

TEST COMBINÉ DE DENATURATION THERMIQUE ET DE COLORATION A L'ACRIDINE ORANGE DES SPERMATOZOÏDES LORS DE TENTATIVES DE FECONDATION IN VITRO.

Christophe ROUX (1), Christiane JOANNE (1), Marie-Claire CLAVEQUIN (1), Jean-Luc BRESSON (1), Germain AGNANI (2), Sanaï AKSOY (2).

CENTRE DE FECONDATION IN VITRO, C.H.U. St Jacques 25030 BESANÇON FRANCE (1) : Service de Cytologie Cytogénétique - CECOS. (2) : Service de Gynécologie Obstétrique.

HEAT-TREATMENT AND ACRIDINE ORANGE STAINING TEST OF SPERMATOZOA IN IN VITRO FERTILIZATION (IVF). The structural quality of sperm chromatin of 101 semen samples used in IVF was studied by a simple method. The embryo-cleavage is significantly lower when more than 20 % of the spermatozoa show an abnormal chromatin. The percentage of abnormalities is negatively related with the cleavage rate. This correlation is more evident when we consider only tubal infertility. The quality of sperm chromatin is an important factor in case of IVF failure. **Keys words :** Spermatozoa, chromatin, acridine orange, IVF. **Andrologie, 1991, 1 : 67-68.**

L'état de compaction de la chromatine du spermatozoïde humain dépend de l'intégrité du complexe ADN-nucléoprotéines. Diverses techniques ont été proposées pour en apprécier la qualité au niveau des spermatozoïdes éjaculés (pour revue voir 1). Dans ce travail, l'utilisation du Test Combiné de Dénaturation Thermique et de Coloration par l'Acridine Orange (2) a permis de rechercher dans le cadre de tentatives de fécondation in vitro (FIV) l'éventuelle influence de la qualité structurale de la chromatine des spermatozoïdes sur le résultat de la fécondation estimé par le taux de clivage embryonnaire.

MATERIEL ET METHODES

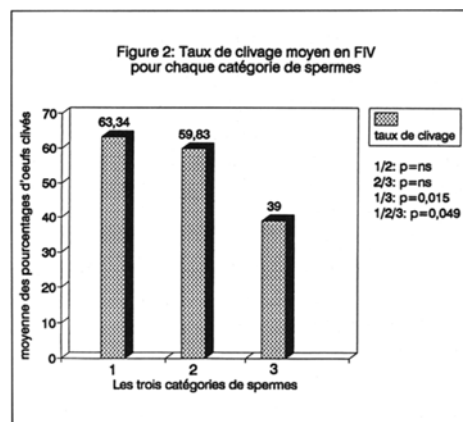
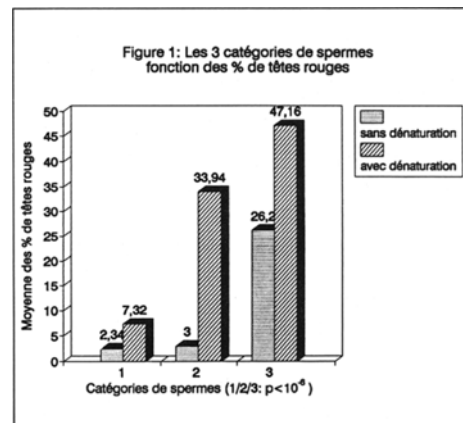
Nous avons analysé un échantillon de 101 prélèvements de spermatozoïdes utilisés pour FIV, et pour lesquels les spermatozoïdes étaient sélectionnés par technique de migration ascendante en milieu B2 de Menezo. Chaque échantillon a été stocké à -20° C dans du glycérol (V/V) avant d'être soumis au test de dénaturation thermique et de coloration par l'acridine orange (2) : Centrifugation-lavages, réalisation de frottis de spermatozoïdes fixés au Carnoy, dénaturation éventuelle pendant 5 mn à 87°C (acide citrique 80mM, Na2HPO4 15mM, pH 2,5), coloration pendant 5 mn par

l'acridine orange à 0,2/1000 dans la même solution, rinçage, montage à l'eau et observation en épifluorescence. La coloration par l'acridine orange de frottis de spermatozoïdes fixés et soumis ou non préalablement à une épreuve de dénaturation thermique, permet d'observer une fluorescence verte des noyaux normaux, ou une fluorescence rouge-orangée de ceux dont la chromatine présente des anomalies de structure. Le pourcentage de têtes à fluorescence rouge permet de classer les spermatozoïdes en trois catégories : Des spermatozoïdes à moins de 20 % de têtes rouges, considérés comme normaux sur le plan chromatinien (catégorie 1) ; des spermatozoïdes à plus de 20 % de têtes rouges du fait d'une fragilité de la chromatine à l'égard de la dénaturation thermique (catégorie 2), ou d'une anomalie chromatinienne indépendante de la dénaturation thermique (catégorie 3).

Le traitement statistique des données a fait appel à l'analyse de variance, au test t de Student et au coefficient de corrélation.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'application du test aux 101 prélèvements de spermatozoïdes utilisés pour FIV a permis de retrouver les trois catégories de spermatozoïdes (2) : (73 pour la première, 18 pour la seconde, 10 pour la troisième) (fig. 1). Une baisse significative du taux de clivage des embryons obtenus par FIV est observée lorsque l'on passe de la catégorie 1 (63 %) à la catégorie 3 (seulement 39 %) (fig. 2). L'analyse statistique globale avec ces 101 spermatozoïdes différents montre que les pourcentages



de têtes à fluorescence rouge considérées comme anormales sur le plan chromatinien sont inversement corrélés au taux de clivage. La corrélation s'effectue avec une probabilité plus forte après épreuve de dénaturation thermique (tableau 1).

Tableau 1 : Recherche des corrélations entre le taux de clivage et le pourcentage de têtes rouges.

	sans dénaturation thermique			après dénaturation thermique	
	n	r	p	r	p
Population totale	101	- 0,234	<0,02	- 0,311	<0,002
Indications tubaires	55	- 0,423	<0,002	- 0,539	<0,0005

Aucune corrélation significative n'est retrouvée entre le taux de clivage et les principaux paramètres spermiologiques (numération - mobilité initiale - pourcentage de formes normales). Afin de prendre en compte l'incidence d'un déficit ovocytaire dans ces taux de clivage, l'analyse a été limitée à la sous-population des indications tubaires (n = 55). Elle a permis de retrouver ces corrélations avec des taux de probabilité supérieurs (tableau 1).

Une anomalie structurale du complexe ADN-nucléoprotéines, apparaît donc comme un facteur important à considérer en tant que source d'échec de fécondation (estimé par le taux de clivage faible en FIV). Le Test Combiné de Dénaturation

Thermique et de Coloration par l'Acridine Orange est une méthode simple, indiquée dans la recherche d'une anomalie structurale du complexe ADN-nucléoprotéines. Il trouve son intérêt dans le cadre des analyses spermiologiques pré-FIV, et de façon plus générale dans tout bilan de stérilité masculine d'origine non établie.

REFERENCES

- 1 - Dadoune J.P., Modifications nucléaires des spermatides et des spermatozoïdes. Evaluation de la maturité nucléaire. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1991, 19 : 833-839.
- 2 - Roux C., Dadoune J.P. Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment : Evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia*, 1989, 3 : 275-281.

RESUME. La qualité structurale de la chromatine des spermatozoïdes de 101 prélèvements utilisés pour FIV a été appréciée par une méthode simple. Il existe une baisse significative du taux de clivage embryonnaire pour les prélèvements renfermant plus de 20 % de spermatozoïdes anormaux sur le plan chromatinien. Le pourcentage d'anomalies est inversement corrélé au taux de clivage. Cette corrélation est encore mieux objectivée si l'on ne considère que les FIV d'indications tubaires. Ainsi la qualité de la chromatine apparaît comme un des facteurs à considérer en tant que source d'échec de fécondation. **Mots clés :** Spermatozoïde, Chromatine, Acridine-Orange, FIV. **Andrologie, 1991, 1 : 67-68.**