

Les larges vacuoles des têtes spermatisques sont-elles associées à des altérations du noyau ou de l'acrosome du spermatozoïde ?

Is there a relationship between large vacuoles in spermatozoa and nucleus or acrosome alterations?

A. Travers · A. Perdrix · F. Legrand · J.-P. Milazzo · J.-L. Do Rego · D. Escalier · B. Macé · N. Rives

Reçu le 5 mars 2010 ; accepté le 7 mai 2010
© SALF et Springer-Verlag France 2010

Résumé Objectifs : Rechercher la présence d'altérations nucléaires ou acrosomiques dans les spermatozoïdes présentant des vacuoles occupant au moins 13 % de la surface de la tête des spermatozoïdes (spermatozoïdes dits de type 3), détectées à l'aide de la technique MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*).

Matériel et méthodes : Notre étude a été effectuée sur des recueils de sperme de 20 hommes infertiles. Une évaluation de l'acrosome par immunomarquage à l'aide d'un anticorps monoclonal antiproacrosine (Mab4D4) a été associée à une détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL. La condensation de la chromatine spermatique a été évaluée par une coloration au bleu d'aniline, et le taux d'aneuploïdie a été déterminé par hybridation in situ en fluorescence (FISH). Une observation des échantillons spermatisques par microscopie électronique à transmission (MET) [sperme entier] et confocale [spermatozoïdes de type 3 isolés] a complété ces analyses. Les résultats ont été comparés entre des spermatozoïdes provenant du sperme entier et des spermatozoïdes de type 3 isolés.

Résultats : Une augmentation significative de la proportion d'acrosomes anormaux a été constatée dans les spermatozoïdes isolés de type 3 par comparaison au sperme entier ($77,8 \pm 2,49$ % vs $70,6 \pm 2,62$ %). La fragmentation de l'ADN a été observée de manière comparable dans les spermatozoïdes de type 3 et le sperme entier ($14,5 \pm 3,45$ % vs $11,5 \pm 1,25$ %), un défaut de condensation de la chromatine ainsi qu'une augmentation significative du taux d'aneuploïdie ont été retrouvés dans les spermatozoïdes isolés par comparaison à ceux provenant du sperme entier ($50,4 \pm 3,10$ % vs $26,5 \pm 2,60$ % et $7,8 \pm 1,98$ % vs $1,3 \pm 0,18$ %). Les larges vacuoles sont à localisation nucléaire exclusive (MET et microscopie confocale).

Conclusion : Les vacuoles seraient en relation directe avec un défaut de maturation nucléaire survenant au cours de la spermiogenèse. **Pour citer cette revue : Androl. 20 (2010).**

Mots clés Aneuploïdie · Chromatine · MSOME · Spermatozoïdes · Vacuoles

Abstract Objective: The aim of this study was to detect acrosome and nucleus alterations in isolated spermatozoa with large vacuoles detected by MSOME (Motile Sperm Organelle Morphology Examination), named type 3 spermatozoa and defined by the presence of one or more vacuoles occupying more than 13% of the sperm head area.

Material and methods: Twenty infertile men were included in this study. Whole sperm and isolated spermatozoa were compared. Spermatozoa acrosome and nucleus were explored using 1) proacrosin immunostaining with a monoclonal antibody (4D4), 2) DNA fragmentation with TUNEL assay, 3) chromatin condensation with aniline blue staining, and 4) aneuploidy after fluorescence in situ hybridization (FISH) and analysis by electron transmission and confocal microscopy.

Results: Acrosome abnormalities were significantly increased in type 3 spermatozoa compared to whole sperm ($77.8 \pm 2.49\%$

A. Travers · A. Perdrix · F. Legrand · J.-P. Milazzo · B. Macé · N. Rives (✉)
Laboratoire de biologie de la reproduction-CECOS, institut de biologie clinique, CIC Inserm 0204, EA 4308 « Spermatogenèse et qualité du gamète mâle », IHU Rouen Normandie, IFRMP23, CHU-hôpitaux de Rouen, 1, rue de Germont, F-76031 Rouen cedex, France
e-mail : nathalie.rives@chu-rouen.fr

J.-L. Do Rego
UFR sciences et techniques, IFRMP23, place Émile-Blondel, F-76821 Mont Saint-Aignan, France

D. Escalier
Département d'androgologie, CHU Le Kremlin-Bicêtre, 78, rue du Général-Leclerc, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France
Inserm U654, hôpital Armand-Trousseau, 26, avenue du Docteur-Arnold-Netter, F-75571 Paris, France

vs. $70.6 \pm 2.62\%$). DNA fragmentation was similar in type 3 spermatozoa compared to whole sperm ($14.5 \pm 3.45\%$ vs. $11.5 \pm 1.25\%$). Chromatin condensation was significantly altered in isolated spermatozoa as well as aneuploidy frequencies ($50.4 \pm 3.10\%$ vs. $26.5 \pm 2.60\%$ and $7.8 \pm 1.98\%$ vs. $1.3 \pm 0.18\%$). Large vacuoles have an exclusive nuclear location, confirmed by electron and confocal microscopy.

Conclusion: Large vacuoles are probably due to sperm nucleus maturation dysfunction during spermiogenesis. **To cite this journal:** *Androl. 20 (2010).*

Keywords Aneuploidy · Chromatin · MSOME · Spermatozoa · Vacuoles

Introduction

La spermatogenèse, fonction exocrine du testicule, regroupe l'ensemble des événements qui, à partir des spermatogonies souches, va permettre la production de gamètes matures haploïdes, les spermatozoïdes. La production de spermatozoïdes matures potentiellement féconds est la conséquence d'un long processus de différenciation et de maturation. La production excessive de spermatozoïdes morphologiquement anormaux responsables d'une tératozoospermie peut être la conséquence d'altérations aussi bien de la spermatogenèse que de la maturation épидидymaire. Une tératozoospermie importante peut compromettre le pouvoir fécondant des spermatozoïdes [1]. Le profil morphologique d'un sperme, paramètre le plus constant chez un homme [2-4], peut être analysé par différentes techniques d'imagerie, chacune ayant ses propres critères d'interprétation pour définir un sperme normal. La méthode la plus utilisée en routine est la microscopie optique, mais le grossissement final obtenu, $\times 1\,000$, est insuffisant pour étudier avec précision les organites et le noyau spermatique. Cette étude peut être effectuée soit par la microscopie électronique à transmission (MET), soit par la microscopie électronique à balayage.

Obtenir des informations précises sur la qualité ultrastructurale des spermatozoïdes constituerait une méthode fiable et nécessaire pour le diagnostic de l'infertilité masculine [5]. En effet, une relation semble exister entre morphologie (étudiée par MET et microscopie électronique à balayage) et pouvoir fécondant des spermatozoïdes *in vitro* [6], des altérations plus fréquentes du noyau et de l'acrosome étant constatées chez les hommes infertiles par rapport aux hommes fertiles [7].

Même si l'analyse ultrastructurale de la tête des spermatozoïdes semble être un paramètre clé pour évaluer leur pouvoir fécondant *in vitro*, l'analyse combinée entre microscopies optique et électronique n'est cependant pas applicable en routine pour des raisons de durée et de coût trop élevés, et ce, malgré une valeur prédictive positive atteignant les 80 % [5].

Bartoov et al. [8] ont développé la méthode du MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*). Le MSOME permet, grâce à l'utilisation d'un microscope inversé à contraste interférentiel équipé d'un objectif de Nomarski, d'observer la morphologie des spermatozoïdes mobiles en temps réel et à un grossissement de $\times 6\,600$. Les différentes parties du gamète mâle sont analysées (noyau, acrosome, pièce intermédiaire, flagelle), et une grande importance est accordée à la tête. Pour être considérée comme normale, celle-ci doit être ovale, lisse, symétrique, de dimension $4,75 \pm 0,28\ \mu\text{m}$ de long pour $3,28 \pm 0,2\ \mu\text{m}$ de large. La tête spermatique est considérée comme normale en l'absence de vacuoles ou quand une ou plusieurs vacuoles occupent moins de 4 % de la surface de la tête [8]. Une tête normale doit avoir une forme normale et un contenu normal.

Néanmoins, ces critères de normalités de la tête définis par Bartoov et al. en 2002, et plus particulièrement en ce qui concerne les vacuoles, ne sont pas transposables d'emblée dans un laboratoire pour des analyses de routine. De ce fait, il a été mis au point, en 2008, au sein du laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Rouen, un spermocytogramme MSOME utilisable en activité de diagnostic. Cette nouvelle classification a établi les limites entre spermés normaux et anormaux. Au total, cinq catégories de spermatozoïdes ont été obtenues en tenant compte du nombre et de la surface des vacuoles présentes au niveau des têtes des spermatozoïdes [9] :

- type 0 : aucune vacuole ;
- type 1 : une vacuole occupant]0–6,5 %] de la surface de la tête ;
- type 2a : une seule vacuole couvrant]6,5–13 %] de la surface de la tête ;
- type 2b : au moins deux vacuoles couvrant]0–13 %] de la surface de la tête ;
- type 3 : une ou plusieurs vacuoles occupant plus de 13 % de la surface de la tête.

Cette dernière surface vacuolaire moyenne, évaluée à plus de 13 % sur l'ensemble des spermatozoïdes analysés, n'est jamais observée dans les éjaculats provenant d'hommes aux paramètres spermatiques normaux et peut être considérée comme spécifique aux éjaculats les plus anormaux.

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant les structures de la tête du spermatozoïde associées à la présence de vacuoles :

- les vacuoles peuvent-elles être associées à des modifications morphologiques ou fonctionnelles de l'acrosome ?
- Les vacuoles sont-elles dues à des altérations du noyau spermatique ?

Ainsi, l'objectif de notre travail a été de caractériser ces vacuoles sur des spermatozoïdes de type 3 [9] dans une

population de 20 patients qui présentaient une térazoospermie. Des marqueurs d'évaluation de l'acrosome et du noyau du spermatozoïde ont été utilisés à la fois sur des spermatozoïdes issus du sperme entier mais également sur des spermatozoïdes de type 3, isolés préalablement à l'aide d'un micromanipulateur. Une analyse en microscopies confocale et électronique à transmission a complété cette étude.

Matériel et méthodes

Patients

L'étude a été conduite chez des hommes venus effectuer un recueil de sperme au laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Rouen entre janvier et avril 2009. Ont été inclus dans cette étude 20 patients âgés de 27 à 51 ans, venus au laboratoire pour la réalisation d'un spermogramme. La totalité des patients présentait une térazoospermie moyenne de 70 % (selon la classification de David modifiée) [10]. Pour chaque recueil, une étude des paramètres spermatozoïdiques conventionnels selon les critères de l'Organisation mondiale de la santé [11] a été effectuée.

Préparation des échantillons

Sperme entier

Le sperme est lavé deux fois avec du tampon PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) [10 minutes, 2 000 tours/minute]. Un premier culot, remis en suspension dans du PBS 1X, est étalé sur lames (Superfrost Plus[®], Menzel Gläser, Braunschweig, Allemagne) avant d'être fixé dans de la glutaraldéhyde 3 % [30 minutes, température ambiante] (Glutaraldéhyde[®], Sigma, Saint-Louis, MO, États-Unis). Un second culot est, quant à lui, remis en suspension dans du méthanol pur, fixé 30 minutes à -20 °C puis étalé sur lames (Polylysine Slides[®], Menzel Gläser, Braunschweig, Allemagne) (Fig. 1).

Spermatozoïdes de type 3 isolés

Après migration d'une fraction du recueil sur gradient de densité, un spermocytogramme MSOME est effectué sur la fraction migrée, puis les spermatozoïdes de type 3 sont isolés à l'aide d'une micropipette (ICSI Micropipets[®] MIC-50-30, Humagen, Charlottesville, États-Unis), à un grossissement $\times 6\,600$, en immersion, grâce à un microscope inversé à contraste interférentiel équipé d'un objectif de Nomarski (Leica DMI 6000B, Leica, Solms, Allemagne). Entre 30 et 50 spermatozoïdes sont déposés dans une goutte de PBS sur lames (Cytoslides[®], Thermo Fisher Scientific, Runcorn, États-Unis) avant d'être fixés par l'ajout de méthanol pur (Fig. 1).

Immunomarquage de la proacrosine et technique TUNEL

Les lames sont incubées avec du sérum de cheval dilué au 1/80^e (Horse Serum[®], Sigma, Saint-Louis, MO, États-Unis) [30 minutes, température ambiante], puis avec l'anticorps antiproacrosine Mab4D4 (ou 4D4) dilué au 1/100^e [1 heure, température ambiante] (Denise Escalier, Paris-V, France), ensuite avec une IgG de chèvre anti-souris biotinyllée diluée au 1/100^e (Anti-mouse affinity Isolated Biotin Conjugate[®], Sylenus, Hawthorn, Australie) [10 minutes, 37 °C] et enfin avec de l'Avidine Texas Red[®] (Detect B3, StarFish[®], Adgenix, Voisin le Bretonneux, France) diluée au 1/300^e [10 minutes, en chambre humide, à 37 °C]. Chacune de ces étapes est suivie d'un rinçage dans un milieu de lavage SSC 4X/Tween 20 0,005 % (Sigma, Chemical Co, Saint-Louis, MO, États-Unis). Les lames sont ensuite post-fixées dans du méthanol pur [2 heures, à 20 °C]. Les lames sont ensuite rincées deux fois dans du PBS 1X puis incubées [1 heure, à 37 °C] avec le réactif composé de l'enzyme (la TdT) et de son substrat (nucléotides marqués au FITC), conformément à ce qui est indiqué par le fournisseur (In Situ Cell Death Kit Detection POD[®], Roche, Mannheim, Allemagne). Après déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante, les lames sont contre-colorées par le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Counterstain 1, Adgenix, Voisin-le-Bretonneux, France) dilué au 1/1 000^e. Un nombre total de 500 spermatozoïdes est analysé sur les lames de spermatozoïdes issus du sperme entier à l'aide d'un microscope à épifluorescence au grossissement $\times 1\,000$ à immersion (DMRB[®], LEICA, Solms, Allemagne) couplé à un analyseur d'image (MacProbe[®] version 3.3, Perspective Scientific International LTD, Chester, Angleterre). La morphologie des acrosomes (normal, soit occupant la moitié de la surface de la tête, ou anormal, à savoir de forme atypique ou absente) et la fragmentation de l'ADN ont été caractérisées. Un spermatozoïde contient un ADN fragmenté si plus de 50 % de la surface de la tête présente une fluorescence verte. Des spermatozoïdes avec un marquage vert punctiforme pouvant être interprété comme un début de fragmentation de l'ADN sont également observés. La même évaluation est effectuée sur les lames contenant les spermatozoïdes isolés.

Coloration au bleu d'aniline

Les lames sont rincées deux fois à l'eau distillée, puis colorées par un bain de bleu d'aniline à 5 % pH 3,5 pendant cinq minutes (Gurr[®], BDH Laboratory Supplies, Angleterre). Elles sont ensuite rapidement rincées à l'eau distillée puis déshydratées dans des bains d'alcool [70, 90 et 100°, une minute chacun] avant d'être montées en baume (Eukitt[®], EUK 100, CML, Nemours, France). La lecture se fait sous lumière blanche au

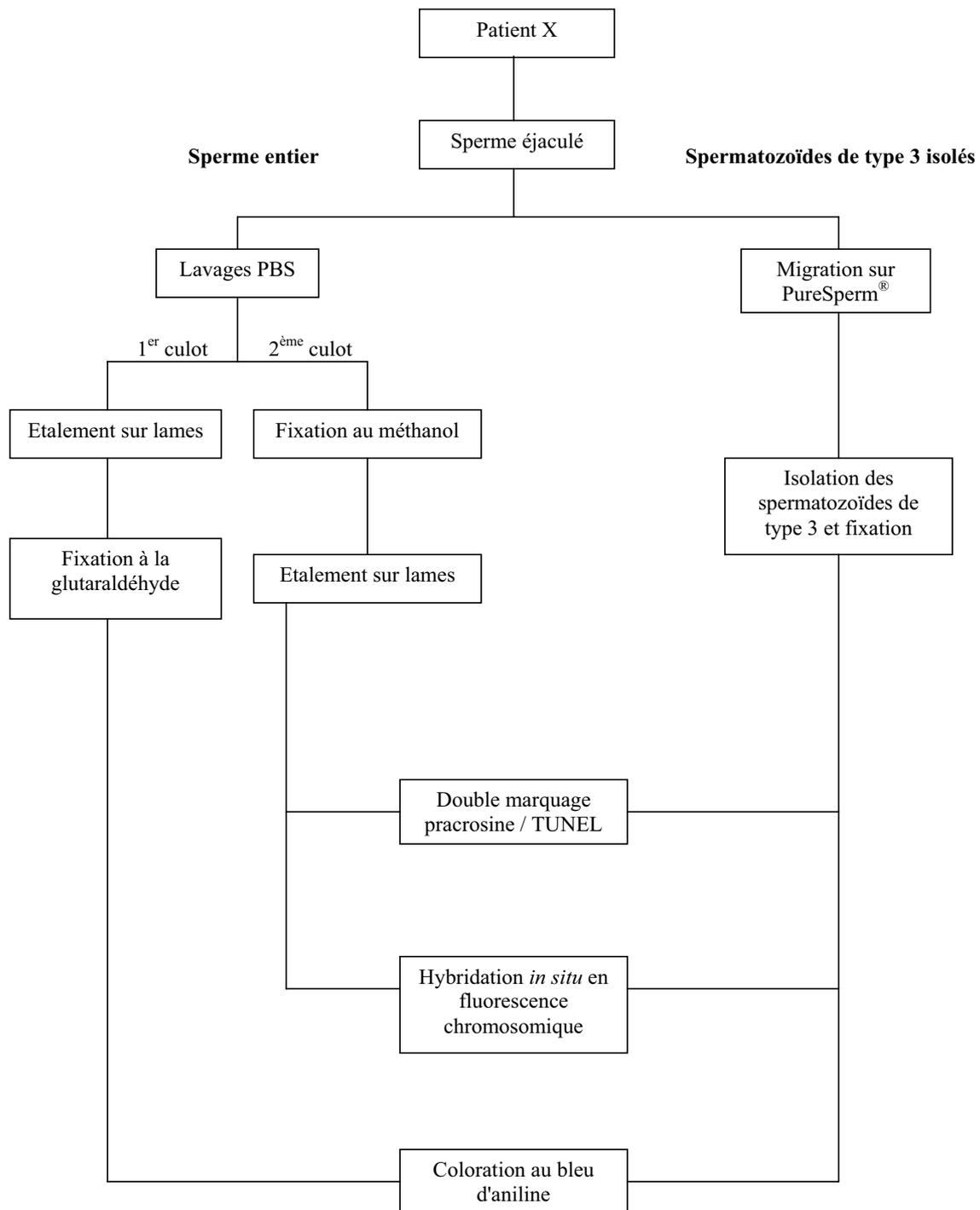


Fig. 1 Schéma récapitulatif des différentes procédures de préparation des échantillons pour l'ensemble des techniques utilisées
 PBS : Phosphate Buffer Saline ; spermatozoïdes de type 3 : spermatozoïdes dont les vacuoles occupent au moins 13 % de la surface de la tête ; TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl dUTP nick end labelling*.

grossissement $\times 1\,000$ et en immersion (Leitz DMRD[®], Leica, Solms, Allemagne). Au total, 500 spermatozoïdes sont comptés sur les lames réalisées à partir du sperme entier. Sera considéré comme positif pour le bleu d'aniline (c'est-

à-dire un spermatozoïde à chromatine mal condensée) tout spermatozoïde pour lequel la coloration bleue occupe plus de 50 % de la surface de la tête. Une analyse comparable est effectuée sur les spermatozoïdes de type 3 isolés.

Hybridation in situ en fluorescence

Une hybridation in situ en fluorescence en triple marquage a été réalisée à l'aide de sondes centromériques reconnaissant les chromosomes X (vert), Y (jaune) et 18 (rouge). La décondensation des noyaux spermatiques s'effectue à l'aide du dithiothréitol (DTT) (Dithiothreitol[®], Sigma Chemical CO, Saint-Louis, MO, États-Unis) utilisé à la concentration finale de 25 mM dans une solution de tris HCl 1M pH : 9,5. Le mélange des sondes diluées au tiers (Abott, Rungis, France) est ensuite déposé entre lame et lamelle et l'étape d'hybridation proprement dite se déroule à 73 °C pendant cinq minutes puis à 37 °C pendant une nuit dans un appareil à hybrider (Hybaid[®], Omnigene, Teddington, Royaume-Uni). La visualisation du signal est effectuée après lavage posthybridation, déshydratation dans des bains d'alcool [70, 90 et 100° ; trois minutes chacun] et contre-coloration au DAPI dilué au 1/1 000^e. Le lavage posthybridation étant effectué dans deux bains successifs, l'un contenant du SSC 0,4X / NP40 0,3 % (Ipegal[®], Sigma, Chemical Co, Saint-Louis, MO) [73 °C, deux minutes] et l'autre contenant du SSC 2X / NP40 0,3 % [température ambiante, une minute]. Un minimum de 1 000 spermatozoïdes est analysé sur les lames sperme entier grâce à un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre triple bande DAPI/FITC/TexasRed (DMRB[®], Leica, Solms, Allemagne). Seuls les spermatozoïdes présentant des spots distincts de taille et d'intensité équivalentes, séparés par, au moins, le diamètre d'un spot, ont été analysés. Les spermatozoïdes présentant un signal diffus ont été exclus du comptage. La même évaluation a été réalisée sur les spermatozoïdes isolés de type 3.

MET et microscopie confocale

Un demi-millilitre de sperme provenant de deux patients qui présentent respectivement 72 et 52 % de spermatozoïdes de type 3 est fixé avec de la glutaraldéhyde 3 %. Les échantillons ainsi préparés ont été envoyés à Mme Denise Escalier au CHU Le Kremlin-Bicêtre (Paris) pour analyse en microscopie électronique selon un protocole déjà décrit [12]. La microscopie confocale a concerné uniquement les spermatozoïdes isolés de type 3 pour trois patients, issus du double marquage proacrosine/TUNEL et contre-colorés au DAPI (plate forme d'imagerie Primacen, Mont-Saint-Aignan, Seine-Maritime, France). L'objectif est de mesurer la différence d'intensité de fluorescence du DAPI (marquage du noyau au niveau de la tête spermatique) constatée entre le noyau et les vacuoles. L'intensité de fluorescence a été mesurée au niveau du noyau (forte intensité de fluorescence) et au niveau de la vacuole (faible intensité de fluorescence). L'observation des spermatozoïdes isolés se fait à l'aide d'un objectif ($\times 63$) à immersion sur un microscope confocal (Leica DMRXA2, Solms, Allemagne) équipé d'une tourelle

contenant les lasers (Leica TCS SP2, Solms, Allemagne) et couplé à une caméra CCD (CoolSNAP ES). L'acquisition et l'analyse des images se font grâce au logiciel Leica Confocal Software (LCS, Leica, Solms, Allemagne). Au total, 15 spermatozoïdes sont analysés pour chaque patient, et chaque spermatozoïde est observé sur différents plans focaux au niveau de toute son épaisseur. Chaque plan focal est d'environ 0,2 μm d'épaisseur, ainsi on obtient entre 10 et 20 coupes selon les spermatozoïdes observés.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée grâce au logiciel MedCalc[®] (MedCalc Software version 9.3.9.0, Bruxelles, Belgique). L'analyse comparative entre sperme entier et spermatozoïdes isolés a fait appel, d'une part, au test de Student (pour la comparaison des taux d'acrosomes anormaux et de la condensation de la chromatine) et, d'autre part, au test de Wilcoxon (pour la comparaison de la fragmentation de l'ADN et des taux d'aneuploïdie). Pour chacun des tests, une valeur de p inférieure à 5 % ($p < 0,05$) a été considérée comme significative.

Résultats

Description de la population étudiée

Aucun des 20 patients inclus dans cette étude ne présente des paramètres spermatiques normaux : dix patients présentent une oligoasthénotérazoospermie, sept présentent une asthénotérazoospermie et trois présentent une térazoospermie. Le pourcentage de spermatozoïdes de type 3 s'étend de 4 à 80 %, et les vacuoles sont principalement localisées au niveau des parties antérieures et médianes de la tête des spermatozoïdes (respectivement $45,7 \pm 2,90$ % et $46,1 \pm 3,00$ %) (Tableau 1).

Évaluation de la morphologie des acrosomes

Un nombre total de 200 spermatozoïdes a été analysé pour chacun des patients sur le sperme entier contre une moyenne de 28 spermatozoïdes isolés par MSOME. La proportion moyenne d'acrosomes anormaux est significativement plus importante dans les spermatozoïdes de type 3 par comparaison aux spermatozoïdes du sperme entier ($77,8 \pm 2,49$ % vs $70,6 \pm 2,62$ % ; $p = 0,014$) (Fig. 2A).

Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique

En moyenne, pour chaque patient, 502 spermatozoïdes provenant du sperme entier (intervalle : 500–530) ont été analysés contre 28 spermatozoïdes sélectionnés par

Tableau 1 Paramètres spermatozoïques conventionnels et fréquence des spermatozoïdes de type 3 observés chez les 20 patients inclus dans l'étude																					
Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Moyenne ± Écart à la moyenne
Âge (années)	39	33	43	27	32	41	51	32	41	33	40	28	43	34	35	32	37	37	37	29	36,2 ± 1,32
Paramètres spermatozoïques conventionnels	3,0	4,9	5,0	2,3	4,3	1,2	2,0	1,9	3,5	2,5	4,3	3,3	4,5	5,5	4,5	4,5	3,5	3,0	2,4	4,9	3,6 ± 0,27
Volume de l'éjaculat (ml)	11	4	10	23	50	45	4	2	2,8	58	20	12	15	16	16	8	5	25	33	19	18,9 ± 3,60
Nu­mé­ra­tion (10 ⁶ /ml)	20	30	10	20	45	25	20	20	5	30	40	15	20	30	35	20	20	30	10	25	23,5 ± 2,24
Mobilité progressive (%)	21	26	33	20	31	48	12	10	15	26	21	17	16	42	23	15	18	42	10	16	23,1 ± 2,46
Morphologie (% typiques)	72	20	12	28	52	24	36	56	24	20	28	76	4	16	56	48	60	16	80	32	38,0 ± 5,10
Spermocytogramme MSOME Spz type 3 (%)																					

MSOME : Motile Sperm Organelle Morphology Examination.

Spz type 3 : spermatozoïde dont les vacuoles occupent au moins 13 % de la surface de la tête.

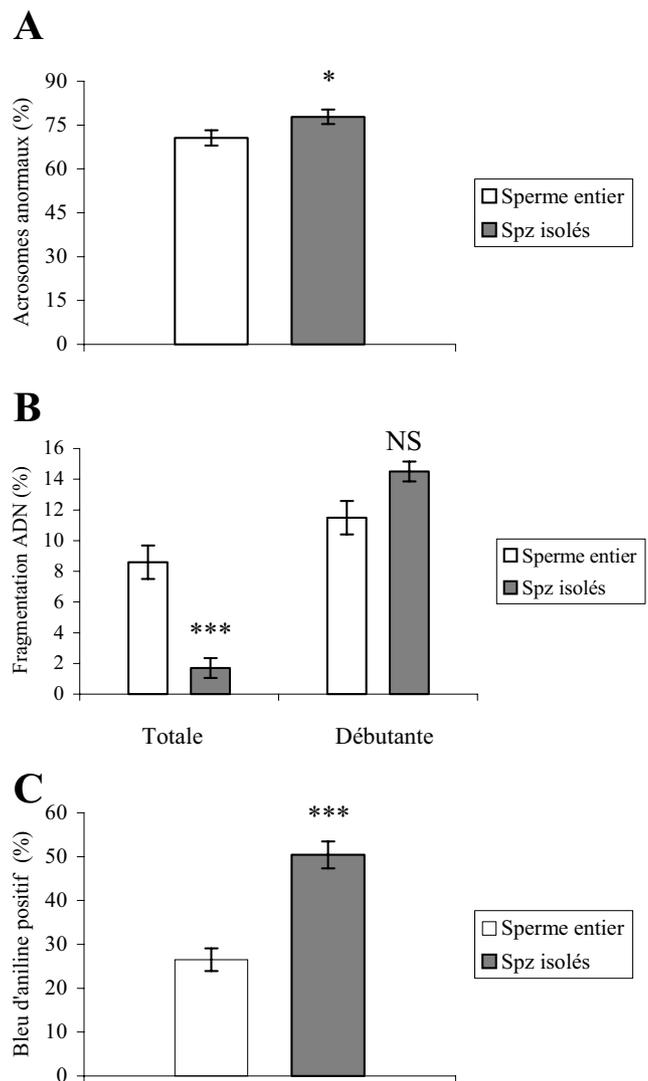


Fig. 2 Évaluation des altérations de l'acrosome et du noyau au niveau des spermatozoïdes issus du sperme entier et des spermatozoïdes isolés de type 3. A : analyse des taux moyens d'acrosomes anormaux par marquage de la proacrosine à l'aide de l'anticorps monoclonal Mab4D4. B : évaluation de la fragmentation moyenne de l'ADN spermatique (totale ou débutante) par la technique TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl dUTP nick end labelling*). C : étude de la condensation de la chromatine spermatique par coloration au bleu d'aniline. NS : non significatif ; Spz : spermatozoïdes ; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

MSOME (intervalle : 19–50). La fragmentation moyenne de l'ADN spermatique est significativement augmentée dans les spermatozoïdes provenant du sperme entier par comparaison aux spermatozoïdes isolés de type 3 ($8,6 \pm 1,09\%$ vs $1,7 \pm 0,65\%$; $p < 0,0001$). En revanche, un début de fragmentation de l'ADN spermatique est observable en proportions équivalentes pour les deux échantillons ($11,5 \pm 1,25\%$ vs $14,5 \pm 3,45\%$; $p = 0,68$) (Fig. 2B).

Étude de la condensation de la chromatine des spermatozoïdes

Pour chaque patient, 499 spermatozoïdes (intervalle : 489–501) ont été observés pour les spermatozoïdes provenant du sperme entier contre 23 (intervalle : 10–30) pour les spermatozoïdes isolés par MSOME. Le taux moyen de spermatozoïdes positifs pour le bleu d'aniline est significativement plus élevé pour les spermatozoïdes isolés que pour ceux provenant du sperme entier ($50,4 \pm 3,10\%$ vs $26,5 \pm 2,58\%$; $p < 0,0001$). La condensation de la chromatine est altérée dans les spermatozoïdes de type 3 par comparaison aux spermatozoïdes du sperme entier (Fig. 2C).

Évaluation du taux d'aneuploïdie spermatique

Seuls les spermatozoïdes des patients 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20 ont été analysés. Pour chaque sujet, une moyenne de 1 060 spermatozoïdes provenant du sperme entier a été évaluée (intervalle : 1011–1133) contre 27 spermatozoïdes isolés (intervalle : 16–63). Le taux d'hybridation est de 98,96 % pour les spermatozoïdes issus du sperme entier (94,09–100 %) et de 96,91 % pour les spermatozoïdes isolés (87,5–100 %). Aucune différence significative n'est constatée entre les spermatozoïdes provenant du sperme entier et les spermatozoïdes isolés de type 3, concernant la fréquence de gamètes hyperhaploïdes XY et de gamètes disomiques XX (respectivement, $p = 0,11$ et $0,07$). En revanche, les fréquences moyennes de spermatozoïdes disomiques YY et 1818 sont significativement augmentées dans les spermatozoïdes de type 3 (respectivement, $p < 0,0001$ et $p = 0,0043$). Il en est de même pour le taux de noyaux spermatiques diploïdes ($p < 0,0001$) et pour la fréquence totale d'aneuploïdie, qui comprend les spermatozoïdes hyperhaploïdes et disomiques ($p < 0,0001$). Les spermatozoïdes de type 3 présentent donc une augmentation significative du taux d'anomalies chromosomiques (aneuploïdie et diploïdie) par comparaison aux spermatozoïdes provenant du sperme entier ($p < 0,0001$) (Tableau 2).

Analyses par microscopies confocale et électronique à transmission

Quarante-six spermatozoïdes isolés de type 3 soumis au double marquage proacrosine/TUNEL et présentant des images de soustraction après contre-coloration au DAPI ont été analysés par microscopie confocale. Pour 89 % d'entre eux, les vacuoles se situent au niveau des deux tiers antérieurs de la tête. L'intensité moyenne de la fluorescence est significativement diminuée au niveau de la vacuole par comparaison au reste du noyau ($211,4 \pm 3,18\%$ vs $83,6 \pm 4,24\%$, $p < 0,0001$), quel que soit le spermatozoïde ($p < 0,0001$), quel que soit le patient ($p < 0,0001$) et quelle que soit la position de la mesure dans l'épaisseur du noyau ($p < 0,0001$). L'intensité maximale moyenne de la est donc

plus importante au niveau du noyau par comparaison à la vacuole ($232,0 \pm 2,62\%$ vs $111,9 \pm 5,29\%$, $p < 0,0001$); inversement, l'intensité minimale moyenne de fluorescence est donc plus faible au niveau de la vacuole par comparaison au noyau ($49,4 \pm 3,55\%$ vs $161,5 \pm 5,21\%$, $p < 0,0001$). Au total, l'intensité moyenne de fluorescence suit la même évolution au niveau du noyau et de la vacuole sur toute l'épaisseur de la tête spermatique, avec, cependant, une intensité de fluorescence de la vacuole qui reste très nettement inférieure par comparaison au reste du noyau (Fig. 3). L'analyse des deux échantillons de sperme entier en MET a révélé la présence de vacuoles à localisation nucléaire exclusive. Des vacuoles de grande taille correspondant aux vacuoles caractéristiques des spermatozoïdes de type 3 ont été retrouvées dans 33 et 18 % des spermatozoïdes respectivement.

Discussion

Le MSOME permet de détecter des anomalies morphologiques, comme les vacuoles, dans des spermatozoïdes humains mobiles à un grossissement de $\times 6\,600$. Cependant, les structures associées à la présence de ces vacuoles restent à déterminer. Après une évaluation de l'acrosome par immunomarquage à l'aide d'un anticorps monoclonal antiproacrosine (Mab4D4), une quantification de la fragmentation de l'ADN spermatique, une analyse de la condensation de la chromatine et une détermination du taux d'aneuploïdie spermatique, nos résultats plaident en faveur d'une implication exclusive du noyau dans la genèse de ces vacuoles.

L'immunomarquage de l'acrosome a fait appel à l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique de la proacrosine des spermatozoïdes matures des primates, le Mab4D4, qui reconnaît spécifiquement un épitope localisé sur la région principale de l'acrosome [13]. La technique TUNEL détecte spécifiquement la fragmentation de l'ADN simple et double brin. Néanmoins, les avis divergent concernant la sensibilité, la précision, la constance et la reproductibilité de cette technique [14]. En ce qui concerne l'évaluation de la condensation de la chromatine par la coloration au bleu d'aniline, il a été admis, sans que pour autant les preuves de la spécificité des interactions moléculaires n'aient été établies, que la coloration bleue soit liée à la persistance des résidus lysine présents dans les histones [15]. Les résultats obtenus via cette coloration sont corrélés avec ceux obtenus à l'aide d'autres techniques d'évaluation de la condensation de la chromatine telles que l'acridine orange ou la chromomycine A3 [14]. Une corrélation entre le degré de compaction de la chromatine et la fertilité masculine a été identifiée [16], une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes à chromatine mal condensée ayant été mise en évidence chez des patients présentant une tératozoospermie par comparaison à des hommes aux paramètres spermatiques normaux [17]. Cependant, aucune corrélation n'est

Tableau 2 Fréquences d'aneuploïdie et de diploïdie pour les chromosomes X, Y et 18 observées dans les spermatozoïdes provenant du sperme entier et des spermatozoïdes isolés de type 3, évaluées par hybridation in situ en fluorescence chromosomique en triple marquage

Caryotype spermatique présumé	Sperme entier (%)	Spermatozoïdes isolés (%)
24,XY	0,38 ± 0,06 ^a	0,98 ± 0,58 ^a
24,YY	0,25 ± 0,04 ^b	2,32 ± 0,86 ^b
24,XX	0,12 ± 0,03 ^c	0,61 ± 0,41 ^c
24,X/Y,+18	0,10 ± 0,02 ^d	1,25 ± 0,58 ^d
Diploïde*	0,47 ± 0,15 ^e	2,63 ± 1,96 ^e
Aneuploïde**	0,84 ± 0,08 ^f	5,16 ± 1,23 ^f
Fréquence cumulée d'anomalies chromosomiques***	1,30 ± 0,18 ^g	7,80 ± 1,98 ^g

Valeurs moyennes ± Écart à la moyenne.

* Somme des fréquences des spermatozoïdes diploïdes 1818XX, 1818 YY et 1818XY.

** Somme des fréquences des spermatozoïdes disomiques XX, YY et 1818 et hyperhaploïdes XY.

*** Somme des fréquences des spermatozoïdes diploïdes et aneuploïdes.

^{a,c} Non significatif ; ^{b,e,f,g} $p < 0,0001$; ^d $p = 0,0043$.

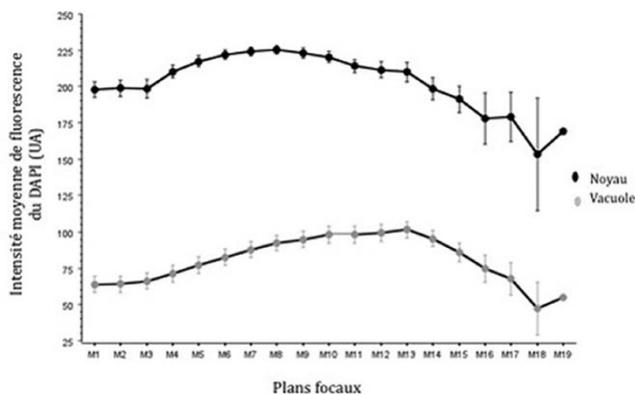


Fig. 3 Évolution de la différence moyenne d'intensité de fluorescence du signal émis par le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) évaluée au niveau du noyau et de la vacuole dans les spermatozoïdes isolés de type 3 M1 à M19 : coupe 1 à 19 sur toute l'épaisseur de la tête du spermatozoïde. UA : unité arbitraire.

aujourd'hui clairement établie entre la condensation de la chromatine et la morphologie des spermatozoïdes [18]. L'hybridation in situ en fluorescence est un outil spécifique et efficace qui permet l'étude de la ségrégation des chromosomes sur un grand nombre de spermatozoïdes. Il existe cependant une grande hétérogénéité des résultats observés entre différentes études, pouvant être due à l'existence d'une variabilité interindividuelle et interchromosomique [19] mais également à un problème de reproductibilité des résultats. Il faut veiller, au sein d'un même laboratoire, à respecter la qualité de la décondensation de la chromatine, le type de sondes utilisées, leur spécificité et le nombre de sondes cohybridées, les conditions d'hybridation et les

critères d'interprétation des résultats [20]. D'autres critiques peuvent être apportées à la méthodologie que nous avons utilisée. En effet, l'étude sur sperme entier s'est faite sur l'ensemble des spermatozoïdes mobiles ou immobiles, alors que celle réalisée sur spermatozoïdes isolés ne s'est intéressée qu'aux spermatozoïdes mobiles. De plus, peu de spermatozoïdes de type 3 isolés ont été observés par lame par comparaison au nombre de spermatozoïdes analysés sur le sperme entier.

L'immunomarquage de l'acrosome a révélé une proportion significativement plus importante d'acrosomes atypiques dans les spermatozoïdes de type 3 isolés. Cela pourrait laisser supposer une localisation acrosomique des vacuoles et serait en accord avec certaines données publiées récemment [21]. En effet, il a été montré que la plupart des spermatozoïdes ne contenant aucune vacuole sont des spermatozoïdes acrosome-réagi, ce qui implique une morphologie normale des acrosomes au sein de ces spermatozoïdes. En revanche, il apparaît clairement que les spermatozoïdes avec une réaction acrosomique incomplète (et donc une morphologie anormale de l'acrosome) présentent des vacuoles au sein de leur tête. De plus, l'induction de la réaction acrosomique par l'ionophore A23587 augmente significativement le pourcentage de spermatozoïdes sans vacuoles, ce qui suggère une origine acrosomique de celles-ci. Cependant, cette étude ne s'est pas intéressée à des spermatozoïdes mobiles sélectionnés dont la taille des vacuoles a été mesurée, mais à une population globale de spermatozoïdes mobiles ou immobiles présentant des vacuoles sans aucune précision sur leur taille. Une hypothèse topographique peut expliquer les malformations importantes des acrosomes constatées dans notre étude sur les spermatozoïdes de type 3. En effet, l'acrosome recouvre la moitié de la tête du gamète mâle, et la

majorité des vacuoles observées se situent en position antérieure ou médiane (45,71 et 46,1 % respectivement), ce qui impliquerait une possible déformation de l'acrosome due à la présence des vacuoles, d'où un taux important d'acrosomes atypiques. Les anomalies des acrosomes ne seraient pas associées à la présence des vacuoles mais seraient la conséquence de celles-ci.

Une initiation de la fragmentation de l'ADN spermatique est observable aussi bien dans le sperme entier que chez les spermatozoïdes isolés par MSOME (résultat révélé par le taux de TUNEL punctiforme), mais le taux moyen de fragmentation totale (révélé par le résultat de TUNEL positif) est plus élevé pour le sperme entier. La présence de vacuoles dans les spermatozoïdes de type 3 n'est donc pas le reflet de cassures de l'ADN spermatique en relation avec une fragmentation totale de l'ADN. Ces résultats sont en contradiction avec ceux rapportés par Franco et al. qui observent une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique dans des spermatozoïdes isolés par MSOME dont les vacuoles occupaient plus de 50 % de la surface de la tête [22]. Cependant, contrairement à notre étude, les résultats de la totalité des spermatozoïdes observés ont été compilés, et étaient considérés comme positifs pour le TUNEL tous les spermatozoïdes qui présentaient un marquage fluorescent, quelle que soit l'intensité. En ce qui concerne le sperme entier, nos résultats sont en accord avec les données publiées antérieurement. Une corrélation existe entre taux de fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité masculine [23,24], le pourcentage de formes atypiques étant corrélé positivement aux résultats obtenus par TUNEL [25]. Une relation entre fragmentation et échecs répétés en assistance médicale à la procréation a également été rapportée [26]. L'altération de la condensation chromatinienne, montrée dans notre étude dans les spermatozoïdes de type 3 isolés par MSOME, serait en faveur d'une localisation nucléaire de ces vacuoles. Tenant compte de la relation qui aurait été établie antérieurement entre aneuploidie spermatique et défaut de condensation de la chromatine [27], nous avons donc évalué le taux d'anomalies chromosomiques observées dans les spermatozoïdes isolés de type 3. Le taux d'aneuploidie et le taux cumulé d'anomalies chromosomiques sont significativement augmentés dans les spermatozoïdes de type 3 par comparaison au sperme entier. On peut donc supposer que l'augmentation du taux d'aneuploidies méiotiques aurait pour conséquence des altérations du processus de spermiogenèse et notamment une mauvaise compaction de la chromatine. Les vacuoles observées dans les spermatozoïdes de type 3 seraient donc la conséquence d'un défaut de condensation de la chromatine. Toutes les étapes de la spermiogenèse étant étroitement imbriquées, la formation de l'acrosome serait, elle aussi, perturbée dans les spermatozoïdes de type 3. L'hypothèse de la localisation nucléaire de ces vacuoles est confirmée par les analyses par microscopies

électronique et confocale (et ce, malgré un petit nombre de patients analysés).

Les altérations nucléaires associées à la présence des vacuoles sont également confirmées par l'existence d'une corrélation négative entre la taille des vacuoles et la stabilité de la chromatine qui semble influencer le développement embryonnaire. Cette possible localisation nucléaire des vacuoles aurait donc des conséquences sur le développement tardif de l'embryon dès la mise en route du génome paternel. Cela est appuyé par le fait qu'une meilleure qualité des embryons a été constatée après une IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) en comparaison à une ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) classique [28]. En effet, la proportion de blastocystes de bonne qualité (blastocèle expansé, masse cellulaire interne et trophoctoderme bien définis) obtenus après culture pendant cinq jours est plus importante après injection de spermatozoïdes sélectionnés par MSOME [29]. La qualité du blastocyste est donc directement corrélée à la qualité du gamète mâle. De plus, dans les cas d'oligoasthénospermie sévère, la sélection à fort grossissement des spermatozoïdes avant injection se révèle être, là aussi, plus efficace en termes de taux de grossesses [30]. En revanche, l'injection de spermatozoïdes présentant des vacuoles au niveau des têtes spermatiques réduit considérablement la qualité et la survie des embryons [29,31] mais également leur capacité à se développer jusqu'au stade blastocyste [32]. Tout cela implique donc des altérations de l'organisation de la chromatine en accord avec une localisation nucléaire des vacuoles.

Ce travail vient de montrer une relation établie entre vacuoles observées dans les spermatozoïdes de type 3, anomalies de la condensation de la chromatine et aneuploidie spermatique. Cette association pourrait expliquer les altérations du développement embryonnaire tardif influençant les taux de grossesses menées à terme après injection de spermatozoïdes à vacuoles. Une origine commune permettant d'expliquer ces différentes anomalies doit être envisagée. Il est important de souligner, ici, que ce travail a été mené sur des vacuoles occupant au moins 13 % de la surface de la tête. Ces résultats ne sont donc pas forcément transposables pour des vacuoles de taille plus petite. Néanmoins, il est nécessaire de poursuivre cette étude sur l'altération de l'organisation de la chromatine présente dans ces spermatozoïdes avec vacuoles et notamment :

- en approfondissant l'étude de l'altération de la condensation de la chromatine par l'étude de l'expression des protamines dans les spermatozoïdes de type 3 ;
- en étudiant l'organisation spatiale des chromosomes au sein de ces mêmes noyaux spermatiques ;
- en évaluant les modifications épigénétiques de la chromatine qui pourraient être associées (méthylation, acétylation).

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

- McLeod J, Gold RZ (1951) The male factor in fertility and infertility IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertil Steril* 2:394–414
- David G, Bisson P, Czyglick F, et al (1975) Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain : proposition pour un système de classification. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 4:37–86
- Mataliotakis I, Panidis D, Vlassis G, et al (1996) The evaluation of morphological abnormalities of human spermatozoa in fertile and infertile men. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 66:65–8
- Slama R, Eustache F, Ducot B, et al (2002) Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 17:503–15
- Bartoov B, Eltes F, Pansky M, et al (1994) Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 9:2069–75
- Mashiach R, Fish B, Eltes F, et al (1992) The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil Steril* 57:1052–7
- Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y, et al (1999) ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia* 31:1–8
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, et al (2002) Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23:1–8
- Saïdi R, Rives N, Gruel E, et al (2008) Nouvelle classification du spermocytogramme à fort grossissement. *Med Reprod Gyn Endo* 10:315–24
- Auger J, Eustache F (2000) Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrology* 10:353–87
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16:231–45
- Mitchell V, Rives N, Albert M, et al (2006) Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod* 21:2065–74
- Gallo JM, Escalier D, Grellier P, et al (1991) Characterization of a monoclonal antibody to human proacrosin and its use in acrosomal status evaluation. *J Histochem Cytochem* 39:273–82
- Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P (2007) Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 5:36
- Terquem A, Dadoune JP (1983) Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: Andre J (ed) *The sperm cell*. Martinus Nijhoff Publishers, London, p 249
- Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, et al (1999) Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod* 5:825–30
- Hofmann N, Hilscher B (1991) Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 6:979–82
- Hammadeh ME, Zeginiadv T, Rosenbaum P, et al (2001) Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 46:99–104
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:585–98
- Rives N, Mousset-Siméon N, Sibert L, et al (2004) Chromosome abnormalities of spermatozoa. *Gynecol Obstet Fertil* 32:771–8
- Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, et al (2010) Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online* 20:132–7
- Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, et al (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 17:42–5
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, et al (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18:1023–8
- Sergerie M, Bleau G, Teulé R, et al (2005) Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 33:89–101
- Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo Y, et al (2009) Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 91:1801–5
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19:611–5
- Morel F, Mercier S, Roux C, et al (1998) Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil Steril* 69:1122–7
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, et al (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 80:1413–9
- Bach M, Neyer A, Stecher A, et al (2007) Morphological integrity of human sperm nuclei and blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection. Abstracts of the 23rd Annual Meeting of the ESHRE, Lyon, France O-273
- Antinori M, Licata E, Dani G, et al (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 16:835–41
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, et al (2006) Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 21:1787–90
- Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, et al (2008) Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 17:617–27