes, en une forme de mouvement caractérisée par une forte amplitude, qu'on appelle "hyperactivation",
- la fixation et la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte, et
- la réalisation de la "réaction acrosomique".

TEST DE LA FIXATION SUR LA ZONE PELLUCIDE DE L'OVOCYTE

Lors de la première étape de la fécondation, la fixation de spermatozoïdes sur la zone pellucide est indispensable pour la réalisation de la suite du processus de fécondation. Comme la fixation de spermatozoïdes sur la zone pellucide est un processus "spécifique" non réversible, il est donc nécessaire pour la réalisation de ce test, de disposer de zones pellucides humaines. Celles-ci peuvent être récupérées à partir des ovocytes immatures provenant d'ovaires au cours d'une intervention ou après un échec de FIV. Un "hemi zona assay" a été utilisé pour comparer la capacité de fixation d'une population étudiée à une population témoin.

Un faible taux de fixation des spermatozoïdes sur la zone pellucide pourrait évoquer la présence d'anticorps à la surface de la membrane plasmique du spermatozoïde. Aussi, il semble exister une corrélation entre le nombre de spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide et les succès de FIV [20]. Mais, la FIV avec sperme de donneur nous montre clairement le contraire à savoir que le nombre réduit de spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide ne peut aucunement prédire l'évolution de la tentative.

TEST DE LA REACTION ACROSOMIQUE

La réaction acrosomique est la fusion des membranes plasmique et acrosomique

externe, et la libération concomitante du contenu de l'acrosome résultant de la formation de vésicules entourant la tête du spermatozoïde. Cette réaction se caractérise par un influx de Ca^{++} et un efflux de protons à travers la membrane plasmique périacrosomique.

Plusieurs méthodes directes et indirectes sont utilisées pour visualiser à la fois la présence et l'absence de l'acrosome, et la réaction acrosomique. La réaction acrosomique peut être mise en évidence aussi bien en microscopie électronique qu'en microscopie à contraste de phase à l'aide de colorants cytologiques (colorants de Talbot, lectines marquées et anticorps monoclonaux : [21, 22]. Il est important de préciser que la valeur de ces tests est relative et mérite d'être interprétée avec prudence dans la mesure où ces tests ont souvent lieu dans des conditions extra physiologiques. D'autre part, il est important de distinguer une réaction acrosomique "proprement dite" d'une réaction "dégénérative" au cours du vieillissement et de la mort du spermatozoïde ou à la suite d'un mauvais traitement.

TEST DE FUSION MEMBRANAIRE (Hamster Test)

Le spermatozoïde après avoir pénétré la zone pellucide se trouve au contact de la membrane plasmique de l'ovocyte avec laquelle il doit fusionner. Cette fusion implique à la fois le segment équatorial et la lame post-acrosomique de la tête spermatique. Ce n'est qu'en 1976 que Yanagimachi et al ont proposé le hamster test en montrant que les spermatozoïdes humains capables pouvaient se lier, pénétrer des ovocytes dépellucidés de hamster et décondenser les noyaux pour former des pronuclei mâles [23].

Si les travaux concernant ce test sont nombreux, en revanche, ils sont très controversés du fait d'une part de la spécificité et de

la signification physiologique de ce test, et d'autre part, de la diversité des procédés techniques selon les équipes. En pratique, le hamster test permet d'évaluer :

- le nombre de spermatozoïdes fixés sur la membrane de l'ovocyte traduisant la fonction fusiogénique du spermatozoïde,
- le pourcentage d'ovocytes ayant au moins une tête spermatique décondensée, et
- le nombre moyen de têtes décondensées par ovocyte.

La qualité de la réalisation du hamster test doit reposer à la fois sur la répétabilité de ce test ainsi que sur les résultats obtenus avec un sperme témoin afin d'éviter les faux négatifs et positifs. De plus, les résultats de ce test peuvent varier en fonction de la méthode utilisée pour préparer le sperme in vitro et provoquer donc la capacitation de spermatozoïdes.

TEST DE QUALITE DU MATERIEL NUCLEAIRE

Durant le transit épididymaire, la chromatine du noyau de spermatozoïde poursuit sa condensation. Les transitions protéiques intervenues pendant la spermiogénèse permettant, en particulier grâce aux protamines (protéines basiques), l'établissement de ponts disulfures intra-chromatiniens (S-S) qui vont stabiliser la structure du complexe ADN-nucléoprotéines jusqu'à ce que le spermatozoïde féconde l'ovocyte. Au cours de l'éjaculation, la stabilité de la chromatine (qui est le reflet de la maturation nucléaire) est assurée par le plasma séminal et surtout la sécrétion prostatique riche en Zinc protégeant le noyau du spermatozoïde d'une décondensation prématurée [24]. Celle-ci peut être appréciée par un examen direct à l'aide d'un colorant fluorescent, l'acridine orange (AO), qui provoque une fluorescence verte lorsque l'ADN est bicaténaire, jaune-orangé quand l'ADN est monocaténaire.

La stabilité de la chromatine "test de décondensation" est évaluée *in vitro* par des méthodes cytochimiques et biochimiques. De plus, l'aptitude du noyau à subir les transformations intra-ovocytaires pour former le pronucleus mâle est aussi étudiée par les ovocytes dépellucidés de hamster. Ces techniques permettent de mettre en évidence des modifications du contenu nucléaire en rapport avec l'expression du pouvoir fécondant des spermatozoïdes humains.

CONCLUSION

Le spermogramme reste à l'heure actuelle la pierre angulaire de l'évaluation de l'infertilité masculine. Les valeurs seuils des variables spermatiques pour discriminer les fertiles des infertiles ont été largement critiquées grâce aux résultats obtenus en FIV ou en ICSI. La limite des anomalies permettant de parler de sperme infécond est impossible à établir, d'autant plus qu'une excellente fertilité féminine peut compenser un trouble spermiologique et que le facteur temps est non négligeable. Les bonnes réalisations et interprétations spermiologiques permettent d'orienter vers d'autres tests d'évaluation de la fécondance du sperme, mais actuellement aucun examen à lui seul ne permet de prédire la fécondance éventuelle de ces spermatozoïdes et il serait illogique d'utiliser systématiquement l'ensemble des tests de fécondance sans examens spermiologiques de base.

A l'heure actuelle, la FIV demeure le seul moyen "sûr" pour évaluer la capacité fécondante du sperme normal ou anormal. En cas d'échecs, l'ICSI permet de franchir une étape supplémentaire dans la prise en charge d'une stérilité pour des facteurs masculins. Mais, les examens spermiologiques de base (spermogramme, spermocytogramme, et tests de pénétration dans la glaire cervicale) doivent être envisagés en premier lieu dans un pronostic d'hypofertilité masculine.

Certes, la valeur de ces examens est absolue en cas d'azoospermie, mais elle est "relative" en cas d'oligoasthénotéatozoospermie. Donc, l'exploration du sperme et de son pouvoir fécondant a encore un intérêt en AMP.

REFERENCES

1. COOPER TG., JOCKENHOVEL F., NIESCHLAG E. : Variation in semen parameters from fathers. *Human Reprod.* 1991, 6, 856-66.
2. SOUFIR J.C., ZERMAN-JOLY E., VIELLEFOND A., WEBER P. : Azoospermies à FSH plasmatique normale et carnitine séminale non abaissée : une double signification. Implications diagnostiques et thérapeutiques. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1988, 28, 1363-1374.
3. SOUFIR J.C. : L'exploration biochimique du sperme humain. *Rev. Prat.*, 1983, 57, 3141-3147.
4. FENEUX D., DUCOT B., JEULIN C., SERRES C., SPIRA A., JOUANNET P. : Caractéristiques du sperme des hommes féconds et inféconds - Similitudes et différences. In *Recherches récentes sur l'épidémiologie de la Fertilité* Henri-Suchet., Mintz M., Spira A., Paris, Masson, 1986, 33-41.
5. AFZELIUS B.A., ELIASSON R., JOHNSEN O., LINDHOLMER C. : Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J. Cell. Biol.* 1975, 66, 225-232.
6. DAVID G., BISSON P., CZYGLICK F., JOUANNET P., GERNIGON C. : Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Proposition pour un système de classification. *J. Gyn. Obst., Biol., Repr.* 1975, 4, (suppl.) 37-86.
7. SILBER S.J. : The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. *Human Reprod.* 1989, 4, 947-953.
8. ARVIS G. : *Andrologie 1*. Pyospermies et bacteriospermies Maloine éd. Paris 1987 195-203.
9. ARVIS G. : Infection du sperme dans la stérilité masculine. *Rev. Fr. Gynécol. Obstét.* 1989, 84, 2 : 106-108.
10. DE ALMEIDA M. : Immunologie et hypofertilités masculines. *Rev. Fr. Gynécol. Obstét.* 1989, 84, 112-118.
11. DE ALMEIDA M., ZOUARI R., JOUANNET P., FENEUX D. : In vitro effects of antisperm antibodies on human sperm movement. *Human Reprod.* 1991, 6, 405-410.
12. CHECK J.H., ANDELSON H.G., BOLLENDORF A. : Effect of antisperm antibodies on computerized semen analysis. *Arch. Androl.* 1991, 27, 61-63.

13. DONDERO F., LENZI A., GANDINI L., LOMBARDO F., CULASSO F. : A comparison of the direct Immuno-bead test and other tests for sperm antibodies detection. *J. Endocrinol. Invest.* 1991,14, 443-49.
14. WITKIN S.S., VITI D., DAVID S., STANGEL J., ROSENWAKCS Z. : Relation between antisperm antibodies and the rate of fertilization of human oocytes in vitro. *J. Ass. Reprod. Genet.* 1992, 9, 9-1.
15. HENDRY W.H. : The significance of antisperm antibodies measurement and management. *Clinical Endocrinol* 1992, 36, 219-221.
16. ZAMBONI L. : Sperm structure and its relevance to infertility *Arch. Path. Lab. Med.*,1992 116, 325, 344.
17. ESCALIER D., DAVID G. : Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum, axonemal and periaxonemal anomalies. *Biol. Cel.* 1984,50, 37-52.
18. FENEUX D., SERRES C., JOUANNET P. : Sliding spermatozoa : a dyskinesie responsible for human infertility ? *Fertil. Stéril.*, 1985, 44, 508-511.
19. KREMER J., JAGER S. : Tests for the investigation of sperm-cervical mucus interaction. In: Human fertility. Spira A ; Jounnet P eds. INSERM, 1982 : 229-243.
20. LIU DY., LOPATA A., JOHNSTON WIH., BAKER HWG. : A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilization in vitro. *Fertil. Steril* 1988; 50 : 782-788.
21. CROSS NL., MORALES P., OVERSTREET JW., HANSON FW. : Two simple methods for detecting acrosome reacted human sperm. *Gamete Res* 1986 ; 15 : 213-226.
22. FENICHEL P., HSI BL., FARAHIFAR D., DONZAU M., BARRIER-DELPECH D., HEY CJG. : Evaluation of human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody. GB-24, and fluorescence activated cell sorter. *J. Reprod. Fert* 1989; 87: 699-706.
23. YANAGIMACHI R., YANAGIMACHI N, ROGER BJ. : The use of zona free animal ova as a test system for the assesment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.
24. KVIST U. : Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta. Physiol. Scand* ; 1980 ; 109 : 79-84.
25. LAMIRANDE E., GAGNON C. : Human sperm hyperactivation and capacitation as partss of an oxidative process. *Free. Radic. Biol. Med* ; 1993 ; 14 :157-166.

ABSTRACT

Is semen analysis still needed in ICSI programs ?

Hamamah S.

The semen analysis in the assisted reproductive technology (ART) is mainly subjective, and requires an extensive training. However, other sophisticated techniques can be used in order to evaluate fonctionnal state of sperm cell. Today, in vitro fertilization (FIV) as well as the intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) are considered as the adequate mean by which the sperm quality can be evaluated. Should all men undergo all tests ? One must think not only in terms of efficiency but also of cost. No doubts that a full work up, in all men will detect the high risk husbands in IVF. But to achieve this goal a lot of work is required. Most IVF AND ICSI programs use a simple wash, swim-up or Percoll gradients to prepare sperm for insemination. The goal of these techniques is to remove debris, cells bacteria and to allow the selection of morphologically normal motile spermatozoa. These normal motile spermatozoa are mainly selected according to their active motility (swim up) or specific gravity (percoll gradient) which reflects the degree of head condensation.

Key Words : *semen analysis, sperm fertilizing tests.*