Andrologie (1999), 9, n° 3, 347-375

Assurance de qualite en biologie de la reproduction

*Les textes qui suivent sont les résumés des interventions au cours des 2èmes Journées Nationales du Groupe de Travail " **Assurance de Qualité en Biologie de la Reproduction**" des 29 et 30 Janvier 1999, consacrées à deux thèmes : **Tests d'Interaction spermatozoïdes – mucus cervical et Tests de sélection des spermatozoïdes avant AMP**. La sélection des spermatozoïdes avant Assistance Médicale à la Procréation a fait également l'objet d'un article de synthèse de C.MATHIEU et H.LUCAS, publié dans le numéro précédent (Andrologie, vol.9, n°2,286-296).*

L'Assurance de Qualité en Biologie de la Reproduction : Plus Nécessaire que Jamais

G. DAVID

19, rue Gazan 75014 Paris

La Biologie a été la première des disciplines médicales à se soumettre à l'obligation d'une démarche Qualité. Il est vrai que les techniques d'automatisation qui, pour des raisons de rendement, ont envahi les laboratoires d'analyse médicale, ont facilité cette pénétration. En effet, l'automatisation implique la quantification et la standardisation.

Malheureusement, la Biologie de la Reproduction et surtout la Spermiologie sont longtemps restées à l'écart de ce mouvement. Il est vrai que le sperme comporte des difficultés particulières. La principale tient à la formidable hétérogénéité de la population cellulaire, tout d'abord parce que la population principale, celle des spermatozoïdes est souvent, surtout dans les cas d'hypofertilité, parasitée par d'autres populations, cellules précurseurs ou cellules d'autre origine. Même lorsqu'elle est pure, la population des spermatozoïdes est normalement très hétérogène. C'est ici que l'on trouve poussée à son maximum cette variabilité qui caractérise le vivant. On additionne en effet la variabilité interindividuelle, elle-même comportant une variabilité intraéjaculat et une variabilité interéjaculat. D'autre part, alors que dans les autres tissus ou organes, on peut parler en terme de moyenne puisque toutes les sous-populations éventuelles concourent à la fonction globale, il en est tout différemment du sperme où la valeur fonctionnelle va dépendre d'une seule cellule. Les moyennes doivent faire place ici à des distributions isolant des sous-populations dont il faut déterminer les potentiels spécifiques de fécondance.

Dans des conditions si particulières, on comprend combien est difficile l'évaluation du sperme. Aussi ne faut-il pas s'étonner que le développement des méthodes de microinjection ait un moment menacé de ruine tous les efforts des quelques équipes qui s'acharnaient encore à ce travail ingrat. Il a fallu beaucoup de volonté aux spermiologistes pour résister aux sirènes qui, jouant le pragmatisme et l'efficacité, estimaient que l'analyse du sperme pouvait être ramené à une seule question : " y-a-t-il un spermatozoïde dans l'éjaculat ? ".

En fait, la prédominance actuelle de cette

démarche pragmatique révélera vite ses limites et l'on sera forcé de revenir à la dure besogne analytique. Elle est, en effet, indispensable à un double point de vue.

Tout d'abord parce que dès maintenant, elle seule peut guider dans le choix d'une des techniques d'AMP. Nous en aurons de vifs exemples au cours au cours de cette journée consacrée aux interactions sperme-mucus cervical. Nous verrons que les indications et les modalités de l'insémination en découlent.

Mais par ailleurs, la démarche analytique est la clé de la compréhension de la diversité des infertilités masculines, abusivement considérés comme une entité unique. Il a fallu beaucoup de temps pour faire pénétrer l'idée de l'origine génétique de certaines hypofertilités masculines. Mais, à nouveau, nous assistons à une démarche " uniciste ". Et même doublement uniciste : premièrement parce que l'on part de patients très divers simplement réunis par la notion d'infertilité ou d'hypofertilité. D'autre part parce que l'on concentre toutes les explorations sur le seul chromosome Y. Or les données obtenues sur les animaux transgéniques nous apprennent la diversité des gènes en cause et de leurs localisations.

La démarche génétique n'a de chance d'aboutir que si l'exploration du phénotype qui est à son point de départ a été conduite jusqu'à l'isolement de phénotypes homogènes. Ce travail d'isolement des phénotypes est donc un préalable indispensable incontournable de l'identification des causes génétiques. L'infertilité masculine ne peut échapper à cette règle. En soulignant l'obligation du préalable de classification phénotypique, j'en reviens à la spermiologie. Car dans cette pathologie où la clinique est si pauvre, c'est au niveau du sperme qu'il faut conduire cette démarche de discrimination phénotypique. Ce qui nous ramène à la nécessité à ce niveau d'une démarche rigoureuse, répondant aux principes de l'assurance qualité.

Les Rôles Physiologiques du Mucus Cervical

F. CHRETIEN

Laboratoire de Physiopathologie de l'implantation et du Développement Université Pierre et Marie Curie, 9, Quai Saint-Bernard, Bât C 75252 PARIS Cedex 05

Elaborée sous l'influence oestro-progestative par des cellules sécrétrices tapissant l'épithélium du canal cervical et des cryptes qui en multiplient la surface [11], la sécrétion du col utérin est un hydrogel [16] constitué d'une phase solide, armature de filaments glycoprotéiques formant un maillage organisé comme une éponge, et d'une très importante phase liquide piégée par cette dernière [1,18]. Les volumes quotidiens de mucus sécrétés par le col, de l'ordre de 60 mg en dehors de la période ovulatoire, peuvent atteindre 1000 mg au milieu du cycle menstruel. Essentiellement constituée d'eau libre, la phase liquide représente en moyenne 92,50/o du poids total du mucus et plus de 98% en période ovulatoire. Elle est riche en protéines plus ou moins complexes, en nombreuses enzymes et en sels minéraux, NaCl et KCl, qui subissent d'importantes variations quantitatives au cours du cycle [15]. La dimension des mailles de l'armature, habituellement de l'ordre de 0,5µ évolue au cours du cycle menstruel pour dépasser 10 µ aux alentours de l'ovulation [3,4] .

Les variations quantitatives et / ou qualitatives de ses divers composants, en particulier des mailles glycoprotéiques, sont à l'origine des rôles physiologiques attribués au mucus cervical et qui facilitent la tâche des spermatozoïdes en période ovulatoire [5,7,9]. L'étude clinique du mucus ovulatoire s'avère donc primordiale [8].

1) Son pH alcalin permet aux spermatozoïdes les plus résistants de récupérer du stress d'acidité éprouvé au contact des sécrétions vaginales, de retrouver l'amplitude et la fréquence flagellaires optimales et d'échapper à une mort inopportune dès le début de leur périple [2].

2) L'élargissement des mailles permet aux spermatozoïdes de s'engager dans le mucus, de le traverser et d'entreprendre l'ascension du conduit cervical au milieu du cycle, synchronisant ainsi la période où le mucus est pénétrable avec celle où la conception est possible [6].

3) Dans les autres périodes physiologiques, y compris la grossesse et la ménopause, le rétrécissement des mailles bloque les éléments pathogènes à l'entrée du col, assurant ainsi l'aseptisation de l'utérus et des voies hautes [4,10]. Au milieu du cycle, l'élargissement des mailles est compensé par une teneur accrue de la phase liquide en lactoferrine et en lysozyme qui empêchent la prolifération des bactéries nuisibles et facilite leur destruction [17].

4) En immobilisant les asthéniques et la plupart des formes anormales, l'infrastructure maillée du mucus ovulatoire sélectionne une population spermatique optimisée qui sera seule capable d'atteindre les trompes [6].

5) Les contraintes capillaires rencontrées dans le conduit cervical orientent les filaments de la phase solide parallèlement à l'axe du conduit, orientant et guidant ainsi les spermatozoïdes dans la bonne direction avec un minimum d'obstacles [6].

6) Les battement des cellules ciliées tapissant le cervix repoussent les polynucléaires au centre du canal tandis que les spermatozoïdes vigoureux s'aident de leur flagelle pour longer l'épithélium où ils trouvent une tension partielle d'oxygène favorable [12]. Seuls seront ainsi phagocytés les morts et les asthéniques [1 4].

7) Les cryptes cervicales permettent un stockage temporaire de spermatozoïdes qui en repartent revigorés, augmentant ainsi les chances de rencontre avec l'ovule [13].

8) En fonction de ses propriétés physicochimiques au moment du coït, le mucus ovulatoire peut influencer le sexe du conceptus en favorisant la migration de spermatozoïdes porteurs de "Y", plus rapides, ou de "X", plus résistants [6].

REFERENCES

1. CHRETIEN F.C. The ultrastructure of human cervical mucus under scanning electron microscopy. Fertil. Steril., 1973, 24 : 746-757.
2. CHRETIEN F.C. La glaire cervicale. II. Propriétés physiques et chimiques, ultrastructure. J. Gyn. Obst.Biol. Repr.,1974, 3 : 711-744.
3. CHRETIEN F.C. L'évolution de la trame ultrastructurale de la glaire cervicale humaine au cours du cycle ovarien. J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1976, 5 : 313-331.
4. CHRETIEN F.C. Ultrastructure and variations of human cervical mucus during pregnancy and the menopause. Acta Obstel. Gynec. Scand., 1978, 57 : 337-348.
5. CHRETIEN F.C. Mesure objective des paramètres physico-chimiques du mucus cervical. Contraception-Fertilité-Sexualité., 1986, 14 : 23-27.
6. CHRETIEN F.C. The saga of human spermatozoa throughout the jungle of the female genital tract. Developments in Ultrastructure of Reproduction. Alan R. Liss, Inc. eds., 1989, 263-272.
7. CHRETIEN F.C. Mucus cervical. Encyclopédie Médico-Chirurgicale., 1996, 31-M-30, 1-8.
8. CHRETIEN F.C., BELAISCH, J. Etude clinique du mucus cervical ovulatoire. Contracept. Fertil. Sex., 1996, 24 : 359-367.
9. CHRETIEN F.C. La glaire cervicale : III. Rôles physiologiques. J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1977, 6 : 451-488.
10. CHRETIEN F.C., DAVID G. Temporary obstructive effect of human cervical mucus on spermatozoa throughout reproductive life. Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 1978, 8, 307-321.
11. CHRETIEN F.C., GUILLON G. Evolution de l'épithélium cilio-sécréteur de l'endocol utérin au cours du cycle menstruel chez la femme. J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1978, 7 : 1189-1206.
12. JASZCAK S., HAFEZ E.S.E. Sperm migration through the uterine cervix in the macaque during the menstruel cycle. Amer. J. Obstet. Gynec., 1973, 115 : 1070-1079.
13. MATTNER P.E. Formation and rétention of the spermatozoa reservoir in the cervix of the Ruminants. Nature (London)., 1966, 212 : 1479.
14. MATTNER P.E. The distribution of spermatozoa and leucocytes in the female genital tract in goats and cows. J. reprod. Fertil., 1968, 17 : 253-260.
15. MOGHISSI K.S., NEUHAUS O.W. Composition and properties of human cervical mucus. Immunoelectrophoretic studies of the proteins. Am. J. Obstet. Gynec., 1962, 83 :149-158.
16. ODEBLAD E. The functional structure of human cervical mucus. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 1968, 47 [suppl.1] : 59-68.
17. SCHUMACHER G.F.B., PEARL M.J. Cyclic changes of muramidase (lysozyme) in cervical mucus. J. Reprod. Med., 1969, 3 : 171-183.
18. VOLOCHINE B., CAZABAT A.M., CHRETIEN F.C., KUNSTMANN J.M. Structure of human cervical mucus from ligth scattering measurements. Human Reprod., 1988, 3 : 577-582.

Valeur Diagnostique des Tests d'Interaction Sperme - Mucus Cervical

J.M. KUNSTMANN

Service Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction HOPITAL COCHIN - 123 Boulevard de Port Royal - 75014 PARIS

Toute la physiologie du mucus cervical, en période préovulatoire, vise à favoriser l'accession des spermatozoïdes vers le site de la fécondation. Excellent milieu de survie, le mucus cervical permet par ailleurs d'augmenter les chances de conception avec un seul rapport sexuel dans les 2 à 3 jours précédant l'ovulation [5,12].

Si les techniques d'aide médicale à la procréation (AMP) permettent facilement de s'affranchir de cette étape en portant directement les spermatozoïdes dans la cavité utérine voire au contact même des ovocytes, quel intérêt y a-t-il à "s'attarder" à explorer l'étape de l'interaction sperme-mucus cervical ?

D'abord parce que face à tout couple consultant pour infertilité, le premier objectif à atteindre est bien celui d'obtenir, si possible, une grossesse dans des conditions naturelles et non pas de proposer une AMP systématique. Ensuite, parce qu'il importe de faire un diagnostic, de déterminer la responsabilité masculine ou féminine pour permettre une orientation thérapeutique.

L'étape de l'interaction sperme mucus cervical mérite donc d'être explorée chez tout couple consultant pour infertilité par la pratique d'un **test postcoïtal** ou **test de Hühner** programmé en période préovulatoire, 9 à 24 heures après un rapport sexuel.

Son interprétation ne sera possible qu'à condition d'une programmation rigoureuse tenant compte de la période préovulatoire de la patiente, le test associant aux prélèvements vaginal, de l'exocol et de l'endocol, un interrogatoire, un examen soigneux du col et du vagin, enfin une évaluation précise quantitative et qualitative du mucus cervical par le score d'Insler.

D'emblée des facteurs pouvant être à l'origine d'un test défavorable peuvent ainsi être dépistés :

- anomalies cervicales (exposition au Diethylstilbestrol (DES), conisation, infection,...)
- troubles de la fonction coïtale (hypospadias, rétro-éjaculation,...)
- troubles de l'ovulation avec hypo-oestrogénie

Le test de Hühner est considéré comme positif lorsque le prélèvement endocervical déposé entre lame et lamelle et observé au grossissement final x400 témoigne de plus de 10 spermatozoïdes bien mobiles/champ, ce qui ne permet pas pour autant de prédire l'obtention d'une grossesse compte tenu des nombreux autres facteurs impliqués, tant sur le plan féminin que masculin. S'impose ensuite chez l'homme, la réalisation systématique d'un spermogramme spermocytogramme dans un laboratoire qualifié. En pratique, face à un test de Hühner positif, on pourra écarter une responsabilité masculine sous réserve que le spermocytogramme ne témoigne pas d'un profil morphologique excessivement perturbé (notamment des anomalies de la tête spermatique).qui pourrait remettre en cause la fécondance de ces spermatozoïdes au contact des ovocytes. Hormis un tel contexte qui justifierait des investigations complémentaires, un test de Hühner favorable incitera plutôt à pousser les investigations sur le plan féminin.

En cas de test de Hühner négatif ou trop faible, d'autant qu'il se confirme à un autre cycle, il existe un consensus pour considérer que le taux de conception est assez bas [2,7,11]. La négativité du test peut s'expliquer soit par une glaire cervicale défavorable, ce qui incitera à essayer de l'optimiser pour positiver le test ultérieurement, soit, par un déficit spermatique, et ce sont les résultats du spermogramme qui vont permettre de s'orienter :

- parfois vers une azoospermie justifiant un bilan spécifique
- parfois vers un déficit spermatique plus sévère (oligo-asthéno-tératospermie)

Mais le sperme peut aussi apparaître subnormal, n'expliquant pas alors la négativité du test de Hühner.

Aussi dans les deux dernières situations, face à tout test de Hühner négatif, la pratique d'un test de pénétration de la glaire *in vitro* va permettre de faire le point sur ce qui revient au facteur cervical ou spermatique dans la négativité du test de Hühner, d'autant qu'une analyse de sperme est faite le même jour. En effet, l'étude biologique de l'infertilité masculine ne peut uniquement reposer sur l'analyse du sperme, compte tenu de la subjectivité des méthodes d'analyse, notamment pour la mobilité et la morphologie.

De nombreuses études ont montré que la qualité des spermatozoïdes (qualité du mouvement, morphologie), témoin de leur fonctionnalité est plus que leur nombre le facteur le plus important pour l'expression de la fécondance. D'où la nécessité d'ajouter au spermogramme des tests explorant la fonctionnalité des populations spermatiques contenues dans un éjaculat.

La difficulté tient cependant, d'une part à l'hétérogénéité des populations spermatiques et d'autre part à la diversité des fonctions cellulaires des spermatozoïdes. Parmi celles-ci, la fonction cinétique ou flagellaire va non seulement assurer la migration dans les voies génitales féminines, dont la traversée du mucus cervical, mais aussi permettre la traversée des enveloppes périovocytaires suite à l'acquisition du mouvement hyperactivé. Or si l'on considère la fonction cinétique, nombreuses sont les études qui corrèlent d'une part les paramètres du mouvement et l'aptitude à la pénétration du mucus cervical [1,9,10], d'autre part, les paramètres du mouvement et la pénétration d'ovocytes dépellucidés de hamster en soulignant dans les deux cas l'importance du débattement latéral de la tête (ALH) [1,8]. Ainsi, une fonction cinétique normale des spermatozoïdes conditionne non seulement une bonne aptitude à la pénétration du mucus cervical mais aussi l'expression de la fécondance en relation avec l'aptitude à la pénétration ovocytaire [6].

Par conséquent, l'étude de l'interaction sperme-mucus cervical constitue un excellent test fonctionnel évaluant aussi, au travers de la fonction cinétique, un des aspects de la fonction de fécondance au contact des ovocytes [4].

Réalisé en période préovulatoire comme pour le test de Hühner après une abstinence sexuelle de 3 à 5 jours chez l'homme, le test de pénétration croisé dans la glaire *in vitro* va consister à prélever dans des capillaires des colonnes de mucus endocervical d'environ 5 cm et à les mettre en contact avec le sperme du conjoint et avec un sperme témoin, le sperme du conjoint étant lui-même mis en contact avec une glaire témoin. L'interprétation du test se fait sur l'analyse de la pénétration spermatique le long de la colonne de glaire une heure après la mise en contact, en fonction du niveau de progression des spermatozoïdes, de l'intensité de progression, et surtout du caractère bien progressif de la mobilité. Une lecture secondaire à 4 heures vérifie le maintien du caractère progressif de la mobilité, à savoir la survie. Le test sera considéré comme négatif face à une absence de pénétration initiale ou à une immobilisation plus ou moins tardive des spermatozoïdes.

Confronté à un test de Hühner négatif, si le spermogramme s'avère perturbé, quel peut être l'intérêt d'un test de pénétration croisé de la glaire *in vitro* ?

- Soit le test s'avère totalement négatif et il confirme la sévérité de la déficience fonctionnelle du sperme examiné pour l'ensemble de la population spermatique. Ce résultat impose une consultation andrologique pour traiter un éventuel facteur étiologique (infection, facteur immunologique, varicocèle ou, sur les données de l'interrogatoire, tout contexte général particulier éventuellement transitoire). En cas d'impossibilité d'amélioration du profil spermatique, se pose la question de la stratégie thérapeutique. En effet, une technique d'AMP de type conventionnel, insémination intrautérine (IIU) ou fécondation *in vitro* (FIV), expose ici à un risque de fécondance faible ou nulle [3].

- Soit le test est positif, témoignant qu'il persiste dans l'éjaculat une population spermatique fonctionnelle sur le plan de la mobilité. C'est alors un argument favorable pour espérer l'obtention d'une grossesse par mise en oeuvre d'une technique d'AMP conventionnelle, IIU ou FIV.

Mais c'est surtout dans la situation d'un test de Hühner négatif sans explication, avec sper-

mogramme et mucus cervical en apparence subnormaux, que le test de pénétration de la glaire *in vitro* croisé avec un sperme et une glaire témoins va jouer un véritable rôle diagnostique mettant en cause :

• Soit le facteur cervical en révélant une glaire inadéquate, voire la présence d'anticorps antispermatozoïdes dans le mucus cervical avec une mobilité sur place du type "shaking" alors que le sperme du conjoint se comporte bien dans une glaire témoin.

• Soit le facteur spermatique, évoquant ici la présence d'anticorps antispermatozoïdes dans le sperme toujours par une mobilité de type "shaking", ce qui incitera à doser et définir le type des anticorps ; évoquant ailleurs la possibilité d'une pathologie du mouvement incitant à une étude du mouvement et à une microscopie électronique pour identifier une éventuelle dyskinésie flagellaire ultrastructurale. Or dans ces deux situations les chances de fécondance peuvent être nulles ou basses en AMP conventionnelle incitant plutôt à tenter d'emblée une fécondation assistée par microinjection intraovocytaire (ICSI).

Au total, l'étude de l'interaction sperme mucus cervical, au même titre qu'un spermogramme doit être systématique chez tout couple consultant pour infertilité.

• Le test de Hühner permet d'évaluer la possibilité d'obtenir une conception dans des conditions naturelles. Sa positivité sous réserve d'une morphologie spermatique correcte, va plutôt orienter les autres investigations sur le plan féminin.

• En face d'un test de Hühner négatif, le test de pénétration croisé va permettre de révéler le facteur causal : sperme ou glaire, d'identifier des situations plus ou moins spécifiques dont certaines sont connues pour laisser espérer une faible fécondance en AMP classique et poser la question de recourir d'emblée à une ICSI.

REFERENCES

1. AITKEN RJ, SUTTON M, WARNER P, RICHARDSON DW. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. J. Reprod. Fertil., 1985, 73 : 441-449.
2. ALEXANDER NJ. Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil. Steril., 1981, 36 : 201,
3. BERBEROGLUGIL P, ENGLERT Y, VAN DEN BERGH M, RODESH C, BERTRAND E, BIRAMENE J. Abnormal sperm mucus penetration test predicts low in vitro fertilization ability of apparently normal semen. Fertil. Steril., 1993, 59 : 1228,
4. DE GEYTER CH, BAIS-PRATSCH M, DOEREN M, YEUNG CH, GRUNERT JH, BORDT J et al. Human and bovine cervical mucus penetration as a test of sperm function for in vitro fertilization. Human Reprod., 1988, 3 : 948-954.
5. HULL MGR, GLAZENER MA, WARDLE PG, MACLAUGHLIN EA, SYKES JA. Male infertility : sperm penetration of mucus related to natural and in vitro fertility. In : Ratman SS, Teoh ES, Amandakuar C, eds : Infertility, male and female. Advance in fertility and sterility. Lency (U.K.) : Parthenon. Publishing, 1986 : 31-38.
6. HULL MGR, MCLEOD FN, JOYCE DN, RAY BD, and MADERMOTT A. Human in vitro fertilization, in vivo sperm penetration of cervical mucus, and unexplained infertility, Lancet, 1984, 2 : 245-246.
7. HULL MGR, SAVE PE and BROMHAM DR (1982) Pronostic value of the post-coïtal test : prospective study based on time-specific conception rates. Br. J. Obstet. Gynaecol., 1982, 89 : 299-305.
8. JEULIN C, FENEUX D, SERRES C, JOUANNET P, GUILLET-ROSSO F, BELAISCH-ALLART J et al. Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. J Reprod. Fertil., 1986, 76 : 735-744.
9. KEEL B, WELBSTER B. Correlation of human sperm motility characteristics with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil. Steril., 1988, 49 : 138.
10. MORTIMER D, PANDYA IJ, SAWERS RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. J. Reprod. Fertil., 1986, 78 : 93-102.
11. ULSTEIN M : Evaluation of a capillary tube sperm penetration method for fertility investigations. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 1972, 51 : 287,
12. ULSTEIN M : Fertility of donors at heterologous insemination. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 1973, 52 : 97

Détection des Anticorps Anti-Spermatozoides dans le Mucus Cervical

M. DE ALMEIDA

Service d'Histologie Embryologie, Biologie de la Reproduction, Hôpital Cochin, 75014 Paris

Des titres élevés d'anticorps anti-spermatozoides (ASA) sériques associés le plus souvent à la présence de taux variables d'ASA dans le mucus cervical ont été trouvés chez 3 à 20 p. 100 des couples consultant pour infertilité [3]. Aucun antécédent gynécologique n'est significativement évocateur d'une alloimmunisation anti-spermatozoides. Le seul signe d'appel résulte de l'effet adverse des ASA présents dans les sécrétions cervicales sur la migration des spermatozoïdes. Ceci se traduit *in vivo* par des tests post-coïtaux négatifs ou faiblement positifs et *in vitro* par une mobilité sur place des spermatozoïdes ayant réussi à pénétrer plus ou moins la colonne du mucus cervical porteur d'ASA. Dans deux séries de femmes infertiles sélectionnées d'après "l'hostilité" de leurs sécrétions cervicales à la pénétration des spermatozoïdes, des ASA ont été trouvés dans 38% des cas [4]. La plupart de ces femmes présentaient des taux significatifs d'anticorps dans le sérum et dans le mucus cervical.

La recherche des ASA dans le sérum et dans le mucus cervical se fait, après transfert passif de ces anticorps sur des spermatozoïdes normaux et mobiles, par leur mise en évidence au moyen de diverses techniques dont les plus utilisées sont la spermagglutination, la spermimmobilisation en présence de complément et les immunobilles. Cette dernière technique présente plusieurs avantages dont la principale est de permettre l'analyse de la classe des ASA [1]. Les IgA prédominent au niveau du mucus cervical, tandis que les ASA sériques sont le plus souvent de classe IgG.

Dans notre expérience, des titres d' ASA supérieurs à 160 dans le sérum et à 32 dans les sécrétions cervicales sont un facteur majeur d'infertilité qui justifie la mise en oeuvre d'une aide médicale à la procréation [AMP]. En effet, chez ces couples le délai nécessaire pour concevoir est significativement augmenté et le taux cumulatif de grossesses est abaissé par rapport à des couples infertiles appariés ne présentant pas d'immunisation anti-spermatozoides [6]. Par ailleurs, la responsabilité des ASA dans l'infertilité est amplement démontrée par l'étude de leur répercussion *in vitro* sur les différentes étapes du processus de la fécondation. Les anticorps présents dans les sécrétions cervicales lient les spermatozoïdes à la trame glycoprotéique du mucus empêchant plus ou moins leur migration. L'importance de cet effet dépend non seulement du taux des ASA mais aussi de leur classe, les IgA étant plus inhibitrices que les IgG [1]. Au delà de ce premier point d'impact, les anticorps transsudés du sérum dans les liquides folliculaire et péritonéal, essentiellement des IgG, peuvent empêcher l'interaction des spermatozoïdes avec le complexe ovocytaire [2]. Le choix de l'AMP dépendra donc de la localisation des ASA. Leur présence exclusive au niveau des sécrétions cervicales justifierait la réalisation d'inséminations intra-utérines, mais l'intérêt réel de ce geste thérapeutique reste à démontrer. En revanche, la présence de titres élevés d'ASA dans le sérum impose la réalisation d'une fécondation *in vitro* [FIV] dans des milieux ne contenant pas de sérum autologue. Dans ces conditions, les bons taux de fécondations observés [5] permettent d'inclure l'alloimmunisation anti-spermatozoides parmi les indications féminines de la FIV.

REFERENCES

1. CLARKE G.N.: Detection of antispermatozoal antibodies of IgG, IgA and IgM immunoglobulin classes in cervical mucus. Am. J. Reprod. Immunol. 1984, 6 : 195-197.
2. CLARKE G.N., LOPATA A., JOHNSTON W.I.H.: Effect of sperm antibodies in females on human in vitro fertilization. Fertil. Steril. 1986, 46: 435-441.
3. DE ALMEIDA M.: Anticorps antispermatozoides et infertilité, dans: Immunologie de la reproduction, Voisin G.A. et coll., Eds. Flammarion Médecine Sciences, 1990: 151-166.
4. DE ALMEIDA M., JOUANNET P.: Sperm antibodies in cervical mucus, dans: Immunological factors in human reproduction, Shulman S. et coll, Serono Symposium 1982, 45: 19-27.

5. DE ALMEIDA M., HERRY M., TESTART J. et coll.: In vitro fertilization results from thirteen women with antisperm antibodies. Human Reprod 1987, 2: 599-602.

6. RIQUIER D.: L'iso-immunité antispermatozoides et sa répercussion sur la fertilité des femmes.Thèse de Médicine, Paris, 1985.

Intérêt Pronostique du Test Post-Coïtal

Y. SOFFER

Centre d'Infertilité masculine, Centre médical Assaf Harofé, Zérifin et Faculté de médecine Sackler, Tel Aviv, Israel.

Il est souvent nécessaire de faire une analyse fine du pouvoir fécondant des spermatozoïdes chez des couples infertiles. Le mucus cervical protège les spermatozoïdes et permet leur survie, assurant, à l'ovulation, une ascension continue de spermatozoïdes dans les voies génitales de la femme. Le test post-coïtal (TPC) a longtemps été la seule épreuve fonctionnelle des spermatozoïdes. Il teste la pénétration et la survie des spermatozoïdes dans la glaire cervicale, les premiers d'une longue série de phénomènes que doivent passer les gamètes mâles dans leur ascension vers l'ovule. Mais le TPC n'est pas dépourvu d'implications émotives et doit se faire le plus simplement possible pour éviter des inhibitions sexuelles. Dans les conditions optimales, le nombre de spermatozoïdes mobiles dans la glaire de l'endocol corrèle bien avec l'analyse du sperme et avec les chances de grossesses. En présence d'anticorps antispermatozoïdes, on ne trouve au TPC que fort peu de spermatozoïdes en contraste avec la qualité de l'éjaculat ou beaucoup, mais immobiles ou agités. On peut aussi faire des tests *in vitro*, (techniques de Kurzrok ou de Kremer) avec une glaire humaine ou avec des substituts bovins ou synthétiques. Dans un groupe de 338 cas de FIV que nous avons analysé [1], le TPC intègre le % de mobilité et le compte des spermatozoïdes dans l'éjaculat et corrèle bien avec le test du hamster. Ces éléments constitueraient un facteur de fertilité. Le TPC corrèle moins bien avec le test de l'hémizone. Ce dernier, par contre, intègre le % de formes normales et la qualité de la mobilité. Ces éléments constitueraient un second facteur de fertilité. Le TPC corrèle bien avec les taux de fécondations et de grossesses en FIV et contribue à dépister le groupe à haut risque dans lequel des examens fonctionnels complémentaires peuvent trier les couples redevables de microinjection. Cependant, le TPC a été critiqué pour sa méthodologie et surtout pour sa faible validité. Dans notre groupe de FIV, l'analyse de la validité du TPC et de tous les autres éléments d'appréciation de la qualité du sperme vis à vis des fécondations et grossesses confirme cette faible validité et montre qu'elle est commune à tous ces éléments d'appréciation, sans doute à cause de la nature multifactorielle du pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

L'analyse multifactorielle montre néanmoins que le TPC tient une place de premier plan parmi les examens pratiqués. Ainsi, l'évaluation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes ne peut se fonder sur aucune épreuve isolée. Elle requiert une cascade judicieuse d'examens appartenant aux deux facteurs de fertilité sus-

FIV :	**Taux de Fécondation**				**Taux de Grossesse**			
	Sens.	Spéc.	Préd.+	Préd.-	Sens.	Spéc.	Préd.+	Préd.-
Mobilité	0,32	0,95	0,60	0,68	0,10	0,97	0,89	0,34
Concentration	0,54	0,94	0,67	0,70	0,16	0,35	0,91	0,97
Morphologie	0,45	0,72	0,59	0,73	0,34	0,85	0,84	0,85
Anticorps	0,13	0,69	0,63	0,69	0,08	0,98	0,83	0,36
TPC	0,68	0,74	0,55	0,74	0,59	0,68	0,80	0,42
Hamster-test	0,32	0,70	0,80	0,70	0,22	0,99	0,37	0,98
Hémizona-test	0,52	0,85	0,57	0,82	0,42	0,86	0,41	0,87

mentionnés et c'est à leur lumière que l'on peut dresser un bilan valable et décider du geste thérapeutique rationnel.

REFERENCES

1. SOFFER Y., RAZIEL A., FRIEDLER S., KAUFMAN S., STRASSBURGER D., HERMAN A., RON-EL R. Place des tests d'interaction sperme-mucus dans le bilan Masculin de l'infécondité. Andrologie, 1998, 8 : 36-46

Approche Quantifiée du Test d'Interaction Spermatozoïdes-Mucus In Vitro par le SQA (Sperm Quality Analyzer) : Données Préliminaires

P.DARABI et J. AUGER

Service d'Histologie Embryologie, Biologie de la Reproduction, Hôpital Cochin, 75014 Paris

Des perturbations plus ou moins importantes de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical peuvent être à l'origine d'hypofertilités voire d'infertilités du couple. Le caractère subjectif et peu standardisé des tests de pénétration *in vivo* (TPC) et *in vitro* est probablement la raison essentielle de la forte controverse sur leur valeur pronostique. Le SQA est un appareil récent qui mesure les variations de densité optique au sein d'échantillons de sperme. Le résultat de ces mesures est synthétisé sous la forme d'une valeur unique, le Sperm Motility Index ou SMI (intervalle:0-350), corrélée à la concentration de spermatozoïdes mobiles progressifs. Plusieurs publications ont démontré la valeur pronostique du SMI, mesuré simplement, rapidement et de manière très reproductible. Nous avons évalué l'intérêt du SQA pour quantifier l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical.

L'interaction a été mesurée avec le SQA à partir de 129 spermes et mucus cervicaux de qualités variées. La qualité de la glaire a été évaluée à l'aide du score OMS. Le SMI a été mesuré dans le sperme à 37°C après 1h et 4h et dans des capillaires plats à 1cm et 9cm du bord inférieur après 1h et 4h d'interaction.

1) Données de base, tous spermes et tous mucus cervicaux étudiés (n=129)

	1h		4h	
SMI *sperme*	132±8		117±8	
	1h : 1cm	9cm	4h :1cm	9cm
SMI *mucus*	60±6	31±4	28±4	17±3

Les valeurs du SMI mucus intégraient à la fois le pouvoir de colonisation, de migration et de survie des spermatozoïdes dans le mucus cervical.

2) Données de base, spermes normaux* et mucus cervicaux ovulatoires* (n=79)

(*critères OMS: concentration spermatozoïdes mobiles ≥10x106/ml, score de glaire ≥ 12)

	1h		4h	
SMI sperme	154±8		148±9	
	1h : 1cm	9cm	4h : 1cm	9cm
SMI *mucus*	91±11	46±8	43±5	25±5

Les valeurs du SMI mucus étaient environ 50% plus élevées.

3) L'analyse en régression multiple a montré que le SMI mucus à 1h, à 1cm et 9cm, et à 4h à 1cm était positivement relié au score de la glaire ($p<0,003$, $p<0,01$et $p<0,001$) et à la concentration de spermatozoïdes mobiles ($p<0,0001$, $p<0,005$ et $p<0,008$). Le SMI mucus à 4h et à 9cm était positivement relié à la vitalité des spermatozoïdes ($p<0,02$) et à la valeur du SMI sperme après 4h d'incubation à 37°C ($p<0,05$).

En conclusion, l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical peut être facilement mesurée de manière précise à l'aide du système SQA. Ces premiers résultats suggèrent l'intérêt de cette approche pour le dia-

gnostic et le pronostic des hypofertilités du couple ainsi que pour des applications de recherche (pharmacologie, toxicologie de la reproduction,...).

Analyse des Procédures et de l'Evolution de la Pratique du Test de Hühner ou Test Post-Coïtal dans la Région Alsace

A. CLAVERT*, C. CRANZ*, F. SCHMITT**

**CECOS Alsace, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg ;*

***Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital E. Muller (Moenschberg) 68100 Mulhouse.*

Nous tenons à remercier les laboratoires d'analyses médicales: LAM du Bollmerk (Mulhouse), LAM Brugiroux, Frage et Kientz (Haguenau), LAM du Diaconat (Mulhouse), LBM (Kaysersberg), LAM Klump (Strabourg) et LAM des Vosges (Strasbourg) ainsi que le Laboratoire de Bactériologie (Hopital du Moenschberg, Mulhouse).

Le test de Hühner ou test post coïtal consiste à étudier le mucus cervical en période ovulatoire après un rapport. C'est un test simple, non douloureux, peu onéreux qui doit être réalisé en première intention lors de l'exploration d'une infertilité conjugale. Le fait que l'intérêt clinique et pronostique de ce test ait été discuté par certains auteurs peut s'expliquer par des imprécisions trop fréquentes dans sa réalisation et son interprétation.

Il s'agit d'un test global qui permet d'apprécier l'étape initiale d'une succession d'événements mettant en jeu les deux partenaires du couple et aboutissant à la fécondation. La qualité de ce test dépend effectivement de la sécrétion cervicale de la femme, de la qualité du sperme mais aussi de la qualité des rapports sexuels du couple.

S'il est positif, il est démontré que la sécrétion cervicale, la sécrétion oestrogénique, le sperme et le rapport sexuel sont dans les limites de la normale.

Par contre, s'il est négatif ou insuffisant, trois variables devront être considérées:

1) la qualité de la glaire qui dépend elle même de la qualité intrinsèque des glandes endocervicales, de la qualité de la fonction ovarienne, de la date dans le cycle c'est à dire la plus ou moins grande proximité de l'ovulation à venir. Sachant que la glaire n'est de qualité optimale que 48 heures environ avant l'ovulation [4], des résultats "faux négatifs" peuvent être enregistrés. Il apparaît là un paramètre important et parfois difficile à déterminer dans les cas de cycles irréguliers.

2) la qualité du sperme que l'on ne connaît pas toujours au moment de l'examen.

3) la technique coïtale: en effet, pour le couple, se voir imposer un rapport sexuel à un moment précis peut être mal vécu et le rapport sexuel devenir inefficace.

Différents auteurs [1,3] ont déjà publié des recommandations pour la bonne pratique de ce test.

ENQUETE SUR LES PRATIQUES DES LABORATOIRES

Localement, nous avons réalisé cette enquête pour connaître les pratiques des laboratoires d'analyses. Nous leur avons demandé de nous envoyer le double de tous les tests de Hühner réalisés en première intention. Ces laboratoires ont également accepté de répondre à un questionnaire et de faire des statistiques ponctuelles sur leur activité.

Lors d'une réunion préparatoire, nous avons défini des critères communs en nous inspirant de ceux de l'OMS [5]. Pour le prélèvement, tous les laboratoires utilisent un Aspiglaire permettant de prélever la glaire de l'endocol vers l'exocol sans blesser la muqueuse endocervicale.

En ce qui concerne la glaire, les paramètres qualitatifs étudiés sont cotés de 0 à 3 selon la méthode du score d'Insler [2].

Nous avons pu étudier 115 dossiers dont 89 ont été retenus. Nous avons éliminé les tests faits chez des femmes aux cycles irréguliers ou supérieurs à 31 jours.

ANALYSE DE LA PRATIQUE DU TEST

La mesure du pH endocervical est homogène d'un laboratoire à l'autre; par contre, le pH exocervical est très variable. Cette variabilité est liée au fait que certains laboratoires procèdent à une toilette vaginale avant de prélever alors que d'autres ne le font pas.

Dans 50% des cas, les laboratoires ne sont pas en possession des conclusions du spermogramme, ce qui peut rendre l'interprétation du résultat difficile.

Jour du prélèvement

Il est variable d'un laboratoire à l'autre. Les valeurs extrêmes des moyennes par laboratoire sont 13,06 et 14,13.

Suivi du test

Trois laboratoires ont pu étudier leur dossier et suivre l'évolution des examens demandés par la suite, les résultats sont identiques d'un laboratoire à l'autre:

- dans 14% des cas, le test est suivi par un test de contrôle,

- dans 1,5% des cas, par un second contrôle.

En pratique, l'analyse des résultats quantitatifs montre une grande homogénéité que ce soit entre les laboratoires ou au sein de chaque laboratoire. Ainsi cet examen peut être facilement normalisé et les résultats peuvent atteindre rapidement une cohérence suffisante pour réaliser des études épidémiologiques .

Quelques précautions particulières, notamment la réalisation d'une toilette vaginale, réalisée à l'aide d'une compresse sèche, permettra aisément d'harmoniser les résultats.

Cependant des résultats de cette étude, il apparaît que le moment de la réalisation du test qui est en général fixé par le médecin prescripteur, pose un problème qu'il convient de résoudre. L'existence de faux négatifs est liée à la réalisation trop tardive du test. En effet on sait que la sécrétion maximum de la glaire a lieu pendant un délai de 48 à 72 heures précédant l'ovulation, et c'est à ce moment que le test doit être réalisé ce qui n'est pas la pratique courante puisque la moyenne se situe autour de 14 jours pour des cycles inférieurs ou égaux à 30 jours. Depuis la FIV qui se réalise au moment de l'ovulation les gynécologues prescripteurs ont pris l'habitude de se repérer préférentiellement à ce moment. Adresser le couple plus tôt dans le cycle et autoriser le biologiste à refaire l'examen s'il estime être trop loin de l'ovulation permettrait aux gynécologues d'être plus efficaces dans l'exploration, en évitant d'être obligé de réaliser des contrôles lors des cycles suivants.

En outre l'interprétation du test de Hühner s'il n'est pas normal est difficile en l'absence de renseignements concernant la qualité du sperme. Il serait souhaitable de proposer au couple de réaliser un spermogramme dès le début de l'exploration.

Par ailleurs nous avons été frappé par un fait: 62% des test de Hühner initiaux sont de mauvaise qualité, or seuls 14% des tests pratiqués sont à nouveau contrôlés lors d'un cycle suivant. Ceci peut correspondre au fait qu'un autre facteur d'hypofertilité a été diagnostiqué, en général une dysovulation, et que de ce fait le facteur cervical soit relégué au second plan. Un traitement inducteur de l'ovulation est alors instauré, normalisant l'ovulation, mais sans vérification des effets de la thérapeutique sur la qualité de la glaire. Cette pratique peut être néfaste pour l'efficacité des traitements car des facteurs cervicaux et / ou vaginaux peuvent persister malgré la normalisation de l'ovulation.

EVOLUTION DE LA PRATIQUE DE L'ETUDE DE LA GLAIRE CES 10 DERNIERES ANNEES

L'unité de Biologie de la Reproduction du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital du Moenchberg à Mulhouse nous a transmis les statistiques concernant son activité de spermiologie, de test de Hühner et de test de migration *in vitro* ainsi que son activité d'insémination intra-cervicale et intra-utérine.

Ces graphiques (Figure 1) montrent clairement que le nombre de spermogrammes et de tests post-coïtaux varient peu alors que la pratique des tests de migration *in vitro* s'effondre. Cette évolution peut être mise en rela-

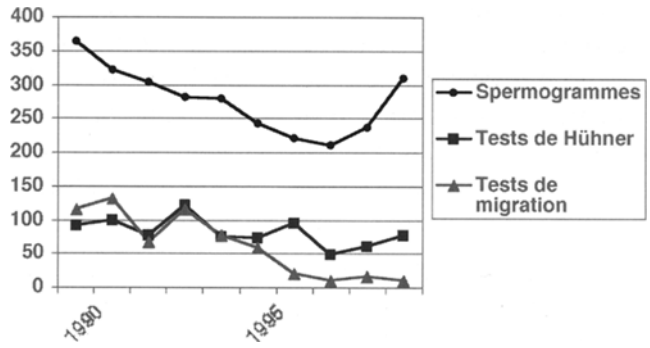

Figure 1

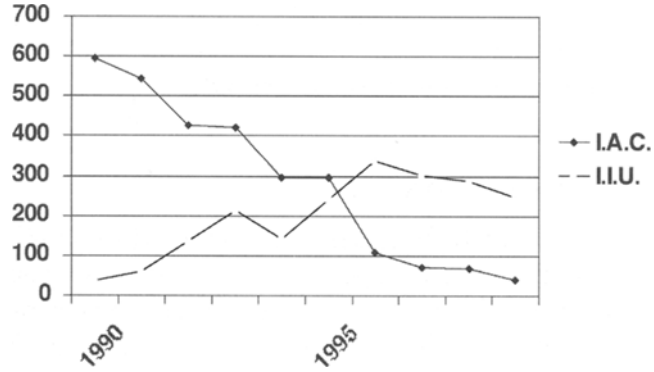

Figure 2

tion avec la diminution importante des inséminations intra cervicales et leur substitution par des inséminations intra utérines. Il est dommage de constater l'inflation de la technique d'AMP au détriment de l'exploration et du diagnostic.

CONCLUSIONS

Le test de Hühner ou test post coïtal est bien normalisé quant à son analyse biologique mais il existe une perte d'efficacité par une collaboration insuffisante entre prescripteur et biologiste ce qui entraîne des diagnostics incomplets et une inflation technique.

REFERENCES

1. BELAlSCH J. Le test post coïtal chez la femme. In: Période périovulatoire, Salat-Baroux et Thibault Ed. Masson. 1984 : 85-91.
2. INSLER V, MELMED H, EICHENHRENNER L, SERR DM, LUNNENFELD B. The cervical score. A simple semi quantitative method fbr monitoring of the menstrual cycle. Inter. Journal of Gynecol. and Obst. 1972, 10: 223-28.
3. LAVAUD M.C.: Le test post coïtal. Andrologie. 1994 4: 346-352.
4. SCHWARTZ D, MAYAUX M.-J., HEUCHEL V., CZYGLLK F., DAVID G. Importance of insemination timing and frequency in AID. in: Human artificial insemination and semen preservation David G et Ed. Plenum Press. 1980: 333-340.
5. World Health Organization : Laboratory manual for the examination of the human semen and sperm mucus interaction. Ed. Cambridge University Press. I992

Assistance Médicale à la Procréation et Sécurité Sanitaire

A.LORDIER-BRAULT

Direction Générale de la Santé, Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville, 1 Place Fontenoy, 75007 Paris

Jusqu'à la promulgation de la loi du 1er juillet 1998 relative à la sécurité sanitaire, certains produits, dont les milieux de culture utilisés en AMP, n'avaient pas le cadre légal réellement adapté à leurs spécificités d'utilisation, associant des phases *in vitro* et *in vivo.*

Fin 1996, dans le cadre des mesures visant à éviter toute contamination par l'agent du Creutzfeldt- Jakob, le Directeur Général de la Santé a décidé de soumettre tout produit entrant en contact avec des gamètes ou des embryons à l'avis du groupe d'experts de sécurité microbiologique créé au sein du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France en 1994. Ce groupe s'est penché en priorité sur les produits contenant des dérivés d'origine animale, surtout d'origine bovine ; mais par la suite, tous les milieux répertoriés à partir d'un questionnaire adressés aux équipes et contenant également des produits d'origine humaine ont été examinés. Depuis le début de l'exercice, 39 milieux de culture ont été examinés ; l'avis rendu ne porte que sur la sécurité microbiologique du produit . Le groupe a proposé quelques suspensions de produits et pour d'autres des modifications de formule (changement d'albumine ou d'acides aminés).

Il s'agissait d'une phase intermédiaire de sécurisation microbiologique des produits qui a permis d'attendre les nouvelles dispositions légales et leur application.

La loi du 1er juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme qualifie les milieux de "produits thérapeutiques annexes", définis à l'article L 667 du Code de la Santé Publique : il s'agit de tout produit entrant en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits du corps humain avant leur utilisation chez l'homme ou au contact d'embryons dans le cadre de l'AMP. Les produits thérapeutiques annexes sont soumis à un régime d'autorisation de mise sur le marché ; celle-ci est délivrée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé créée par la même loi, se substituant à l'Agence du Médicament avec des compétences élargies . L'autorisation tient compte de la qualité, de l'innocuité et de l'efficacité du produit.

L'Agence est également chargée d'élaborer des règles de bonnes pratiques pour leur préparation et leur utilisation et de suivre les effets inattendus ou indésirables .

La Préparation du Sperme avant une Assistance Médicale à la Procréation

D. LE LANNOU

Unité de Biologie de la Reproduction, CECOS de l'Ouest, CHR Hôtel-Dieu, 35000 Rennes

La préparation du sperme est indispensable avant la réalisation de toute AMP : en effet le sperme entier utilisé en Insémination intra-utérine peut entraîner des risques de chocs ou d'infections liés à l'introduction du plasma séminal dans la cavité utérine, et de même la présence du plasma séminal même à faible concentration inhibe la phase de reconnaissance spermatozoïde-ovocyte en Fécondation *in vitro*. Le lavage est donc indispensable pour enlever le plasma séminal, mais cette étape n'est pas suffisante et la plupart des méthodes utilisées aujourd'hui réalisent une sélection des spermatozoïdes mobiles et normaux concentrés dans un faible volume, en particulier en cas d'hypofertilité masculine.

Deux principales techniques sont aujourd'hui utilisées : La centrifugation migration ascendante, permettant de sélectionner les spermatozoïdes sur leur mobilité; la centrifugation sur gradient de densité, permettant de sélectionner les spermatozoïdes sur leur densité et donc leur morphologie. Ces deux techniques ont fait l'objet de nombreuses études comparatives dont nous allons décrire rapidement les résultats :

1. la sélection

Ces deux techniques permettent de recueillir une fraction de spermatozoïdes dont le pourcentage de formes mobiles et de formes normales est significativement augmenté. En terme de mobilité immédiate après la préparation, il n'y a peu de différence entre les deux méthodes. Par contre en terme de cytologie, les populations spermatiques sélectionnées sont significativement différentes, la migration sélectionnant surtout sur les anomalies flagellaires, alors que le gradient de densité sélectionne sur les anomalies de la tête et donc du noyau du spermatozoïde[8].

2. Le rendement

Le rendement d'une technique s'apprécie par le nombre de spermatozoïdes mobiles sélectionnés après préparation par rapport au sperme initial. Toutes les études ont montré un rendement supérieur après gradient de densité versus la centrifugation-migration. Pour les spermes normaux, le rendement est de 44% en gradient de densité *versus* 21% après migration [10], pour les spermes avec une oligoasthénozoospermie, de 18% *versus* 5% [11], pour les spermes congelés de 40% *versus* 12% [4] .

3. Le stress oxydatif

Plusieurs études ont montré que la centrifugation-lavage des spermatozoïdes augmentait le stress oxydatif dans le culot de spermatozoïdes

[2,7] A l'inverse la production de radicaux libres est diminuée dans la fraction haute densité d'un gradient [1]. La production des radicaux libres entraîne des altérations irréversibles de la membrane du spermatozoïde diminuant ces capacités fonctionnelles. L'adjonction de substances anti-oxydantes pendant la centrifugation-migration diminue le stress oxydatif et en conséquence améliore les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes [5].

4. Les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes

La capacité fonctionnelle du spermatozoïde après préparation du sperme peut être appréciée *in vitro* par plusieurs tests : la survie des spermatozoïdes à 24h en milieu de culture, l'apparition du mouvement hyperactivé et de la réaction acrosomiale lors de la capacitation *in vitro*. Dans tous les cas le gradient de densité permet l'obtention de spermatozoïdes présentant une meilleure capacité fonctionnelle [5], les différences étant d'autant plus marquées que les spermatozoïdes sont " fragiles " (les oligasthénozoospermies, les spermes congelés).

5. Le pouvoir fécondant

Plusieurs études ont montré une augmentation du taux de pénétration des spermatozoïdes préparé sur gradient de densité, *versus* la centrifugation-migration, dans les ovocytes dépellucidés de Hamster [9,1]. Utilisé en Fécondation *in vitro*, le gradient de densité augmente, en particulier dans les oligoasthénozoospermies, les taux de fécondation et les taux de grossesses par transfert [6,12]. Peu d'études concernent les résultats en insémination intra-utérine : une étude multicentrique dans les CECOS a montré une augmentation significative des taux de succès en IU avec le sperme congelé de donneur préparé en gradient de densité (18,2% *versus* 12,1% $p<0,01$), versus la centrifugation migration.

Au total, toutes les études ont confirmé la supériorité du gradient de densité sur la centrifugation-migration en particulier dans le cas d'oligospermies ou de spermes congelés. La simplicité de la technique et son faible coût doivent donc la faire préférer de première intention dans toute préparation de sperme avant AMP. La plupart des études précitées ont été réalisées en utilisant du Percoll en gradient de densité 2 ou 3 couches (90%, 75%, 45%). Le Percoll est aujourd'hui interdit d'utilisation en AMP, mais d'autres gradients de densité sont commercialisés depuis peu en France. Il s'agit de gradients à deux couches (90%, 45%), composés d'une suspension de particules de silice recouvertes de silane (PureSperm", Sill-Select"). Ces gradients sont livrés prêts à l'emploi, stériles, et donnent des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec le Percoll.

REFERENCES

1. AITKEN RJ, CLARKSON JS, FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxydation and human sperm function. Biol.Reprod., 1989, 40 :183-197.
2. AITKEN RJ, CLARKSON JS. Significance of reactive oxygen species and antioxydants in defining the efficacity of sperm preparation technics. J. Androl., 1988, 9 :367-376.
3. Fédération CECOS, LE LANNOU D. Bilan Fédération CECOS 1995 : utilisation des différentes méthods d'AMP. Contrac.Fertil.Sexual., 1996, 24 : 688-690.
4. FORD WC, McLAUGHLIN EA, PRIOR SM, REES JM, WARDLE PG, HULL MG. The yield, motility and performance in the hamster egg test of human spermatozoa prepared from cryopreserved semen by four different methods. Human Reprod., 1992, 7 : 654-659.
5. GRIVEAU JF, LE LANNOU D. Effects of antioxydants on human sperm preparation techniques. Human Reprod., 1994, 17 : 225-231.
6. GUERIN JF, MATHIEU C, LORNAGE J, PINATEL M, BOULIEU D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in a IVF program by selection on discontinuous Percoll gradients. Human Reprod., 1989, 4 : 798-804.
7. IWAZAKI A, GAGNON C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa in infertile patients. Fertil.Steril., 1992, 57 : 409-416.
8. LE LANNOU D, BLANCHARD Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. J.Reprod.Fertil. 1988, 84 : 551-556.
9. McCLURE R, NUNES L, TOM R. Semen manipulation, improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. Fertil.Steril. 1989, 51 : 874-877.

10. MORALES P, VANTMAN D, BARROS C, VIGIL P. Human spermatozoa selected by Percoll gradient or swim-up are equally capable to binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction. Human Reprod., 1991, 6 : 401-404.

11. NG LH, LIU DY, GORDON-BAKER HW. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. Human Reprod., 1992, 7 : 261-266.

12. VAN DER ZWALMEN P, BERTIN-SEGAL G, GEERTS L, DEBAUCHE C, SCHOYSMAN R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate : comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedure . Human Reprod., 1991, 6 : 581-588.

Les milieux synthétiques pour le traitement du sperme

Y.MENEZO, P. GUERIN

INSA, Biologie 406, 69621 Villeurbanne Cedex

La fécondation est un phénomène faisant intervenir essentiellement des problèmes de mobilité et des phénomènes membranaires. La finalité dernière, dans le cas des inséminations artificielles, est de permettre au spermatozoïde d'arriver sur le site de la fécondation en ayant conservé ses membranes acrosomiques intactes. Dans le cadre des fécondations *in vitro*, le traitement de sperme doit permettre une déstabilisation contrôlée des membranes de l'acrosome.

D'une façon générale, tous les éléments du milieu interagissent entre eux et aucune modification n'est anodine. Le pH doit être compris entre 7,2 et 7,4. : les ions bicarbonates étant l'effecteur majeur. Ils ont une fonction activatrice sur le spermatozoïde [6]. Les ions Ca et K sont également importants. Dans tous les cas, les milieux doivent être réducteurs afin d'éviter les peroxydations lipidiques néfastes ; la vitamine C permet de maintenir un potentiel Redox réducteur. Le glucose est un élément indispensable pour la nutrition du spermatozoïde. Les produits de son métabolisme peuvent acidifier et ainsi détériorer le milieu. Les aminoacides participent à la nutrition des spermatozoïdes (glycine). Cependant, la méthionine est importante comme précurseur de S-Adénosylméthionine, effecteur des méthylations impliquées dans les phases finales de la capacitation. Le rôle antiradicalaire de la Taurine et surtout de l'hypotaurine sont également importants. Ces deux composés, présents dans l'environnement tubaire [5], ont un rôle éminemment stabilisateur et protecteur des membranes. Cependant une trop grande concentration peut être inhibitrice en fécondation *in vitro* en empêchant les méthylations terminales précédant la fécondation. Il est également important de savoir que les radicaux libres interviennent dans la phase finale de la capacitation [2].

L'albumine est un effecteur important : elle lie des lipides utiles au spermatozoïde. Elle peut à la fois être stabilisatrice en empêchant la peroxydation des lipides membranaires du spermatozoïde, ses propres lipides étant peroxydés [3]. Elle participe aussi à la déstabilisation capacitante en échangeant ses lipides liés avec le cholestérol des membranes [1]. Elle peut être, dans les milieux de survie, d'origine humaine ou bovine. Du fait de l'apparition de l'Encéphalopathie spongiforme [EBS], mais aussi et surtout du fait des réactions d'allergie qu'elle peut provoquer chez certaines patientes au moment de l'insémination, l'albumine bovine doit être évitée.

Enfin, il n'est pas inutile de rappeler que le spermatozoïde peut être traité " pharmacologiquement ". En effet il possède des récepteurs alpha et bêta adrénergiques, ainsi que des récepteurs A2 [Adénosine]. Ainsi peut-on induire la capacitation par des catécholamines, de l'Adénosine ou du NECA à des doses de l'ordre de la micromole [4].

En conclusion, le but choisi déterminera la technique et les milieux à utiliser pour le traitement du sperme [7]. Il nous paraît clair que contrairement aux idées couramment émises, les nombreuses molécules " activatrices " et " capacitantes " présentes dans le tractus génital femelle, ont plutôt pour but d'éliminer le plus grand nombre de spermatozoïdes, au cours de leur remontée vers le site de fécondation [7]. En effet une capacitation prématurée élimine

inéluctablement les spermatozoïdes qui y ont été soumis. Il s'agit donc de maintenir un équilibre optimum entre lavage des spermatozoïdes et activation trop précoce. La rapidité du traitement *in vitro* est aussi un paramètre important pour résoudre avec succès l'équation " traitement du sperme ".

REFERENCES

1. DAVIS BK, BYRNE R, HUNGUND B. Studies on the mechanism of capacitation. II Evidence for lipid transfer between plasma membrane of Rat sperm and Serumalbumin during capacitation in vitro. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 558 : 257-266.
2. DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Human sperm hyperactivation and capacitation as part of an oxidative process. Free Rad. Biol. Med., 1993, 14 : 157-166.
3. DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization Mol. Human reprod., 1997, 3 : 175-194.
4. FENICHEL P, GHARIB A, EMILIOZI C, DONZEAU M, MENEZO Y. Stimulation of Human Sperm during capacitation in vitro by an Adenosine agonist with specificity for A2 receptors. Biol. Reprod., 1996, 54 : 1405-1411.
5. GUERIN P, GUILLAUD J, MENEZO Y. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. Hum. Reprod., 1995, 10: 866-872.
6. GARBERS DL, TUBB DJ, HYNE RV. A requirement of bicarbonate for Ca++ induced elevation of cAMP in guinea pig spermatozoa. J. Biol. Chem., 1982, 257 : 8980-8984.
7. MENEZO YJR. Culture media, Capacitation and acrosome réaction. In Fénichel P, Parinaud J eds. Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM, 1995, 236 : 287-293.

Enquête sur les pratiques du test de sélection des spermatozoïdes

C. GIORGETTI

LABM, 6, rue Rocca, 13417 Marseille Cedex 08

Le test de sélection des spermatozoïdes (TSS) est un examen inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale et soumis à entente préalable (chapitre 4 - Réf 0075-B120). Cet acte diagnostique comporte l'isolement des spermatozoïdes mobiles dans un milieu de fécondation *in vitro*, une numération du pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs et non progressifs avant, après migration et après un délai de six heures minimum ainsi que l'établissement de la morphologie avant et après migration.

Un questionnaire comportant 75 items a été distribué aux membres des sociétés : BLEFCO, CECOS, SALF et SFBC. Sur les 67 réponses obtenues 59 (88%) proviennent des BLEFCO et des CECOS.

La première partie du questionnaire concerne l'analyse des paramètres du spermogramme, notamment l'évaluation de la mobilité et l'étude de la morphologie.

Analyse des conditions d'étude de la mobilité (% de laboratoires) :

Utilisation d'un microscope à contraste de phase	66%
Observation au grossissement 400 à 600	62 %
Préparation d'une goutte calibrée	67 %
Utilisation d'une platine chauffante	27 %
Evaluation suivant les critères de lecture OMS	33 %

L'épaisseur de la goutte calibrée généralement admise est comprise entre 20 et 30 µm. Parmi les 39 laboratoires qui calibrent leur goutte moins de 50 % travaillent dans ces conditions. De plus on observe une grande dispersion pour ce paramètre (14µm à 104 µm).

Analyse des conditions d'étude de la morphologie (% de laboratoires) :

Utilisation de la coloration de Shorr ou Papanicolaou	89 %
Observation au grossissement 1000 - 1250	90 %
Grille de lecture de David +/- modifiée	79 %
Nombre de spermazotozoïdes observés > 100	100%
Calcul de l'index anomalies multiples	60 %

La deuxième partie du questionnaire concerne 2 TSS : le lavage-centrifugation-migration (swim-up) et le gradient de Percoll discontinu (GPD). Tout d'abord on observe pour ces deux techniques une dérive par rapport aux techniques le plus souvent décrites dans la littérature.

De plus on constate une variabilité importante dans les pratiques. Ainsi 3 types de tubes sont utilisés (5ml - 10 ml -15 ml).

Pour le swim-up le rapport volume de milieu de lavage/volume de sperme traité est très variable (0,3 à 13) et la resuspension du culot de centrifugation n'est pas systématique (83 % des cas). Le volume de milieu prélevé après migration varie aussi de façon importante (0,1 à 1,0 ml).

Pour le GPD, le nombre de phases varie de 1 à 6, et le volume des phases de 0,5 à 3 ml.

En conclusion : Cette enquête révèle une grande disparité des méthodes d'analyse et une dispersion importante dans les pratiques des TSS. Ces méthodes ont besoin d'être normalisées afin d'améliorer la puissance diagnostique du spermogramme et des TSS. Seule cette démarche permettra d'assurer une reproductibilité inter-laboratoire.