

Altérations morphologiques des spermatozoïdes en microscopie électronique : indications, phénotypes, fécondance, et pronostic de fertilité

Valérie MITCHELL¹, Marie-Claire PEERS¹, Carole MARCHETTI², Maryse LEROY³,
Jean-Marc RIGOT⁴, Jean-Jacques LAFITTE⁵, Alexandre MOERMAN⁶, Denise ESCALIER⁷

1 Laboratoire de Spermiologie, Hôpital A. Calmette, Lille ;

2 Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille ;

3 Service de Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille ;

4 Service d'Andrologie, Hôpital A. Calmette, Lille ;

5 Service de Pneumologie, Hôpital A. Calmette, Lille ;

6 Service de Génétique, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille ;

7 Service d'Andrologie, CHU Kremlin-Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

RESUME

L'analyse conventionnelle du sperme (spermogramme) est limitée à l'analyse des spermatozoïdes au grossissement x1000, et il y a des situations, rares, où ce grossissement est insuffisant. L'étude des spermatozoïdes en microscopie électronique permet d'étudier les organites du spermatozoïde à un grossissement important (x100 000), et de quantifier les anomalies des constituants impliqués dans la fécondance et l'aptitude migratoire des spermatozoïdes. Les indications d'un examen de la morphologie des spermatozoïdes en microscopie électronique sont très peu nombreuses : cette étude est réservée 1) au cas de tératospermies sévères monomorphes et stables (globozoospermie = spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome, *pinheads* = spermatozoïdes décapités ou sans tête), 2) en cas d'altération partielle (asthénospermie) ou totale (akinétospermie) de la mobilité et/ou de la qualité du mouvement des spermatozoïdes. Dans tous les cas, l'homme présente une infertilité primaire. La globozoospermie et les *pinheads* sont détectés en microscopie optique.

L'intérêt de l'étude des spermatozoïdes en microscopie électronique est de déterminer précisément et de quantifier les structures anormales. Les phénotypes pathologiques ont une expression hétérogène. Des organites du spermatozoïde autres que ceux primitivement impliqués dans les phénotypes pathologiques peuvent également présenter des altérations. La globozoospermie est généralement caractérisée par une absence d'élongation du noyau, d'acrosome et du feuillet post-acrosomique. Dans les spermatozoïdes décapités, on observe le plus souvent l'absence de la fossette d'implantation et de la plaque basale.

L'asthénospermie peut être l'indication d'une étude des spermatozoïdes en microscopie électronique, lorsqu'elle n'est pas associée à la nécrospermie. Dans les Dysplasies de la gaine fibreuse (DFS), les spermatozoïdes présentent généralement un flagelle court et une mobilité totale très faible, inférieure à 5%. Les phénotypes, variés, sont caractérisés par des anomalies de l'arrangement des composants de la gaine fibreuse. Vingt pour cent des patients ont des pathologies du tractus respiratoire. Dans les Dyskinésies ciliaires primitives (DCP), les spermatozoïdes sont souvent immobiles et présentent une morphologie normale en microscopie optique. A côté de la forme complète où l'axonème est absent, on observe des formes incomplètes avec absence des bras de dynéine, des doublets périphériques, des microtubules.

La prévalence de ces phénotypes dans la population des hommes infertiles est rare. L'incidence familiale, la consanguinité parentale, ainsi que l'incidence d'une zone géographique sont fréquentes, ce qui suggère l'existence d'un ou plusieurs substrats génétiques. Malgré les connaissances actuelles fragmentaires, une information génétique sur la possibilité de transmission du phénotype anormal à la descendance doit être délivrée au couple.

Tous ces hommes présentant ces phénotypes sont spontanément infertiles. La seule alternative de fécondation est la technique de microinjection intracytoplasmique d'un

Correspondance :

Dr Valérie MITCHELL - Laboratoire de Spermiologie,
Hôpital A. Calmette, Bd du Pr J. Leclercq, 59037 Lille cedex,
France - Tel 33 3 20 44 54 85 - Fax 33 3 20 44 59 32 -
Email v-mitchell@chru-lille.fr

spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI). D'après la littérature et notre expérience, les résultats de l'ICSI avec les spermatozoïdes appartenant à ces phénotypes sont moins bons que ceux de l'ICSI en général.

La microscopie électronique est non seulement un outil diagnostique dans l'infertilité masculine sévère, mais également un outil pronostique du succès de la prise en charge en ICSI qui sera évaluée pour chaque cas.

Mots Clés : *microscopie électronique, globozoospermie, spermatozoïdes décapités, dysplasie de la gaine fibreuse, dyskinésie ciliaire primitive, ICSI*

I. INTRODUCTION

L'analyse conventionnelle du sperme reste l'examen de base pour évaluer la qualité du sperme et le potentiel de fertilité de l'homme. Lors de ce bilan, la morphologie des spermatozoïdes est systématiquement évaluée et quantifiée par la réalisation d'un frottis coloré (spermocytogramme). Cependant, cette étude est limitée à l'analyse de la taille et de la forme des spermatozoïdes au grossissement x1000 au maximum. La plupart des structures du spermatozoïde ne peuvent, pour un problème de taille, être observées à cette échelle, et il y a des situations, non exceptionnelles, où le spermocytogramme est insuffisant, les altérations morphologiques étant responsables d'une hypofertilité voire d'une infertilité. Le pouvoir de résolution de la microscopie électronique permet d'identifier précisément et de quantifier les anomalies des structures et des organites des spermatozoïdes.

II. QUAND DEMANDER UNE ÉTUDE DES SPERMATOZOÏDES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE ?

L'étude ultrastructurale des spermatozoïdes est un examen des organites cellulaires des spermatozoïdes à un grossissement important qui a pour *but* d'analyser et de quantifier les anomalies des constituants cellulaires impliqués dans la fécondance des spermatozoïdes et dans leur aptitude migratoire : organites du flagelle, structures d'attachement tête-flagelle, et constituants de la tête du spermatozoïde.

Au décours du bilan spermatique standard, les *signes d'appel biologiques* d'un examen de la morphologie des spermatozoïdes en microscopie électronique sont :

1) *la tératospermie sévère monomorphe et stable* : spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome (globozoospermie) ; têtes de spermatozoïdes dépourvues de flagelle (décapités); flagelles courts, et/ou de calibre irrégulier ;

2) *l'altération partielle ou totale de la mobilité quantitative* (asthénospermie) *et/ou qualitative* (mouvements « glissants »). Les éléments structuraux responsables du mouvement du spermatozoïde résident dans le flagelle. Une morphologie flagellaire normale des spermatozoïdes au spermocytogramme n'exclut cependant pas une étude en microscopie électronique s'il existe une altération notable de la mobilité non accompagnée d'altération de la vitalité. Dans ce contexte d'asthénospermie sévère sans nécrospermie, le test post-coïtal avec mucus cervical normal est négatif.

L'examen des spermatozoïdes en microscopie électronique a valeur de quantification et doit donc analyser un nombre important de spermatozoïdes. Ainsi, la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat doit être supérieure à 10 millions/ml. L'asthénospermie peut être l'expression d'anomalies du flagelle ou la conséquence d'une baisse de la vitalité des spermatozoïdes. La nécrospermie étant toujours associée à des changements dégénératifs des organites des spermatozoïdes, seront donc exclus de l'analyse ultrastructurale les éjaculats qui présentent une nécrospermie (44% des éjaculats dont les spermatozoïdes sont immobiles présentent une nécrospermie).

Un entretien avec le couple permet de préciser la durée d'infertilité, l'origine ethnique du patient, les antécédents familiaux (consanguinité parentale, stérilité familiale, maladies familiales), les antécédents personnels du patient (pathologie respiratoire, malposition viscérale, maladie urogénitale, atteinte sensorielle).

III. COMMENT TRAITER LE SPERME ?

Un éjaculat complet recueilli dans les conditions optimales est nécessaire à cette étude. Après liquéfaction, le sperme entier et/ou migré (si la mobilité le permet) est lavé en milieu de survie, fixé en glutaraldéhyde tamponné dans du cacodylate de sodium, à nouveau lavé en tampon sucrose, puis centrifugé. Après post-fixation dans l'acide osmique, le culot est inclus en résine, puis des coupes ultrafines sont réalisées à l'ultramicrotome et récupérées sur des grilles. Les coupes sont colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être observées à des grossissements de 10 000 à 100 000.

IV. TÉRATOSPERMIE ET ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE

Trois grands groupes de *tératospermies spécifiques et monomorphes* nécessitent une analyse du sperme en microscopie électronique, lorsque les anomalies de certaines structures sont systématiques, homogènes et touchent la grande majorité des spermatozoïdes. Ces phénotypes sont rares. On distingue :

- 1. les anomalies de la tête** : spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome (*globozoospermie*), ou avec « mini-acrosome » (ébauche d'acrosome) ;
- 2. les anomalies de l'attachement tête-flagelle** : flagelles dépourvus de tête : *spermatozoïdes décapités, acéphaliques, pinheads*.

Ces 2 phénotypes pathologiques sont caractéristiques au spermocytogramme. L'étude en microscopie électronique permet de certifier le diagnostic et d'observer précisément les structures impliquées;

- 3. les anomalies du flagelle** : la dysplasie de la gaine fibreuse (DFS) et la dyskinésie ciliaire primitive (DCP) appartiennent au dernier groupe.

A côté de ces anomalies monomorphes, certaines anomalies morphologiques hétérogènes peuvent éventuellement justifier une analyse à l'échelle ultrastructurale. Plusieurs structures du spermatozoïde sont alors anormales. Ces anomalies sont fréquentes, et parfois réversibles. Les *anomalies non spécifiques du flagelle* (NFSA) appartiennent à ce groupe.

V. STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DU SPERMATOZOÏDE NORMAL (Figures 1 et 2)

[25, 27, 52]

Le spermatozoïde est constitué de la tête (longueur 3,4-4,6 μm , diamètre 1,5-2,8 μm) et du flagelle (longueur 50 μm , diamètre décroissant de 0,8 à 0,2 μm). Le flagelle comporte 4 parties caractérisées par la présence d'éléments spécifiques : le cou, la pièce intermédiaire (longueur 3,5-5 μm , diamètre 0,8-0,6 μm), la pièce principale (longueur 44-50 μm , diamètre 0,5-0,4 μm) et la pièce terminale (longueur 4-6 μm , diamètre 0,2 μm). La région du cou comporte la pièce connective et le centriole proximal.

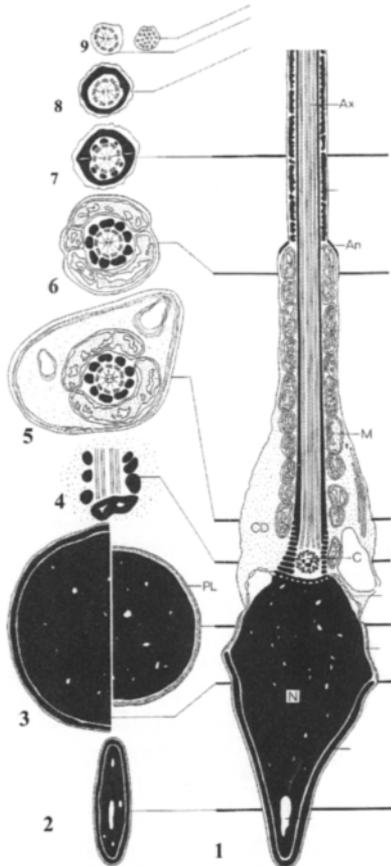


Figure 1 : Le spermatozoïde humain en microscopie électronique en coupe longitudinale (1) et en coupes transversales étagées (2-9), modifié d'après Holstein et Roosen-Runge [26].

2 et 3 : sections de la partie apicale (2) et distale (3) de la tête du spermatozoïde ;

4 : section au niveau du centriole proximal ;

5 et 6 : section au niveau de la pièce intermédiaire (5) et à proximité de l'annulus (6) du flagelle : la membrane plasmique est appliquée contre la gaine mitochondriale ;

7 : section de la pièce principale : la gaine fibreuse forme un anneau autour de l'axonème ;

8 : dans le segment distal de la gaine fibreuse, les colonnes et toutes les fibres denses externes ont disparu ;

9 : sections de la pièce terminale du flagelle ;

N : noyau, C : centriole proximal, CD : goutte cytoplasmique, M : mitochondrie, An : annulus, Ax : axonème, PL : lame dense post-acrosomale.

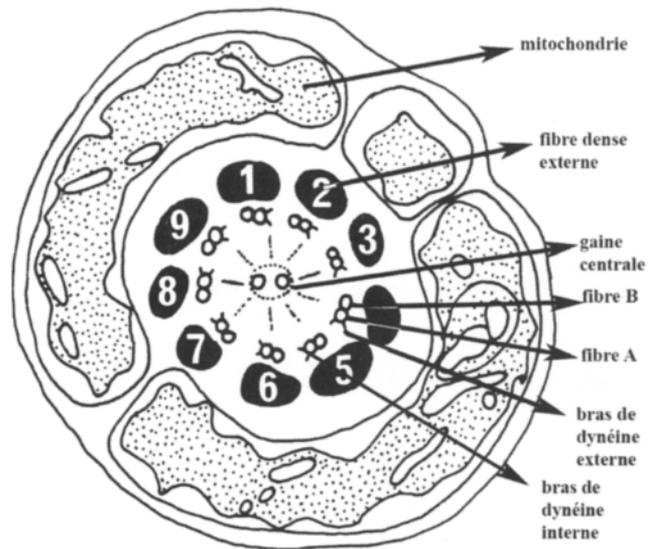


Figure 2 : Section transversale de la partie distale de la pièce moyenne du flagelle du spermatozoïde montrant le complexe axonémal, les fibres denses, les mitochondries directement appliquées à la membrane plasmique. Modifié d'après Holstein et Roosen-Runge [26].

La pièce intermédiaire comporte l'axonème entouré par des mitochondries, des citernes et des vésicules de réticulum endoplasmique. Dans la partie distale de la pièce intermédiaire, les mitochondries sont directement appliquées contre la membrane plasmique. L'annulus marque le début de la pièce principale.

1. L'axonème est présent dans toutes les parties du flagelle. C'est un cylindre composé de 9 microtubules en doublets périphériques entourant une paire centrale de microtubules (configuration 9+2). Chaque doublet est constitué de 2 sous-unités apposées (A et B), composées de protofilaments de tubuline. De chaque sous-unité A partent 2 bras de dynéine vers la sous-unité B du doublet voisin. La dynéine est une protéine de structure à activité ATPase utilisant l'ATP comme source d'énergie afin de générer le mouvement du flagelle. Chaque paire de microtubules périphériques est connectée à la paire adjacente par des liens de nexine, et connectée à la paire centrale par 9 ponts radiaires.

2. Les structures péri-axonémales comportent les mitochondries, les fibres denses et la gaine fibreuse. Au niveau de la pièce intermédiaire et de la pièce principale du flagelle, l'axonème est entouré par des fibres denses et par une gaine fibreuse uniquement au niveau de la pièce principale. Les fibres denses sont constituées de 9 structures cylindriques minces de longueur variable associées avec le doublet périphérique correspondant. Au niveau de la pièce intermédiaire, les mitochondries forment un manchon hélicoïdal autour des fibres denses. Dans la pièce principale, la gaine fibreuse est organisée en 2 colonnes longitudinales liées aux doublets axonémaux 3 et 8 (dans le plan des microtubules centraux).

3. Le mouvement flagellaire résulte des glissements des microtubules par des cycles successifs d'accrochage et de décrochage des bras internes et externes de dynéine sur les microtubules adjacents. Les ponts radiaires pourraient intervenir dans la courbure du flagelle. La gaine fibreuse est

en partie responsable du mouvement spécifique en vagues du flagelle du spermatozoïde.

La présence et la structure de l'axonème sont très conservées dans les cellules ciliées et flagellées des cellules eucaryotes. Cependant, seuls les flagelles du spermatozoïde des mammifères comportent la gaine mitochondriale, les 9 fibres denses externes de la pièce intermédiaire, et la gaine fibreuse de la pièce principale.

VI. PRINCIPAUX PHÉNOTYPES PATHOLOGIQUES DE LA TÊTE ET DE L'ATTACHEMENT TÊTE-FLAGELLE (TABLEAU 1)

1. Les spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome (globozoospermie) [18]

Ce phénotype a été décrit en 1971 par Schirren *et al.* [48]. C'est un phénotype rare dont la prévalence dans la population des hommes infertiles est estimée entre 0,05 et 0,1%.

Au spermocytogramme, alors que la tête du spermatozoïde normal a une forme ovale, la tête de tous les spermatozoïdes appartenant à ce phénotype est sphérique et ne présente apparemment pas d'acrosome. A la coloration de Schorr, la tête des spermatozoïdes apparaît dense et homogène. Pour avoir la certitude de l'absence de l'acrosome, il est recommandé d'évaluer son intégrité de structure en microscopie électronique. En effet, la relation entre la forme sphérique de la tête et l'absence d'acrosome n'est pas une règle absolue. Dans un certain nombre de cas, l'acrosome peut être présent sous une forme d'un petit halo clair, donc très hypoplasique, et le phénotype correspond alors au syndrome du « mini-acrosome » décrit par Baccetti *et al.* en 1991 [3].

La présence ou non d'acrosome peut également être étudiée en immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre les constituants protéiques de l'acrosome. La plupart des marqueurs de l'acrosome et de sa membrane sont absents : acrosine, phospholipase A2, agglutinines, synaptobrevine. Des anomalies du noyau, des mitochondries et/ou du flagelle accompagnent parfois l'anomalie de la tête. A côté de l'aspect typique des têtes de spermatozoïdes du sperme frais en contraste de phase et sur frottis coloré, les paramètres de concentration et de mobilité du spermogramme sont le plus souvent normaux.

Cependant, le contexte d'infertilité est toujours présent. Une incidence familiale a été rapportée dans l'hypoplasie de l'acrosome [3], et l'absence d'acrosome [8, 9, 23, 30], laissant penser à la participation d'une composante génétique. Très récemment [18], une mutation homozygote d'un gène spécifique de la spermatogenèse codant une protéine localisée dans l'appareil de Golgi et les vésicules proacrosomiales, donc directement impliquée dans la formation de l'acrosome, a été identifiée dans une famille consanguine de 3 frères atteints de globozoospermie. Ces observations suggèrent une possible transmission sur un mode autosomique récessif. Un cas de globozoospermie associé à une microdélétion dans les régions AZF a et b du chromosome Y a été décrit [56], montrant que des microdélétions peuvent coexister avec ce phénotype.

L'acrosome du spermatozoïde mature dérive de la transformation de l'appareil de Golgi durant la spermiogenèse. L'acrosome est un sac aplati rempli de matériel dense riche en enzymes hydrolytiques. Dans la globozoospermie, on observe plusieurs anomalies de mise en place des structures de la tête durant la spermiogenèse. Le complexe golgien ne s'attache pas au noyau,

le granule acrosomique ne se développe pas, et ses activités sécrétoires font défaut. L'acrosome en formation est alors phagocyté par les cellules de Sertoli. En microscopie électronique, la globozoospermie est caractérisée par une absence d'élongation du noyau, d'acrosome et du feuillet post-acrosomique. Tous les constituants biochimiques de l'acrosome sont absents. La chromatine est également souvent immature. Ces spermatozoïdes présentent des anomalies nucléaires et périnucléaires diverses [20], conférant à ce phénotype une certaine hétérogénéité.

2. Les spermatozoïdes sans tête (décapités, acéphaliques, pinheads)

Il s'agit d'anomalies rares des spermatozoïdes dues pour certains phénotypes à un défaut de migration du centriole au pôle caudal du noyau de la spermatide durant la spermiogenèse. Comme dans la globozoospermie, les patients présentent une stérilité primaire sans autre désordre andrologique. Sur le sperme frais en microscopie optique, le phénotype est le plus souvent homogène avec l'observation de très nombreux flagelles mobiles dépourvus de têtes, et de très nombreuses têtes dépourvues de flagelles. On observe parfois la présence d'une goutte cytoplasmique sphérique à l'extrémité proximale des flagelles qu'il ne faut pas confondre avec la tête (d'où le terme « pinheads »). La séparation de la tête et du flagelle a certainement lieu dans le testicule ou dans l'épididyme, car il existe une fragilisation de l'attachement tête-flagelle. Les flagelles sans tête sont cependant mobiles et pénètrent dans le mucus cervical. Sur frottis coloré, la tératospermie est marquée : têtes isolées, flagelles courbes, acrosome anormal. La chromatine est normalement condensée au bleu d'aniline acétifié.

En microscopie électronique, les phénotypes ont une expression hétérogène, avec des anomalies diverses et de localisation variable. Certains phénotypes présentent une pièce connective intègre, d'autres une absence de plaque basale et fossette d'implantation, d'autres une dissociation de la partie basale et distale du centriole, ainsi qu'une dissociation entre le noyau et le centriole. L'anomalie du collet serait due à un défaut de migration du centriole au cours de la spermatogenèse. Lorsque la tête et le flagelle ne sont pas séparés, le plus souvent, ils ne sont pas alignés dans le même axe, et on peut observer à l'échelle ultrastructurale une vésicule qui sépare la tête du flagelle. Il existe ainsi probablement plusieurs mécanismes responsables de la formation des spermatozoïdes acéphaliques [15].

Une incidence familiale a été rapportée, mais aucune anomalie génétique n'a été décrite.

VII. PRINCIPAUX PHÉNOTYPES PATHOLOGIQUES FLAGELLAIRES (Tableau 1)

1. Phénotypes pathologiques flagellaires spécifiques et monomorphes

Un large spectre d'anomalies ultrastructurales des constituants du flagelle a été décrit [revue dans 14, 15]. Les constituants du flagelle sont à la base du mouvement des spermatozoïdes. Par conséquent, l'asthénospermie est la conséquence la plus visible des anomalies flagellaires.

La *dysplasie de la gaine fibreuse (DFS)*, et la *dyskinésie ciliaire primitive (DCP)* affectent la majorité des spermatozoïdes [13], et ont souvent un caractère familial, et probablement une ou plusieurs composantes moléculaires et génétiques.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des phénotypes pathologiques en microscopie électronique.

Phénotype	Signe d'appel biologique spermatique	Spermocyto-gramme	Microscopie électronique	Examens complémentaires	Incidence familiale	Incidence géographique	Conseil génétique	Fécondance/traitement	Prévalence
Globozoospermie	tératospermie	têtes sphériques ± acrosome	phénotype homogène: pas d'acrosome/miniacrosome	Immunohistochimie anti-proacrosine	oui	non rapportée	conseillé	ICSI ± activation ovocytaire	0,05-0,1%
Pinheads	tératospermie	têtes et flagelles isolés	phénotypes hétérogènes	Immunohistochimie anti-MPM2	oui	non rapportée	conseillé	ICSI ± blastocyste	non rapportée
Anomalies non spécifiques du flagelle (NFSA)	asthénospermie ± tératospermie	normal/anomalies flagellaires diverses	anomalies axonémales diverses		non	non rapportée	non	30% fécondance spontanée IUI/FIV	67,4 à 76,6% dans l'asthénospermie
Dysplasie de la gaine fibreuse (DFS)	asthénospermie sévère tératospermie	anomalies flagellaires : court/épais/calibre irrégulier	phénotypes hétérogènes		oui	Afrique du Nord/Amérique de Sud	conseillé	ICSI avec test de vitalité	46 à 57% dans l'asthénospermie sévère/akinétospermie
Dyskinésie ciliaire primitive (DCP)	akinétospermie	normal	anomalies axonémales spécifiques (dynamine, microtubules)		oui	Iles Maoris et Samoan	conseillé	ICSI avec test de vitalité	46 à 57% dans l'asthénospermie sévère/akinétospermie

MPM = Mitotic Protein Monoclonal.

a) Les phénotypes de la dysplasie de la gaine fibreuse (DFS) présentent une asthénospermie très importante, avec une mobilité moyenne de $1,1\% \pm 3,1\%$, et progressive de $0,1\% \pm 0,9\%$ [14]. Au spermocytogramme, les spermatozoïdes ont souvent un flagelle court, épais et de calibre irrégulier. Des altérations identiques des spermatides attestent l'origine intratesticulaire des anomalies. Les phénotypes sont variés et caractérisés par des anomalies de l'arrangement des composants de la gaine fibreuse, désorganisation des colonnes longitudinales et des rayons transverses [22].

L'anomalie la plus fréquente est l'épaississement de la gaine fibreuse [12]. Des anomalies rares de la région médiane de la gaine fibreuse ont été récemment décrites [21]. L'axonème peut être intact, ou au contraire désorganisé (microtubules centraux et/ou bras de dynéine absents). Ces altérations spermatiques sont stables dans le temps, ont une incidence familiale chez plus de 20% des patients, sont favorisées par la consanguinité, et une incidence géographique particulière en Afrique du Nord et Amérique du Sud, ce qui suggère fortement une composante génétique de ces phénotypes. Environ 20% des patients ont des infections pulmonaires.

b) Les anomalies flagellaires primitives associées aux pathologies respiratoires définissent le *syndrome des cils immobiles*. Il s'agit d'un groupe de pathologies hétérogènes décrit pour la première fois par Afzelius en 1976 [1], nommé *dyskinésie ciliaire primitive* (DCP) par Rossman *et al.* en 1981 [45]. Les cils du tractus respiratoire présentent des structures communes avec les flagelles des spermatozoïdes : axonème, microtubules et protéines associées. Ainsi, les phénotypes de ce groupe sont parfois associés à des anomalies de la dynéine au niveau ciliaire. Environ 50% des patients présentent un *situs inversus* avec dextrocardie, correspondant au syndrome de Kartagener [2].

En microscopie optique, les spermatozoïdes sont immobiles avec un flagelle rigide, et ont une morphologie normale sur frottis coloré. Plusieurs phénotypes ont été décrits : absence des bras de dynéine internes et/ou externes sur les doublets périphériques, absence des microtubules centraux ou des ponts radiaires, absence d'axonème. Les anomalies quantifiées peuvent n'être que partielles. Il a été noté une incidence familiale des pathologies de ce groupe, ainsi qu'une forte incidence géographique dans les îles Maori et Samoa de Nouvelle Zélande [15]. Les anomalies sont variables, suggérant que différents gènes sont impliqués.

c) Au contraire des anomalies flagellaires homogènes qui viennent d'être décrites, **les anomalies non spécifiques du flagelle (NSFA)** affectent un nombre variable de spermatozoïdes, et sont fréquentes. Le signe d'appel biologique est une asthénospermie « banale » (mobilité moyenne $11,6\% \pm 10,2\%$, mobilité progressive $3,6\% \pm 4,7\%$ [14], car les anomalies ne sont pas visibles à la lecture du frottis coloré. En effet, les altérations ne modifient pas le diamètre flagellaire, et ne sont par conséquent visibles qu'à l'échelle ultrastructurale. Il s'agit essentiellement de modifications du nombre et de l'organisation des microtubules axonémaux avec modifications de la configuration « 9+2 » de l'axonème.

Ces phénotypes sont réversibles et parfois associés à des facteurs andrologiques tels la varicocèle, les infections génito-urinaires, les facteurs immunologiques. Une amélioration de la mobilité est parfois observée, offrant ainsi la possibilité d'augmenter la fécondance et les chances de procréation

naturelle, en insémination artificielle ou fécondation *in vitro* classique. Ce groupe d'anomalies n'a pas d'incidence familiale, ni de composante génétique, et ne pose pas *a priori* de problème de transmission à la descendance.

2. Prévalence des phénotypes pathologiques flagellaires

Selon une étude récente [24], les anomalies non spécifiques du flagelle (NSFA) touchent un pourcentage important des patients asthénospermiques (67,4 à 76,6%). Dans un groupe d'éjaculats sélectionnés avec une mobilité de 0% sans nécospermie, l'incidence des anomalies flagellaires primitives spécifiques est de 46%. Dans une série récente [38], 57% des patients sélectionnés pour asthénospermie sévère et/ou anomalies du mouvement des spermatozoïdes présentent un phénotype du groupe des anomalies flagellaires primitives spécifiques (DFS ou DCP).

Au total, la probabilité d'observer des anomalies de la structure flagellaire à l'échelle de la microscopie électronique est élevée dans une population de patients soigneusement sélectionnée sur les paramètres de mobilité et vitalité lors du bilan spermatique standard.

3. Aspects moléculaires des phénotypes flagellaires [52]

Nous disposons actuellement de peu d'informations sur la constitution moléculaire des structures flagellaires impliquées dans le mouvement, et sur les signaux intracellulaires et les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'assemblage et la fonction du flagelle du spermatozoïde humain. La plupart des informations viennent d'études sur les modèles animaux. Il est probable que les molécules impliquées dans le mouvement soient diverses : protéines de structure, d'assemblage, de signaux calciques, protéines phosphorylées, etc.

a) Le mouvement du flagelle résulte du glissement coordonné entre les doublets de microtubules externes sous l'action des dynéines-ATPases, et de la résistance qu'opposent à ce glissement certaines des autres structures axonémales. Lorsque des axonèmes purifiés sont analysés par électrophorèse, plus de 200 polypeptides sont dénombés. Le haut degré de conservation des structures du flagelle fait de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* le principal modèle d'étude des mécanismes moléculaires du mouvement du flagelle. Les avancées concernant la structure et le rôle des protéines axonémales dans le battement flagellaire proviennent de ce modèle. Plus de 200 protéines de structure de l'axonème et des structures associées ont été étudiées, permettant d'identifier des mutations affectant environ 50 loci impliqués dans la mobilité du flagelle [28].

b) La synthèse et l'assemblage des protéines axonémales sont contrôlés par des facteurs de transcription et des molécules de transport. Les alpha et bêta tubulines sont les protéines majeures des microtubules (70% des protéines totales de l'axonème). Elles sont codées par 2 gènes différents. Les dynéines sont des protéines motrices des bras externes et internes. Des mutations des gènes codant la dynéine sont impliquées dans la mobilité [24, 55]. Les anomalies flagellaires primitives spécifiques pourraient résulter d'une variété de mutations touchant d'autres gènes que ceux codant la dynéine [32].

c) La gaine fibreuse joue un rôle mécanique et de support dans la mobilité du spermatozoïde car elle amène une certaine rigidité à la structure du flagelle. Cependant, un rôle plus actif dans la mobilité a été récemment proposé, et cette structure « accessoire

» pourrait servir de centre « organisateur » de multiples signaux et cascades métaboliques [52].

Elle est majoritairement constituée de protéines d'ancrage appartenant à la famille des AKAPs (*A-kinase anchor proteins*), capables de liaison à des molécules de signalisation, et à la sous-unité de la protéine kinase cAMP-dépendante [37]. Des protéines apparentées aux filaments intermédiaires ont également été caractérisées dans la gaine fibreuse du spermatozoïde [11].

Plusieurs gènes humains codant pour des protéines de la gaine fibreuse ont été identifiés chez l'homme, tel AKAP4, AKAP3, et GAPD2 [21]. AKAP3 est impliquée dans la structure de la gaine fibreuse, et AKAP4 a un rôle majeur dans l'assemblage. Leur absence est la cause de l'immobilité des spermatozoïdes car la gaine fibreuse ne présente pas de système de transduction du signal [37]. L'absence d'AKAP4 chez la souris conduit à une réduction de la mobilité des spermatozoïdes et à l'infertilité [10]. Chez l'homme, un cas de délétion de la région de liaison AKAP3/AKAP4 a été récemment rapporté [4].

4. Composante génétique des phénotypes pathologiques du flagelle (revue dans Turner [52])

Des cas familiaux avec des anomalies flagellaires similaires sont fréquemment retrouvés dans les phénotypes primitifs spécifiques. Des incidences géographiques sont également observées, ainsi que la notion de consanguinité parentale. Ces phénotypes ne sont pas curables et sont stables. Tous ces éléments sont des arguments pour une composante génétique très probable de ces phénotypes. Compte tenu de la diversité des structures intervenant dans le mouvement du flagelle, et de la diversité des composants moléculaires impliqués (non encore complètement élucidés), de nombreux gènes sont potentiellement impliqués.

Le modèle murin fournit l'exemple de mutations des gènes codant pour différentes protéines de transport, structurales, motrices, facteurs de transcription, protéines de signalisation. Malheureusement, notre connaissance sur les bases génétiques de l'infertilité humaine est encore très fragmentaire.

Ce que l'on peut dire aujourd'hui :

1. **La dysplasie de la gaine fibreuse (DFS)** est caractérisée par une stérilité masculine associée à une asthénospermie sévère ou complète. Dans de nombreux cas, la DFS est familiale. Compte-tenu de la diversité des protéines d'ancrage AKAP dans la composition de la gaine fibreuse, des mutations d'AKAP3 et/ou AKAP4 sont suspectées être la cause possible des phénotypes.
2. **La dyskinésie ciliaire primitive (DCP)** est une affection hétérogène, caractérisée par une immobilité des flagelles, et dans un certain nombre de cas des cils. Des mutations de un ou plusieurs composants de la dynéine chaîne intermédiaire et/ou chaîne lourde ont été rapportées [6, 16, 26, 40, 41, 55]. Cependant, il est très probable que d'autres gènes soient impliqués dans la genèse de ces phénotypes. Cette affection est génétique avec un mode de transmission autosomique récessif, mais la revue de la littérature suggère également une possible transmission liée au chromosome X ou autosomique dominante.

VIII. PHÉNOTYPES PATHOLOGIQUES, ANEUPLOÏDIE ET ANOMALIES DE STRUCTURE DE LA CHROMATINE

Dans les tératospermies sévères, il est possible que la structure de la chromatine soit anormale ou qu'il existe un taux élevé de fragmentation de l'ADN, pouvant être à l'origine d'un non-développement embryonnaire ou d'un risque accru de malformations fœtales. Ainsi l'évaluation de la condensation de la chromatine (bleu d'aniline acétifié et/ou iodure de propidium), de la fragmentation de l'ADN (méthode TUNEL), et de la ploïdie (méthode FISH) chez ces patients est importante, dans les phénotypes pathologiques de la tête (globozoospermie), de la jonction tête-cou (pinheads), et également du flagelle.

1. Alors qu'un taux élevé d'aneuploïdie est parfois observé dans **la globozoospermie** pour les chromosomes 13, 21, X et Y [8], et 15, 18 [9], l'incidence des anomalies chromosomiques serait comparable à celle de spermatozoïdes de donneurs fertiles [33, 34, 54]. Dans une étude récente [39], l'analyse des spermatozoïdes globozoospermes en FISH révèle une corrélation positive entre la globozoospermie et le taux de disomie des chromosomes sexuels, ce qui suggère un risque augmenté de générer des embryons aneuploïdes par ICSI. D'autres auteurs rapportent une association entre globozoospermie et taux de fragmentation de l'ADN [53]. Ces observations rendent compte d'une part de l'expression variable de ce syndrome, et d'autre part des anomalies multigéniques probables.

2. Les anomalies structurales et ultrastructurales **du flagelle** peuvent être associées à des anomalies de ploïdie, même si l'on constate le plus souvent que la région de la tête apparaît bien constituée et mature [17]. Récemment, des fréquences augmentées du nombre de chromosomes des spermatozoïdes XX, YY, et diploïdes ont été rapportées chez 2 patients porteurs de dysplasie de la gaine fibreuse et un patient atteint de dyskinésie ciliaire primitive dans le syndrome de Kartagener avec *situs inversus* et bronchiectasie [44]. Dans une série plus importante [5, 17], une corrélation entre altération de la morphologie des spermatozoïdes et incidence élevée du nombre de chromosomes, diploïdie et aneuploïdie, a été établie. Dans les DFS, les spermatozoïdes présentent une incidence élevée d'anomalies du nombre des chromosomes, avec essentiellement des chromosomes diploïdes et des aneuploïdies des chromosomes sexuels [5]. Pour les autosomes, seul le chromosome 18 a été étudié, et le pourcentage de fréquence de disomie resterait dans des valeurs normales.

Ces observations sont en faveur d'une altération de la ségrégation méiotique dans le cas des anomalies structurales du flagelle d'origine génétique. Les données actuelles des différentes équipes de recherche sont cependant peu nombreuses et les résultats parfois contradictoires, expliqués par l'expression variable des phénotypes.

IX. POTENTIEL DE FERTILITÉ DES PHÉNOTYPES PATHOLOGIQUES ET PRONOSTIC EN AMP (TABLEAU 2)

La tératospermie et le potentiel de fertilité sont étroitement liés. La tératospermie est le résultat d'une combinaison d'anomalies morphologiques et de la perte de certaines fonctions des spermatozoïdes. Ainsi, les têtes anormales reflètent des anomalies

Tableau 2 : Résultats de l'ICSI dans les phénotypes pathologiques d'après la littérature.

Phénotypes	Nombre de patients	Taux de fécondation %	Nombre d'enfants
Globozoospermie (a)	19	47 ± 23	14
Pinheads (b)	4	72 ± 20	3
Dysplasie de la gaine fibreuse (c)	21	62 ± 12	16
Dyskinésie ciliaire primitive (c)	14	54 ± 14	8

a Données de [36, 35, 51, 29, 30, 31, 56].

b Données de [47, 42, 19].

c Données de [15, 38].

de l'organisation et de la fonction de la chromatine. L'évaluation de la tératospermie en microscopie optique haute résolution et en microscopie électronique a mis l'accent sur l'importance de l'acrosome, de la chromatine, de la zone de connexion tête-flagelle, et des centrosomes dans la fertilisation et l'obtention de grossesses [7, 14, 43].

1. Pour les spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome (globozoospermie), les patients sont infertiles et l'absence d'acrosome serait la cause principale de l'infertilité. Alors que les spermatozoïdes sont capables de traverser le mucus cervical, ils ne peuvent pas féconder spontanément l'ovocyte car les spermatozoïdes ne se fixent pas à la zone pellucide, ne fusionnent pas avec l'ovocyte, et ne le pénètrent pas. Les techniques de microinjection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI) doivent alors être utilisées.

Les résultats de l'ICSI avec ces spermatozoïdes sont moins bons que ceux de l'ICSI en général. Les spermatozoïdes sans acrosome présentent également des anomalies de structure et de contenu de la thèque périnucléaire, empêchant l'activation ovocytaire [20]. La fécondation serait améliorée par l'addition d'un ionophore du calcium, suggérant qu'un facteur spermatique activant l'ovocyte serait absent ou négativement régulé dans la globozoospermie [31, 46, 49]. Des grossesses ont cependant été obtenues sans activation des ovocytes [29, 30, 35, 36, 51, 56]. Le taux de fécondation est bas, et donc les taux de grossesse, dans le cas des phénotypes impliquant l'acrosome et la structure de la chromatine [15]. Le pronostic de fécondité est meilleur dans l'hypoplasie de l'acrosome car un petit nombre de spermatozoïdes présente généralement un acrosome et sont capables de féconder *in vitro* après microinjection et sans recours aux ionophores.

2. Dans les anomalies de l'attachement tête-flagelle (spermatozoïdes décapités), la fécondation naturelle ne peut pas avoir lieu car la formation de l'aster et la ségrégation chromosomique sont dépendantes de la présence de la pièce intermédiaire et du centrosome. Le seul moyen d'obtenir des embryons est la fécondation assistée avec micromanipulation. Cependant, les anomalies de l'attachement tête-flagelle font partie d'un des rares exemples de limitation du succès même de l'ICSI, car les spermatozoïdes ont tendance à se « casser » au niveau du collet pendant la micromanipulation précédant l'ICSI.

Il y a intérêt à pousser le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste pour juger de l'évolutivité des embryons. La littérature rapporte dans de rares cas l'obtention d'embryons, de grossesses et de naissance d'enfants après microinjection de spermatozoïdes [15, 19, 42, 47]. La fécondation des ovocytes en ICSI est possible bien qu'à faible taux, mais il n'y a pas de clivage. L'explication serait que durant la micromanipulation, le centrosome est séparé de la tête lors de l'immobilisation des spermatozoïdes. Le centrosome ayant un rôle déterminant, les spermatozoïdes doivent être analysés en microscopie électronique pour s'assurer de son intégrité et du phénotype en cause.

Dans ces phénotypes de la tête et de l'attachement tête-cou, les anomalies associées de la chromatine et du nombre de chromosomes sont responsables également d'un risque accru de fausses couches.

3. Comme la tératospermie, la mobilité des spermatozoïdes est un bon indicateur de fertilité. Les anomalies des organites du flagelle sont responsables dans la plupart des cas d'une asthénospermie. Environ 1/3 des anomalies non spécifiques du flagelle (NFSA) obtiennent de bons résultats en fécondité naturelle. A l'inverse, les hommes présentant une asthénospermie sévère avec un phénotype primitif acquis (DCP et FSD) sont incapables de procréation naturelle, et dans le passé, la possibilité de transmission d'éventuelles anomalies génétiques à la descendance était naturellement inexistante.

Actuellement, l'idée est acceptée que la microfécondation (ICSI) puisse « traiter » ce type d'infertilité. La principale difficulté lors de la réalisation de l'ICSI avec des spermatozoïdes immobiles est d'aspirer dans la pipette un spermatozoïde vivant, ce qui est possible grâce au test hypoosmotique. L'obtention de grossesses en ICSI et la naissance d'enfants dans les anomalies flagellaires primitives des spermatozoïdes sont possibles [15]. Malgré une atteinte de la quasi-totalité des spermatozoïdes, le pourcentage moyen de fécondation est supérieur à 50% [15, 38]. Ce pourcentage est comparable à celui habituellement rapporté en ICSI avec sperme éjaculé oligosperme (<http://www.fivfrance.com>). Cependant, le succès de l'ICSI peut être influencé par le type d'anomalies flagellaires. Le pourcentage des grossesses obtenues avec des phénotypes primitifs acquis est faible.

Une identification précise du phénotype pathologique en microscopie électronique renseigne sur le potentiel de fertilité qui

varie selon le phénotype, et également le risque génétique potentiel pour la descendance. Une information génétique sur la possibilité de transmission du phénotype anormal à la descendance doit être délivrée au couple dont l'homme est porteur d'un phénotype primitif. Il faut tenir compte également du risque de transmission des anomalies chromosomiques qui pourraient accompagner ces phénotypes.

X. CONCLUSION

Une étude du sperme à l'échelle de la microscopie électronique est un examen long et difficile dont l'indication doit être discutée dans un centre de Spermiologie-Biologie de la Reproduction en concertation avec l'équipe médicale d'aide à la procréation assistée : 1) chez un homme présentant *une infertilité primaire* sans exposition à des toxiques, médicaments et autres facteurs susceptibles d'interférer sur la qualité du sperme ; 2) après la réalisation d'*au moins 2 spermogrammes* dans un intervalle d'au moins 3 mois, et effectués dans les conditions optimales d'abstinence et de recueil, ce qui permet que *les anomalies observées soient stables* d'un cycle de spermatogenèse à l'autre.

Deux paramètres de l'analyse du sperme sont susceptibles d'indiquer une observation poussée des spermatozoïdes en microscopie électronique :

1. la morphologie des spermatozoïdes : *tératospermie extrême monomorphe touchant la plupart des spermatozoïdes* : spermatozoïdes à tête ronde microcéphale sans/avec petit acrosome ; têtes séparées des flagelles, isolées ; flagelles courts, épaissis, à calibre irrégulier. Dans ce dernier cas, la mobilité des spermatozoïdes est généralement affectée.

2. la mobilité : *asthénospermie* avec mobilité progressive des spermatozoïdes très diminuée, voire absence totale de mouvement, ou mouvements très désordonnés. Si l'asthénospermie est en rapport avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts, il faut plutôt rechercher une ou plusieurs causes à cette nécrospermie, plutôt qu'une anomalie structurale des spermatozoïdes en microscopie électronique.

Dans ces conditions, un *entretien* avec le patient permettra de connaître ses antécédents personnels, familiaux, son origine ethnique et géographique, et la notion de consanguinité familiale.

Au laboratoire, si la *préparation initiale du sperme* pour l'étude des spermatozoïdes en microscopie électronique ne présente aucune difficulté et les premières étapes réalisées sans matériel spécifique, le sperme fixé doit ensuite être confié à un laboratoire ayant la maîtrise de la technique des coupes ultrafines des spermatozoïdes, et son observation en microscopie électronique à un lecteur spécialisé dans la reconnaissance des organites du spermatozoïde dans tous ses plans de coupe, et dans la quantification des anomalies.

L'avènement des techniques de microfécondation ICSI permet d'avoir accès aux paramètres structuraux et fonctionnels des spermatozoïdes, et favorise l'évaluation des relations entre la qualité du sperme et la fertilité de façon objective. *La microscopie électronique est la seule capable de spécifiquement caractériser pratiquement toutes les anomalies fines de tous les organites du spermatozoïde.* Ces anomalies peuvent être extrêmement diverses, concerner un ou plusieurs constituants de la tête, de la pièce connective, et/ou du flagelle et de ses différents segments. Les résultats de l'observation en microscopie électronique permet le plus souvent d'expliquer l'infertilité. Les constituants moléculaires de la tête et du flagelle du spermatozoïde sont très

nombreux, pas totalement élucidés. La ou les composante(s) génétique(s) supposée(s) être à l'origine des phénotypes anormaux sont actuellement à l'étude, mais on peut déjà imaginer qu'un nombre important de gènes et de protéines puisse être défectueux.

Les résultats de l'étude des spermatozoïdes en microscopie électronique seront délivrés au patient, qui sera également informé non seulement du *pronostic de fertilité* en ICSI, mais du *risque possible de la transmission* des anomalies à la descendance, dans la limite des connaissances actuelles. En effet, dans les phénotypes où la majorité des spermatozoïdes est anormale et lorsque l'anomalie est stable, une composante génétique est présente ou fortement suggérée. L'observation de certaines anomalies des organites des spermatozoïdes altérés peut remettre en cause la justification de l'injection des spermatozoïdes anormaux en ICSI qui a révolutionné la prise en charge de ces phénotypes à mauvais pronostic de fertilité.

Il ne faut pas perdre de vue que ces phénotypes pathologiques puissent être associés à des anomalies de condensation de la chromatine, de l'ADN et des chromosomes, ce qui pourrait compromettre le développement embryonnaire. La prise en charge du couple en procréation assistée dépend de la nature des anomalies, d'où l'intérêt d'identifier précisément les phénotypes pathologiques. La microscopie électronique devient non seulement un élément prédictif du succès de l'ICSI, mais également un élément prédictif du risque de transmission à la descendance. Le taux de ploïdie des spermatozoïdes anormaux et la structure de la chromatine sont des anomalies associées qui doivent également être considérées dans la justification de la prise en charge et du succès de l'ICSI.

REFERENCES

1. AFZELIUS B.A. : A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*, 1976, 193 : 317-319.
2. AFZELIUS B.A. : Genetics and pulmonary medicine. 6. Immotile cilia syndrome : past, present, and prospects for the future. *Thorax*, 1998, 53, 10 : 894-897.
3. BACCETTI B., BURRINI A.G., COLLODEL G., PIOMBONI P., RENIERI T. : A "miniacrosome" sperm defect causing infertility in two brothers. *J. Androl.*, 1991, 12, 2 : 104-111.
4. BACCETTI B., COLLODEL G., ESTENOZ M., MANCA D., MORETTI E., PIOMBONI P. : Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 10 : 2790-2794.
5. BACCETTI B., COLLODEL G., GAMBERA L., MORETTI E., SERAFINI F., PIOMBONI P. : Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertil. Steril.*, 2005, 84, 1 : 123-129.
6. BARTOLONI L., BLOUIN J.L., PAN Y. et al. : Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 16 : 10282-10286.
7. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F., KOGOSOVSKI A., MENEZO Y., BARAK Y. : Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J. Androl.*, 2002, 23 : 1-8.
8. CARRELL D.T., EMERY B.R., LIU L. : Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1999, 71 : 511-516.
9. CARRELL D.T., WILCOX A.L., UDOFF L.C., THORP T., CAMPBELL B. : Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil. Steril.*, 2001, 76 : 1258-1260.

10. CARRERA A., GERTON G.L., MOSS S.B. : The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev. Biol.*, 1994, 165 : 272-284.
11. CATALANO R.D., HILLHOUSE E.W., VLAD M. : Developmental expression and characterization of FS39, a testis complementary DNA encoding an intermediate filament-related protein of the sperm fibrous sheath. *Biol. Reprod.*, 2001, 65 : 277-287.
12. CHEMES H.E., BRUGO S., ZANCHETTI C., CARRERE C., LAVIERI J.C. : Dysplasia of the fibrous sheath an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil. Steril.*, 1987, 48 : 664-669.
13. CHEMES H.E., OLMEDO S.B., CARRERE C. et al. : Ultrastructural pathology of the sperm flagellum : association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenospermic men. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, 9 : 2521-2526.
14. CHEMES H.E. : Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *J. Androl.*, 2000, 6 : 799-808.
15. CHEMES H.E., RAWE V. : Sperm pathology : a step beyond descriptive morphology. Origin, characterisation and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum. Reprod. Update*, 2003, 5 : 405-428.
16. CHODHARI R., MITCHISON H.M., MEEKS M. : Cilia, primary ciliary dyskinesia and molecular genetics. *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5, 1 : 69-76.
17. COLLODEL G., MORETTI E. : Sperm morphology and aneuploidies; defects of supposed genetic origin. *Andrologia*, 2006, 38 : 208-215.
18. DAM A.H.D.M., FEENSTRA I., WESTPHAL J.R., RAMOS L., VAN GOLDE R.J.T., KREMER J.A.M. : *Globozoospermia revisited*. *Hum. Reprod. Update*, 2007, 13 : 63-75.
19. EMERY B.R., THORP C., MALO J.W., CARRELL P.D. : Pregnancy from intracytoplasmic sperm injection of a sperm head and detached tail. *Fertil. Steril.*, 2004, 81 : 686-688.
20. ESCALIER D. : Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, 1990, 34 : 287-297.
21. ESCALIER D., ALBERT M. : New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity. *Fertil. Steril.*, 2006, 1 : 219e1-219e9.
22. ESCALIER D., SERRES C. : Aberrant distribution of the peri-axonemal structures in the human spermatozoon : possible role of the axoneme in the spatial organization of the flagellar components. *Biol. Cell.*, 1985, 53 : 239-250.
23. FLORKE-GERLOFF S., TOPFER-PETERSEN E., MULLER-ESTERL W. et al. : Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia*, 1984, 16 : 187-202.
24. FRANCAVILLA S., PELLICCIONE F., CORDESCHI G. et al. : Ultrastructural analysis of asthenospermic ejaculates in the era of assisted procreation. *Fertil. Steril.*, 2006, 4 : 940-946.
25. GATTI J.L., DACHEUX J.L. : Bases moléculaires du mouvement flagellaire. *Andrologie*, 1995, 5 : 15-30.
26. GUICHARD C., HARRICANE M.C., LAFITTE J.J. et al. : Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNA11) mutations result in situs inversus and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 68 : 1030-1035.
27. HOLSTEIN A.F., ROOSEN-RUNGE E.C. : *Atlas of human spermatogenesis*. Berlin, Grosse Verlag, 1981.
28. KAMIYA M. : Functional diversity of axonemal dyneins as studied in *Chlamydomonas* mutants. *Int. Rev. Cytol.*, 2002, 219 : 115-155.
29. KILANI Z.M., SHABAN M.A., GHUNAIM S.D., KEILANI S.S., DAKKAK A.I. : Triplet pregnancy et delivery after intracytoplasmic injection of round-headed spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 2177-2179.
30. KILANI Z.M., ISMAIL R., GHUNAIM S. et al. : Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers. *Fertil. Steril.*, 2004, 82: 1436-1439
31. KIM S.T., SHA Y.B., PARK J.M., GYE M.C. : Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient with mosaic Down syndrome. *Fertil. Steril.*, 2001, 75 : 445-447.
32. KOBAYASHI Y., WATANABE M., OKADA Y. et al. : Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22 : 2769-2776.
33. KULLANDER S., RAUSING A. : On round-headed human spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 1975, 20 : 33-40.
34. LALONDE L., LANGLAIS J., ANTAKI P., CHAPDELAINE A., ROBERTS K.D., BLEAU G. : Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1988, 49 : 316-321.
35. LIU J., NAGY Z., JORIS H., TOURNAYE H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A. : Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 626-629.
36. LUNDIN K., SJOGREN A., NILSSON N., HAMBERGER L. : Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1994, 62 : 1266-1267.
37. MIKI K., WILLIS W.D., BROWN P.R., GOULDING E.H., FULCHER K.D., EDDY E.M. : Targeted disruption of the AKAP4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol.*, 2002, 248 : 331-342.
38. MITCHELL V., RIVES N., ALBERT M. et al. : Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum. Reprod.*, 2006, 21 : 2065-2074.
39. MORETTI E., COLLODEL G., SCAPIGLIATI G., COSCI I., SARTINI B., BACCETTI B. : "Round head" sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 2005, 37 : 297-303.
40. OLBRICH H., HAFFNER K., KISPERT A. et al. : Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomisation of left-right asymmetry. *Nat. Genet.*, 2002, 30 : 143-144.
41. PENNARUN G., ESCUDIER E., CHAPELIN C. et al. : Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, 65 : 1508-1519.
42. PORCU G., MERCIER G., BOYER P. et al. : Pregnancies after ICSI using sperm with abnormal head-tail junction from two brothers: case report. *Hum. Reprod.*, 2003, 18 : 562-567.
43. RAWE V.Y., TERADA Y., NAKAMURA S., CHILIK C.F., BRUGO OLMEDO S.B., CHEMES H.E. : A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2344-2349.
44. RIVES N., MOUSSET-SIMEON N., MAZURIER S., MACE B. : Primary flagellar abnormality is associated with an increased rate of spermatozoa aneuploidy. *J. Androl.*, 2005, 26 : 61-69.
45. ROSSMAN C.M., FORREST J.B., LEE R.M., NEWHOUSE A.F., NEWHOUSE M.T. : The dyskinetic cilia syndrome ; abnormal ciliary motility in association with abnormal ciliary ultrastructure. *Chest*, 1981, 80 (6 Suppl.) : 860-865.
46. RYBOUCHKIN A.V., VAN DER STRATEN F., QUATAKER J., DE SUTTER P., DHONDT M. : Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 1144-1147.
47. SAIAS-MAGNAN J., METZLER-GUILLEMAIN C., MERCIER G., CARLES-MARCORELLES F., GRILLO J.M., GUICHAOUA M.R. : Failure of pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with decapitated spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1989-1992.
48. SCHIRREN C.G., HOLSTEIN A.F., SCHIRREN C. : *Über die morphogenese rundköpfiger spermatozoen des menschen*. *Andrology*, 1971, 3 : 117-125.

49. SCHMIADY H., SCHULZE W., SCHEIBER I., PFULLER B. : High rate of premature chromosome condensation in human oocytes following microinjection with round-headed sperm : case report. *Hum. Reprod.*, 2005, 20 : 1319-1323.
50. STONE S., O'MAHONY F., KHALAF Y., TAYLOR A., BRAUDE P. : A normal live-birth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation : case report. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 139-141.
51. TROKOUDES K.M., DANOS N., KALOGIROU L. et al. : Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 880-882.
52. TURNER R.M. : Tales from the tail : What do we really know about sperm motility ? *J. Androl.*, 2003, 6 : 790-803.
53. VICARI E., PERDICHIZZI A., DE PALMA A., BURELLO N., D'AGATA R., CALOGERO A.E. : Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities : case report. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2128-2133.
54. VIVILLE S., MOLLARD R., BACH M.L., FALQUET C., GERLINGER P., WARTER S. : Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies ? *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2563-2566.
55. ZARIWALA M.A., LEIGH M.W., CEPPEA F. et al. : Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia : evidence of founder effect in a common mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, 174 : 858-866.
56. ZEYNELOGLU H.B., BALTACI V., DURAN E.D., ERDEMLI E., BATIOGLU S. : Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 1833-1836.

Manuscrit reçu : novembre 2007 ; accepté novembre 2007.

ABSTRACT

**Ultrastructural morphological sperm abnormalities:
indications, phenotypes, and fertility potential**

Valérie MITCHELL, Marie-Claire PEERS,
Carole MARCHETTI, Maryse LEROY, Jean-Marc RIGOT,
Jean-Jacques LAFITTE, Alexandre MOERMAN,
Denise ESCALIER

Conventional semen analysis (sperm count) is limited to examination of spermatozoa at a magnification of x1,000, which may be insufficient in rare situations. Electron microscopy sperm examination allows high-power (x 100,000) analysis of sperm organelles and quantification of abnormalities of the constituents involved in sperm mobility and fertility potential. Electron microscopy sperm morphology examination is rarely indicated and is reserved to: 1) severe monomorphic and stable teratospermia (globozoospermia = spermatozoa with a round head and no acrosome, pinheads = decapitated spermatozoa), 2) partial (asthenospermia) or total (akinetospermia) alteration of sperm mobility and/or quality of sperm movement. All of

these anomalies are associated with primary infertility. Globozoospermia and pinheads can be detected by light microscopy.

Electron microscopy sperm morphology examination precisely identifies and quantifies sperm abnormalities. Pathological phenotypes have a heterogeneous expression. The organelles of spermatozoa other than those primarily involved in the pathological phenotype may also present alterations. Globozoospermia is generally characterized by the absence of elongation of the nucleus, and absence of the acrosome and the post-acrosomal region. The implantation fossa and basal plate are generally missing in decapitated spermatozoa.

Asthenospermia may be an indication for electron microscopy sperm examination when it is not associated with necrospermia. Sperm with fibrous sheath dysplasia (FSD) generally present a short flagella and very low overall mobility, less than 5%. The various phenotypes are characterized by abnormal arrangements of the constituents of the fibrous sheath and 20% of patients also present respiratory tract disease. In primary ciliary dyskinesia (PCD), spermatozoa are often immobile and present a normal morphology on light microscopy. Apart from the complete form with absent axoneme, incomplete forms are also observed with absence of the dynein arms, peripheral doublets, microtubules.

These phenotypes have a low prevalence in the population of infertile men. A familial incidence, parental consanguinity, and a high incidence in certain geographical regions are frequently reported, suggesting the existence of one or several genetic mechanisms. Despite the limited state of knowledge at the present time, couples must be informed about the possible transmission of the phenotype to their descendants.

All men with these phenotypes are spontaneously infertile. The only alternative fertilization technique is intracytoplasmic sperm injection (ICSI). According to the literature and our own experience, the results of ICSI with sperm presenting these phenotypes are poorer than those of ICSI in general.

Electron microscopy is not only a diagnostic tool in severe male infertility, but also a prognostic indicator of the success of management by ICSI, which must be evaluated for each case.

Key Words : *electron microscopy, globozoospermia, pinheads, fibrous sheath dysplasia, primary ciliary dyskinesia, ICSI*