

De la nature des vacuoles spermatiques aux résultats et indications de l'IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*)

Nature of sperm-head vacuoles and results and indications of IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*)

F. Boitrelle · F. Ferfourri · S. Salama · M. Bergere · M. Bailly · B. Wainer · F. Vialard · J. Selva · M. Albert

Reçu le 1^{er} juillet 2011 ; accepté le 16 septembre 2011
© SALF et Springer-Verlag France 2011

Résumé En MSOME (*high-magnification motile sperm organelle morphology examination*), certains spermatozoïdes jugés normaux au grossissement $\times 400$ ou $\times 200$ peuvent présenter des vacuoles céphaliques. Si la large vacuole est décrite comme une empreinte de pouce nucléaire, la nature des vacuoles pourrait dépendre de leur taille, du nombre, de leur localisation et de leur profondeur. Cette revue de la littérature débat de la nature des vacuoles, analyse les résultats obtenus en IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) et en liste les indications. **Pour citer cette revue : *Andrologie 21 (2011)*.**

Mots clés Vacuole spermatique · MSOME · IMSI · Indications et résultats

Abstract MSOME (*high-magnification motile sperm organelle morphology examination*) has shown that some spermatozoa, which appear morphologically normal when viewed at $\times 400$ or $\times 200$, present defects such as cephalic vacuoles when viewed under high magnification. The large vacuole is described as a nuclear thumbprint, but the nature may depend on the size, number, position and depth of the vacuole. This review summarizes the data available on the nature of vacuoles, analyzes the results of IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) and lists its potential indications. **To cite this journal: *Andrologie 21 (2011)*.**

F. Boitrelle (✉) · F. Ferfourri · S. Salama · M. Bergere · M. Bailly · B. Wainer · F. Vialard · J. Selva · M. Albert
Laboratoire de biologie de la reproduction–spermiologie–cytogénétique et service de gynécologie obstétrique CHIPS
Poissy, rue du Champ-Gaillard, F-78303 Poissy, France
e-mail : florenceboitrelle@yahoo.fr

F. Boitrelle · F. Ferfourri · M. Bergere · F. Vialard · J. Selva · M. Albert
EA2493, université de Versailles–Saint-Quentin-en-Yvelines,
F-78000 Saint-Quentin-en-Yvelines, France

Keywords Sperm vacuole · MSOME · IMSI · Indications and results

Histoire du spermatozoïde : du parasite au « top » spermatozoïde

Le spermatozoïde tire son nom du préfixe grec *sperma* désignant la « semence, la graine » et du suffixe « zoïde » signifiant « ce qui est semblable à un animal ». Découvert en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine Van Leeuwenhoek, le spermatozoïde fut d'abord considéré comme un parasite du sperme sans fonction apparente. La semence (le liquide séminal) s'exprimait, elle, dans la femelle servant de simple milieu nutritif. En 1694, Nicolas Hartsoeker humanise le spermatozoïde et considère qu'il recèle un être humain préformé dénommé « homoncule », du latin *homonculus* signifiant « petit homme ». Il faudra attendre la fin du XIX^e siècle pour que le mécanisme de la fusion gamétique soit appréhendé par Oscar Hertwig et Herman Fol [1].

Un siècle plus tard, l'Assistance médicale à la procréation (AMP) s'impose en tant que discipline médicale visant à diagnostiquer et à remédier à l'infertilité des couples en âge de procréer (incapacité à concevoir ou à obtenir une grossesse au-delà d'un délai de 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés [2]). Aujourd'hui en France, l'infertilité touche plus d'un couple sur sept, et un facteur causal masculin est impliqué chez la moitié de ces couples. Le diagnostic de l'infertilité masculine est donc primordial et repose, entre autres, sur l'examen andrologique et le spermogramme. Ce diagnostic est essentiel sous réserve que l'on puisse remédier à ces infertilités masculines, même aux plus sévères. Cela est devenu possible en 1992, quand Palermo et al. [3] ont mis au point l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). Cette technique révolutionnaire, dont l'efficacité n'est plus à prouver, a permis d'étoffer l'éventail des techniques utilisables en AMP, mais elle a aussi relégué, pour un temps,

le spermatozoïde à un rôle quasi accessoire. En effet, l'ICSI « féconde » puisqu'elle permet au spermatozoïde de « court-circuiter » les premières étapes de la fécondation. Un seul spermatozoïde vivant, même immature, autrement dit « n'importe quel » spermatozoïde, devenait en théorie capable de féconder un ovocyte. Pourquoi alors continuer à s'intéresser au spermatozoïde ?

En fait, l'ICSI a permis de remédier à certaines infertilités masculines qui posaient notamment le problème d'une numération trop faible en spermatozoïdes. Mais pour autant, depuis quelques années, les taux de grossesse en ICSI plafonnent (aux alentours de 30 % par transfert selon des données récentes de l'Agence de biomédecine) tout comme les résultats en fécondation in vitro classique. Selon certains auteurs, les résultats obtenus en ICSI peuvent dépendre, entre autres, de la qualité spermatique [5] et de la morphologie du spermatozoïde injecté [6]. Cependant, d'après une méta-analyse récente, en cas de tératospermie isolée, l'influence de la tératospermie sur les résultats de l'ICSI est controversée [4]. Cela rappelle, s'il le fallait, au biologiste l'importance de l'évaluation de la qualité du spermatozoïde à injecter (évaluation de ses fonctions fécondantes et de sa capacité à induire le développement d'un embryon viable capable de s'implanter). Se sont alors développés des tests destinés à explorer les qualités intrinsèques du spermatozoïde avec, entre autres, l'étude de la condensation de la chromatine, l'étude de la fragmentation et de la dénaturation de l'ADN ou encore l'étude du contenu chromosomique spermatique [7]. Ces tests ont un intérêt diagnostique, voire pronostique, des chances de grossesse pour un couple, mais leur réalisation nécessite une fixation des spermatozoïdes et compromet l'injection ultérieure des spermatozoïdes étudiés. D'autres auteurs se sont alors focalisés sur la morphologie du spermatozoïde vivant avec pour objectif de mieux observer ou d'observer différemment ces spermatozoïdes et de définir, sur son aspect morphologique, le spermatozoïde parfait, le « top » spermatozoïde, celui qui sera le plus fonctionnel et de meilleure qualité.

En 1997, une décennie après la catastrophe nucléaire de Tchernobyl, des chercheurs israéliens et ukrainiens s'intéressent aux conséquences de cette catastrophe et notamment à ses conséquences sur la morphologie spermatique [8]. Parmi eux, Benjamin Bartoov se fera bientôt internationalement connaître puisqu'il deviendra dans les années 2000, le « père » du MSOME (*high-magnification motile sperm organelle morphology examination*) et de l'IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) [9]. Le MSOME est une technique d'observation en contraste de Nomarski à un grossissement supérieur à $\times 6\ 300$ qui présente l'énorme avantage de pouvoir être réalisée sur des spermatozoïdes vivants, mobiles (en temps réel), ce qui permettrait de sélectionner extemporanément le « meilleur » spermatozoïde à injecter en IMSI puisque le MSOME

permettrait de détecter de « subtiles anomalies des têtes spermatiques : des vacuoles » non vues aux grossissements classiques de l'ICSI, $\times 200$ ou $\times 400$ [9,10]. Dès lors, le pavé était lancé... Entre les biologistes du premier jour qui ont appris à se méfier des techniques présentées comme révolutionnaires et les reproductionnistes d'aujourd'hui qui espèrent que tout reste à faire, la discussion ne fait que s'engager. Alors, *IMSI or not IMSI* ? Comment choisir le « top » spermatozoïde ? Que sont les vacuoles ? Quelle est (sont) leur(s) signification ? En quoi leur nature peut-elle expliquer les résultats obtenus en IMSI et définir de nouvelles indications IMSI ?

Définition(s) du spermatozoïde normal, du « top » spermatozoïde et des critères de sélection du spermatozoïde en MSOME

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée, constituée d'une tête et d'un système de locomotion dénommé flagelle. En MSOME, au grossissement total supérieur à $\times 6\ 300$, voire $\times 10\ 000$, le spermatozoïde est constitué d'une tête et d'un flagelle dont on peut clairement distinguer la pièce intermédiaire. La forme de la tête et notamment la forme de la base de la tête sont bien visibles. Au niveau de la tête de certains spermatozoïdes, le contraste interférentiel de Nomarski permet d'observer des « vacuoles ». Le support structural et la signification de ces vacuoles demeurent mal connus tout comme la définition d'un spermatozoïde normal en MSOME. Avant même de connaître la nature des vacuoles observées, quelques auteurs ont proposé une définition du « top » spermatozoïde, celui qu'ils considèrent comme le plus apte à féconder un ovocyte et le plus à même d'induire le développement d'un embryon viable capable de s'implanter. Ces mêmes auteurs ont alors publié diverses classifications des spermatozoïdes observés en MSOME [11].

L'équipe de Bartoov souligne l'importance de la morphologie spermatique dans le choix du spermatozoïde à injecter [9,10,12]. Le spermatozoïde dont la tête est de morphologie anormale (petite, grande, amincie, large ou encore porteuse d'une excroissance) est capable de féconder un ovocyte, mais les taux de grossesse clinique chez les femmes dont les ovocytes ont été injectés avec ce type de spermatozoïdes sont quatre fois plus faibles, et les taux de fausses couches spontanées six fois plus importants que chez des femmes dont les embryons proviennent de l'injection intraovocytaire d'un spermatozoïde de morphologie normale [9,10,12]. Ce n'est qu'en 2006 que cette même équipe souligne l'importance de l'évaluation des vacuoles observées au niveau des têtes spermatiques. Ils considèrent cette fois les vacuoles comme le principal critère prédictif du succès de l'IMSI [13]. Vanderzwalmen et al. [14] considèrent, eux aussi, que

la taille et le nombre de vacuoles spermatiques observées influencent les résultats de l'IMSI, avec un taux maximal de blastocystes obtenus à j5 par l'injection intraovocytaire de spermatozoïdes de morphologie normale non porteurs de vacuoles ou porteurs de moins de deux petites vacuoles occupant au total moins de 4 % de la surface de la tête spermatique. Plus récemment, pour Cassuto et al. [15], le choix du meilleur spermatozoïde passe par le calcul d'un score qui évalue la morphologie de la tête et notamment de la base spermatique, l'angulation ou non de la pièce intermédiaire, la présence ou non d'un reste cytoplasmique et la présence ou non de vacuoles. Dans cette classification, il est important de noter que prendre en compte la morphologie de la tête et de la base spermatiques est aussi important que de prendre en compte la présence ou non d'une vacuole (calcul d'un score basé sur ces trois paramètres et non sur la seule présence de vacuoles). Cela pourrait laisser penser que le bénéfice de l'observation des spermatozoïdes en MSOME est peut-être autant dû à l'observation du spermatozoïde à fort grossissement (meilleure visualisation de la morphologie spermatique) qu'à l'observation en contraste de Nomarski (visualisation de vacuoles). Dans notre laboratoire, lors du MSOME, pour un sperme donné nous évaluons le pourcentage de « top » spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes morphométriquement normaux (taille et forme de la tête normales) porteurs d'une ou plusieurs petites (> 4 % de la surface de la tête spermatique) ou larges vacuoles (> 25 %) et le pourcentage de spermatozoïdes morphométriquement anormaux (et éventuellement porteurs de vacuoles). De plus, nous observons les spermatozoïdes en MSOME puis au grossissement $\times 400$ en contraste de Hoffman classique pour voir si les anomalies observées en MSOME seraient vues ou non aux grossissements conventionnels de l'ICSI (données non publiées). Cela nous permet d'évaluer l'intérêt futur de l'IMSI par rapport à l'ICSI classique. Au total, ces études et nos observations concourent à définir le spermatozoïde normal en MSOME comme un spermatozoïde mobile dont le flagelle est de calibre régulier, et la tête de dimension et de forme normales. Sa tête ne porte pas de vacuole ou porte une seule [13], voire deux petites vacuoles, occupant au total moins de 4 % de la surface de la tête [14]. Mais alors, si le spermatozoïde normal ne présente pas ou peu de petites vacuoles, à quoi correspondent les vacuoles observées ? Quelle est leur nature et quelle est leur signification pathologique ?

Nature des vacuoles observées en MSOME

Pour appréhender la nature des vacuoles observées en MSOME, rappelons d'abord que le contraste interférentiel différentiel de Nomarski (DIC) permet de visualiser des différences de contraste d'une structure à l'aide d'un rayon

lumineux polarisé qui se divise en deux rayons dont la réflexion peut être altérée (polarisation non conservée, la structure apparaît contrastée) ou pas (polarisation initiale conservée, la structure apparaît non contrastée). Cela génère des régions d'intensité lumineuse différente discernables à l'œil. Ainsi, le contraste de Nomarski ne met pas seulement en évidence les anomalies des surfaces cellulaires mais peut également donner une idée de l'épaisseur (d'un gradient d'épaisseur) de la structure.

Les vacuoles observées peuvent être petites, larges, antérieures, postérieures, superficielles, profondes, et leur nature et leur origine pourraient différer en fonction du type de vacuole. À ce sujet, la littérature fait état de résultats contradictoires. Depuis 2002, Bartoov et al. définissent les vacuoles comme des vacuoles nucléaires, sans pour autant avoir donné les arguments leur ayant permis d'arriver à cette conclusion. Des études récentes retrouvent des arguments en faveur d'une origine nucléaire de ces vacuoles [16–22]. Certaines études suggèrent que les larges vacuoles reflètent une non-condensation de la chromatine [18–22], une fragmentation de l'ADN [17,23] ou encore des aneuploïdies spermatiques [19–21]. Pour d'autres, les vacuoles seraient d'origine acrosomique [24].

Dans une étude très récente, notre équipe a montré que les larges vacuoles spermatiques (occupant plus de 25 % de la surface de la tête) sont des concavités nucléaires semblables à des empreintes de pouce et en lien avec une non-condensation de la chromatine mise en évidence par la coloration au bleu d'aniline [22]. Ce ne sont pas des « trous » comme cela avait pu être décrit en microscopie électronique [25]. D'après notre étude, la chromatine des spermatozoïdes est plus fréquemment non condensée et immature si le spermatozoïde est porteur d'une large vacuole que s'il n'en porte pas (36,1 vs 7,5 %, $p < 0,00001$). Par contre, il n'existe pas de modification du taux de fragmentation de l'ADN ni du taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes que ceux-ci soient porteurs ou non d'une large vacuole. En microscopie à force atomique, la large vacuole n'est pas le reflet d'une altération (déchirure ou protrusion) de la membrane plasmique spermatique. La large vacuole n'est donc pas de nature membranaire. En microscopie en trois dimensions et déconvolution, notre équipe a aussi montré que la large vacuole n'était pas le reflet d'une altération de la membrane acrosomique. Elle n'est pas non plus le reflet de la perte totale ou partielle de l'acrosome qu'induit la réaction acrosomique. Elle n'est donc pas de nature acrosomique. Elle correspond à un aplatissement nucléaire localisé en lien avec une moindre condensation de la chromatine [22]. Il est admis que des anomalies épigénétiques telles que la décondensation de la chromatine spermatique peuvent intervenir de façon néfaste sur le développement de l'embryon et sur son potentiel implantatoire [26]. Ainsi, c'est la première fois qu'une fonction spermatique est reliée à un aspect morphologique

particulier. On peut maintenant définir le MSOME comme une approche morphofonctionnelle du spermatozoïde vivant. Rappelons quand même que les « phénotypes » de vacuoles sont multiples et que l'origine et la nature des autres types de vacuoles restent à déterminer. Mais alors, l'observation fine de la tête des spermatozoïdes en MSOME permet-elle de choisir un spermatozoïde de meilleure qualité qu'en ICSI ?

Résultats et indications de l'IMSI

Si les données publiées sont en faveur d'une supériorité de l'IMSI sur l'ICSI en termes de grossesses évolutives et dans certaines indications, il faut garder à l'esprit que la technique d'IMSI est coûteuse, chronophage, que les études publiées sont pour la plupart non randomisées et le fruit d'une poignée d'auteurs. En France, un PHRC national regroupant dix centres nous fournira peut-être prochainement des informations supplémentaires sur l'intérêt de l'IMSI versus ICSI. Quoi qu'il en soit, l'analyse de la littérature sur les résultats de l'IMSI permet d'ores et déjà de dégager certaines indications.

Pour Bartoov et al., l'IMSI permettrait d'augmenter les taux de grossesses et de diminuer les taux de fausses couches spontanées chez les couples ayant réalisé préalablement au moins deux tentatives d'ICSI sans succès [27]. Hazout et al. [28] parviennent aux mêmes résultats chez des patientes de même profil et précisent qu'ils ne notent aucune différence en termes de taux de fécondation ni en termes de qualité embryonnaire à j2 entre les embryons issus d'IMSI et les embryons issus d'ICSI. Cela dit, ces études ne sont pas randomisées et manquent donc de puissance statistique. En 2008, Antinori et al. publient la première étude randomisée, dans laquelle les résultats de 227 tentatives d'IMSI sont comparés aux résultats de 219 ICSI. Le taux de grossesse clinique en IMSI est supérieur au taux de grossesse clinique obtenu en ICSI (39,2 % vs 26,5 %), et ce, notamment chez les couples en échec d'ICSI pour lesquels l'IMSI permet de réduire les taux de fausses couches spontanées de 20 % [29]. L'IMSI serait donc indiquée dans les échecs d'implantation en ICSI [9–10,13,27,27–31]. Mais à partir de combien d'échecs de tentatives d'ICSI, l'IMSI pourrait-elle être proposée ? À partir de deux échecs [13], voire à partir d'au moins quatre [27], cinq [9] ou neuf échecs [27], d'après les différentes publications de Bartoov et al.

L'IMSI pourrait aussi revêtir un intérêt particulier chez les patients présentant une térazoospermie sévère [29,32–34]. Cependant, le seuil de térazoospermie pour lequel l'IMSI est indiquée n'est pas déterminé. Pour Bartoov et al. [10], en deçà de 20 % de spermatozoïdes typiques en MSOME, aucune grossesse ne serait obtenue en ICSI. Pour Berkovitz et al., chez 66 couples dont l'homme présente une nucléo-

térazoospermie (< 7 % de spermatozoïdes typiques en MSOME), les taux de grossesses sont plus élevés en IMSI (43 %) par rapport à l'ICSI (3 %). L'IMSI n'apporte pas de bénéfice chez les 26 couples sans nucléotérazoospermie. Les seuils sont donc différents selon les équipes. Selon certaines équipes, dont la nôtre, l'IMSI pourrait aussi être indiquée même si le pourcentage de formes typiques du sperme est inférieur à 1 %, pour parvenir à choisir le spermatozoïde le plus normal possible.

L'IMSI serait aussi indiquée chez les patients présentant des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique [28,35]. Pour ces auteurs et en accord avec des données de notre équipe [36], chez les patients présentant des taux de fragmentation de l'ADN spermatique élevés, la sélection de « top » spermatozoïdes en MSOME et leur injection permettrait d'augmenter les taux de grossesses par rapport à l'ICSI classique. Selon les travaux de notre équipe chez ces patients (à taux de fragmentation de l'ADN spermatique élevés), les spermatozoïdes « top » normaux non porteurs de vacuoles présenteraient en effet moins de fragmentation de l'ADN spermatique que les spermatozoïdes non sélectionnés à fort grossissement (sélectionnés en ICSI classique) ou que les spermatozoïdes porteurs de vacuoles [36].

D'après nos travaux récents, l'IMSI pourrait être indiquée chez les patients présentant des taux élevés de spermatozoïdes à chromatine non condensée en permettant de sélectionner les « top » spermatozoïdes dont la chromatine est mieux condensée que celle des spermatozoïdes morphométriquement normaux mais porteurs de larges vacuoles [22]. Les anomalies épigénétiques telles que la non-condensation de la chromatine spermatique peuvent en effet intervenir de façon néfaste sur le développement de l'embryon et sur son potentiel implantatoire [26].

Pour Kacem et al. [24], l'IMSI pourrait être indiquée pour choisir les spermatozoïdes acrosome réagis. Aucune étude n'a confirmé ces résultats pour le moment.

Pour les spermatozoïdes recueillis chirurgicalement, l'intérêt de l'IMSI semble limité notamment par le nombre de spermatozoïdes testiculaires. Pour Ai et al. [37], la sélection en MSOME et l'injection en IMSI de spermatozoïdes testiculaires permettraient de diminuer les taux de fausses couches par rapport à l'ICSI classique mais notons que les effectifs de cette étude sont faibles. Dans notre expérience, les spermatozoïdes testiculaires étant par nature immatures et morphologiquement anormaux pour la majorité d'entre eux, choisir un spermatozoïde normal non porteur de vacuole relève du défi. Pour les spermatozoïdes épидидymaires, l'indication est à discuter et la littérature est absente sur ce sujet.

À la question « faudrait-il réaliser une IMSI chez tout le monde ? », aucune réponse n'a été apportée. C'est ce que semble suggérer Berkovitz et al. [38]. Dans cette étude, le taux de malformations majeures chez 262 enfants nés de la

technique d'IMSI serait deux fois plus faibles (4,4 %) que celui obtenu chez 259 enfants nés par ICSI classique (8,9 %). Notons quand même qu'un taux aussi élevé de malformations (mineures et majeures) post-ICSI n'a pas été retrouvé dans la littérature. Se posent alors les problèmes de l'exhaustivité des données recueillies chez les parents fertiles ne recourant pas à l'AMP et de la définition des malformations mineures et majeures.

Au total, dans notre centre, les indications d'IMSI sont précédées d'un bilan pré-IMSI (MSOME, étude de la non-condensation de la chromatine, de la fragmentation de l'ADN et des aneuploïdies spermatiques X, Y, 18). La majorité des équipes retiennent les indications citées ci-dessus [39] ; la majorité de ces indications étant posées dans le cadre des échecs d'implantation en ICSI (supérieur ou égal à deux) dans notre centre.

Conclusion

En MSOME, certains spermatozoïdes estimés morphologiquement normaux au grossissement conventionnel de l'ICSI s'avèrent porteurs de vacuoles céphaliques. Les vacuoles peuvent être petites ou larges, uniques ou multiples, antérieures ou postérieures, superficielles ou profondes. Si les larges vacuoles ont été décrites comme des « empreintes de pouce » nucléaires en lien avec une moindre condensation de la chromatine, la nature des autres phénotypes vacuolaires reste à déterminer. D'une meilleure description morphofonctionnelle des spermatozoïdes vivants en MSOME pourrait découler une meilleure compréhension des résultats obtenus en IMSI, et de nouvelles indications pourraient alors être posées.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Gilbert SF (2007) La structure des gamètes. In: De Boeck (ed) *Biologie du développement*. 2^e édition, Paris, chapitre 7
- World Health Organization (2011) *Reproductive health indicators for global monitoring: report of the second interagency meeting*, Geneva. World Health Organization
- Palermo G, Joris H, Devroey P, et al (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17–8
- Loutradi KE, Tarlatzis BC, Goulis DG, et al (2006) The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 23:69–74
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H, et al (2003) Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79:42–8
- Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, et al (2011) The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 95:1141–5
- Boitrelle F, Marchetti P, Mitchell V, et al (2011) Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP. In: Poncelet C, Sifer C (eds) *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Springer, Paris, chapitre 30
- Fischbein A, Zabludovsky N, Eltes F, et al (1997) Ultramorphological sperm characteristics in the risk assessment of health effects after radiation exposure among salvage workers in Chernobyl. *Environ Health Perspect* 105:1445–9
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F (2001) Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 345:1067–8
- 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
- Sermondade N, Sifer C (2011) Motile sperm organelle morphology examination: Toward a consensus? *Gynecol Obstet Fertil* 39:309–14
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, et al (2005) The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 20:185–90
- 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
- Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, et al (2009) A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 92:1616–25
- Peer S, Eltes F, Berkovitz A, et al (2007) Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 °C? *Fertil Steril* 88:1589–94
- Franco JG, Baruffi RL, Mauri AL, et al (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 17:42–5
- Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, et al (2011) Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl* (sous presse)
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, et al (2008) High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 17:610–6
- Travers A, Perdrix A, Legrand F, et al (2009) Les larges vacuoles des têtes spermatiques sont-elles associées à des altérations du noyau ou de l'acrosome du spermatozoïde ? *Andrologie* 20:247–56
- Perdrix A, Travers A, Chelli MH, et al (2011) Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod* 26:47–58
- Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, et al (2011) Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod* 26:1650–8
- Watanabe S, Tanaka A, Fujii S, et al (2011) An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. *Hum Reprod* 26:978–86
- Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, et al (2010) Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organelle morphology

- examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online* 20:132–7
25. Zamboni L, Zemjanis R, Stefanini M (1971) The fine structure of monkey and human spermatozoa. *Anat Rec* 169:129–53
 26. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, et al (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460:473–8
 27. 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* 80:1413–19
 28. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, et al (2006) High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 12:19–25
 29. Antinori M, Licata E, Dani G, et al (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed online* 16:835–41
 30. Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, et al (2009) Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online* 19:45–55
 31. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, et al (2010) Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 21:450–5
 32. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Belloc S, et al (2009) Teratozoospermia at the time of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Gynecol Obstet Fertil.* 37:552–7
 33. Dumont M, Junca AM, Belloc S, et al (2011) L'utilisation du MSOME : expérience de six ans. *Andrologie* 21:83–9
 34. Balaban B, Yakin K, Alatas C, et al (2011) Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* (sous presse)
 35. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, et al (2011) Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 28:253–62
 36. Hammoud I, Albert M, Bergere M, et al (2009) Can IMSI ($\times 6\,000$) be more efficient than classical ICSI selecting spermatozoa without nuclear fragmentation? Abstracts du 25^e Congrès de l'ESHRE, Amsterdam
 37. Ai L, Liu SY, Huang J, et al (2010) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection of testicular sperm: clinical outcome in azoospermia patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 16: 826–9
 38. Berkovitz A, Eltes F, Paul M, et al (2007) The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF-ICSI treatment. *Fertil Steril* 88:20
 39. Vanderzwalmen P, Fallet C (2010) IMSI: indications, results and reflexions. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 39:22–5