

Le test croisé de pénétration de la glaire cervicale *in vitro*

Marie-Catherine LAVAUD

Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Edouard-Herriot Place d'Arsonval, Lyon

RESUME

Le test croisé (TC) ou test de Hühner *in vitro* est un test fonctionnel qui permet d'apprécier l'aptitude des spermatozoïdes à migrer dans la glaire cervicale. C'est un test réalisé *in vitro*. Il exige une participation du couple mais aussi de sperme et glaire témoins. Il constitue une étape importante dans l'investigation de la stérilité conjugale.

Mots clés : *test croisé, test de pénétration, mucus cervical.*

RAPPEL PHYSIOPATHOLOGIQUE

La migration des spermatozoïdes du vagin vers les trompes est conditionnée par le passage à travers le mucus cervical ; ceci nécessite une bonne acceptabilité de la glaire cervicale et une bonne mobilité des spermatozoïdes.

Différents tests peuvent évaluer ces deux facteurs :

- tout d'abord le test post-coïtal (TPC) ou test de HUHNER *in vivo*,
- puis les tests de pénétration croisés (TC).

Le présent article, qui fait suite à l'article sur le TPC [6], se propose de décrire la technique et les indications du TC.

Les TC sont pratiqués depuis une vingtaine d'années [5] et fournissent de bons renseignements sur l'évaluation de la fertilité conjugale.

LA TECHNIQUE

1. Les conditions de réalisation doivent être rigoureuses :

a) Choix du jour du test : comme pour le TPC, le TC est réalisé en période ovulatoire, période de sécrétion maximale de glaire et avant la montée thermique. Une échographie peut être utile dans certains cas.

b) La courbe thermique est indispensable afin de savoir si le TC a été réalisé au moment adéquat.

c) Une abstinence sexuelle de trois jours avant le test est demandée au couple. En effet la présence de spermatozoïdes dans la glaire gênerait la lecture. De plus, les paramètres spermatiques sont optimaux avec cette abstinence.

d) Lieu de réalisation du TC : Le TC ne peut être réalisé que dans un laboratoire spécialisé en Biologie de la Reproduction. Il doit posséder une réserve de glaires témoins ainsi qu'un recrutement quotidien de spermes témoins. L'opérateur doit être compétent pour que l'interprétation des tests soit la plus objective possible. Pour des raisons d'éloignement ou des contraintes horaires, le gynécologue de la patiente pourra effectuer le prélèvement de glaire cervicale sur un ou plusieurs jours et les adressera au laboratoire dans les plus brefs délais en respectant les exigences de la conservation : conserver la glaire au réfrigérateur (+4°) en dessous du bac à glaçons ;

pour le transport, utiliser un thermos dans lequel on aura placé un petit sac plastic contenant les glaçons.

2. La technique des prélèvements

Le TC exige différents matériaux biologiques :

- glaire cervicale de la femme,
- sperme du mari,
- glaire et sperme témoins.

a) Le prélèvement de la glaire endocervicale doit être soigneux.

Après nettoyage du col, avec une compresse, seule la glaire endocervicale est récupérée avec un aspiglaire (Figure 1) ou une spirette ou une sonde urinaire adaptée à une sonde 5ml.

Comme pour le TPC on note les caractéristiques :

- abondance +, ++, +++, ++++ (Figure 1). Une quantité égale à une croix est au moins nécessaire pour réaliser le test croisé, contrairement au TPC qui n'en nécessite que très peu.
- l'aspect : clair, opaque
- filance : 7 à 12 cm en période ovulatoire
- le pH : 7 à 8,2 [1]

La glaire cervicale est testée dans la demi-heure qui suit le prélèvement. Cependant, elle peut-être conservée au réfrigérateur (+4°) pendant environ 7 jours.

Des prélèvements de GC peuvent être effectués pendant 2 à 3 jours en période ovulatoire, conservés au froid puis testés ensemble le même jour quand le mari se rend au laboratoire. Cette pratique que nous appelons "cycle cervical" est intéressante

pour les femmes qui sécrètent de la glaire cervicale pendant 3 à 5 jours, mais qui n'est pénétrable par les spermatozoïdes qu'un seul jour.

b) Le prélèvement du sperme du conjoint s'effectue dans les mêmes conditions que celles du spermogramme :

- prélèvement au laboratoire si possible,
- recueil dans un réceptacle propre,
- par masturbation,
- après une abstinence sexuelle de trois jours.

Le sperme est utilisé dans l'heure qui suit le prélèvement. Une numération et une observation de la mobilité sur 24 heures seront effectuées.

c) Obtention des témoins :

Les glaires témoins ont été prélevées sur des femmes en période ovulatoire. Elles ont été préalablement testées et sont conservées au froid (+4°) et utilisées dans un délai de 7 jours. Devant la difficulté de stockage des glaires cervicales, certains auteurs conseillent l'utilisation de glaire cervicale bovine [2]. Ses propriétés biochimiques et fonctionnelles sont proches de celles de la femme. Cependant nous ne l'utilisons plus car les schémas de pénétration sont différents dans la glaire humaine et bovine : dans cette dernière, les spermatozoïdes n'ont aucune orientation, la migration ne dépasse pas 1,5 cm et leur survie est diminuée.

Les spermés témoins sont choisis parmi les patients qui consultent au laboratoire pour un spermogramme ou une FIV. Seuls sont retenus comme témoins, ceux qui présentent les meilleurs paramètres. (*Voir plus bas la note de la rédaction*).

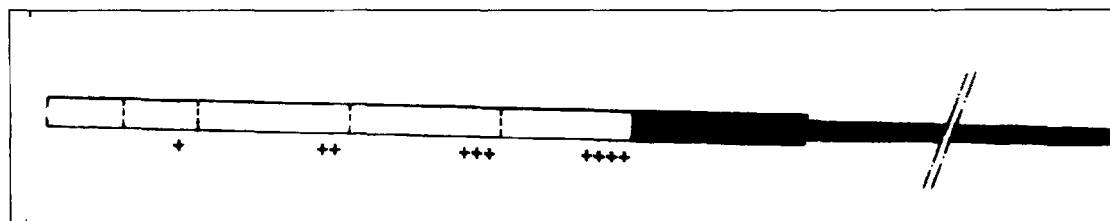


Figure 1 : Mesure quantitative de la glaire cervicale dans l'aspiglaire. Echelle 1/2.

3. La manipulation

a) Le matériel nécessaire est simple. Il comprend :

- des tubes capillaires : longueur 75mm - diamètre interne 1,2 mm - épaisseur verre $\pm 0,02$,
- des tubes à hémolyse,
- une seringue à insuline,
- du papier adhésif : parafilm,
- une pâte à modeler,
- des lames porte-objet,
- une étuve pour les tests sur lame,
- un microscope.

b) **La pratique** : la manipulation de base pour tous les tests fonctionnels *in vitro* est le test de pénétration simple (TP) : c'est l'étude d'un sperme donné dans une glaire

cervicale et inversement. Deux techniques sont possibles :

- *Sur une lame porte-objet (Figure 2) :*

On dépose une goutte de glaire cervicale sur la lame et on la recouvre d'une lamelle. Puis on dépose une goutte de sperme sur deux côtés opposés de la lamelle, juste au contact de son bord. Le sperme va s'étaler par capillarité sous la lamelle. Il s'établit alors une interface nette entre GC et sperme. La lame est placée en atmosphère humide à température ambiante [7].

- *Dans un tube capillaire :*

Cette méthode choisie par notre laboratoire est plus complexe que la précédente et exige une certaine dextérité. Le test fut décrit pour la première fois par Kremer en 1965 [4]. la glaire cervicale est aspirée dans un

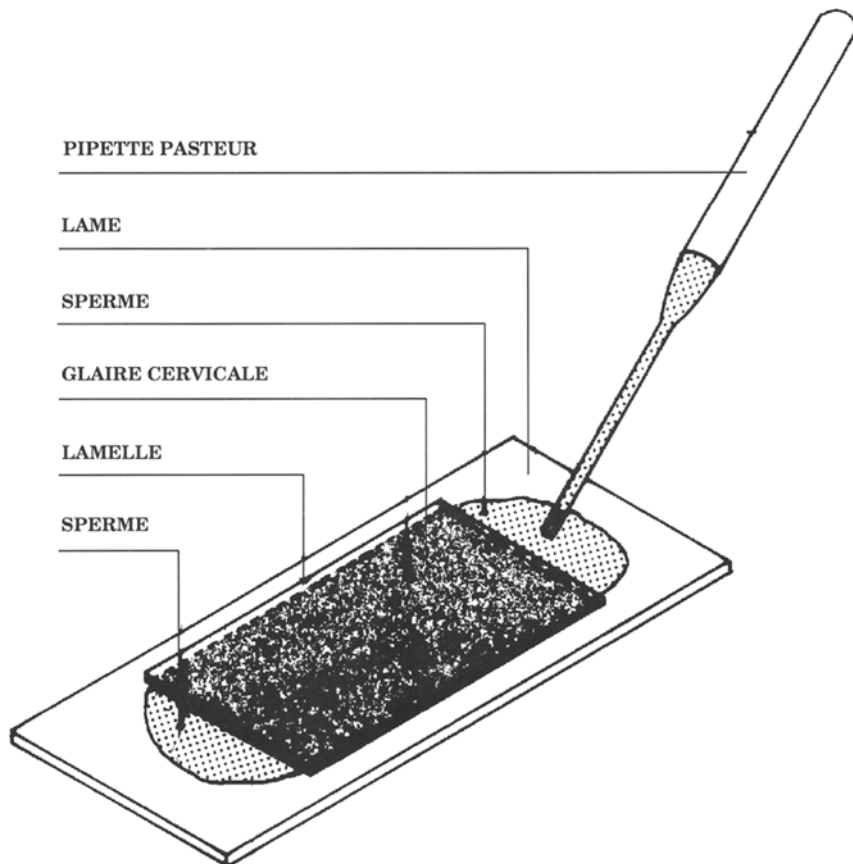


Figure 2 : Test de pénétration sur lame. Echelle 1/1.

tube capillaire placé dans un réservoir soudé à une plaque graduée en verre. Leur taille est telle que le sperme est maintenu par capillarité quand la plaque est placée horizontalement (Figure 3). Cette technique est très intéressante car elle permet une lecture facile et directe sans séparation de la phase du mucus et de celle du sperme. Notre technique dérive de ce test : la GC déposée sur une lame est aspirée dans un tube capillaire adapté à une seringue à insuline. Un papier adhésif permet de les maintenir unis de façon hermétique. Il faut veiller à ne pas introduire des bulles d'air.

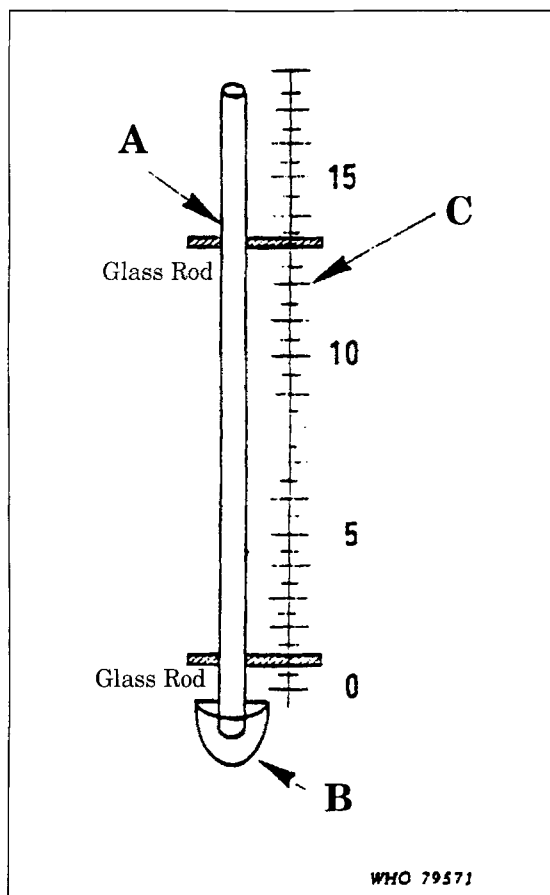


Figure 3 : Le "sperme-pénétration mètre test". A = tube capillaire ; B = réservoir ; C = plaque graduée en cm.

Une fois le microtube rempli, il est facile de couper avec des ciseaux le filament de GC appendu à l'extrémité libre (Figure 4). Délicatement, le papier adhésif est ôté du système. L'extrémité ainsi dégagée est obturée

par de la pâte à modeler. La GC doit faire légèrement saillie à l'autre extrémité. Une goutte de sperme est déposée au fond d'un tube à hémolyse. On glisse le microtube dans ce dernier délicatement afin que la saillie de GC n'adhère pas au tube à hémolyse (Figure 5).

4. Le test croisé étudie un couple hypofertile et exige trois TP simples suivant les techniques précédemment décrites (Figure 6) :

- la glaire de la femme avec le sperme de son mari,
- la glaire de la femme avec un sperme témoin,
- la glaire témoin avec le sperme du mari.

Notons qu'il est souhaitable de tester les glaires et spermes témoins entre eux quand ceux-ci sont en quantité suffisante, afin de s'assurer de leurs bonnes qualités fonctionnelles et de lever certains doutes toujours envisageables.

LES RESULTATS

1. TP sur lame

La lame est étudiée au MO (objectif 40) 30 minutes, 2 heures et 6 heures après la mise en route. On apprécie la progression et survie des spermatozoïdes dans la goutte de GC. Après quelques minutes, le plasma séminal pénètre en doigt de gant ou "phalanx formation" (Figure 7). Les spermatozoïdes colonisent ces phalanges avant de pénétrer dans le mucus. Souvent, un spermatozoïde précède les autres. Par intervalles, quelques spermatozoïdes quittent la phalange pour pénétrer le mucus. Souvent ils quittent la phalange à partir du sommet mais quelquefois à partir des côtés [3].

Différentes situations se présentent :

- les spermatozoïdes pénètrent tout le mucus et on toujours une bonne vitalité 6 heures après le début du test. C'est un bon TP.

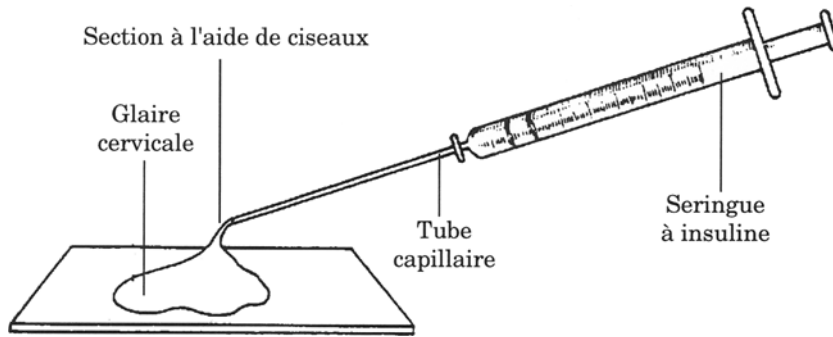


Figure 4 : Aspiration de la glaire cervicale dans un microtube.

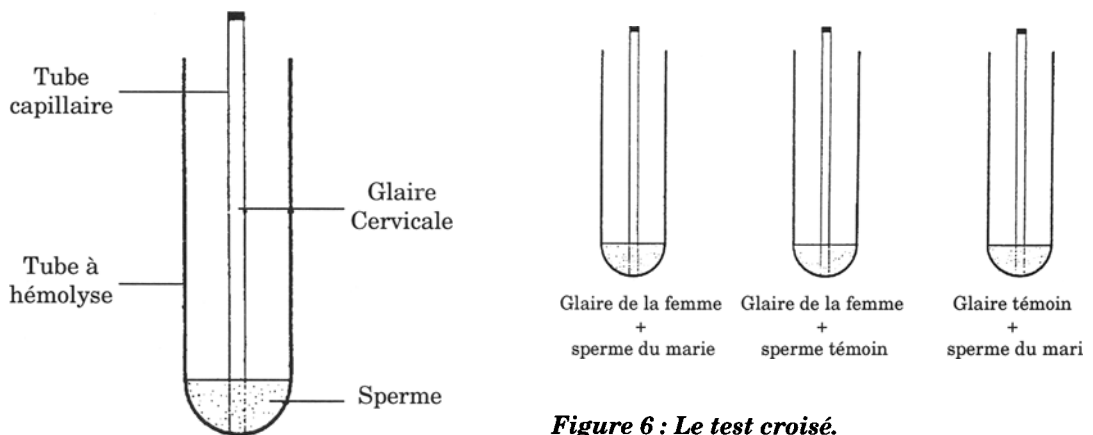


Figure 6 : Le test croisé.

Figure 5 : Test de pénétration simple.

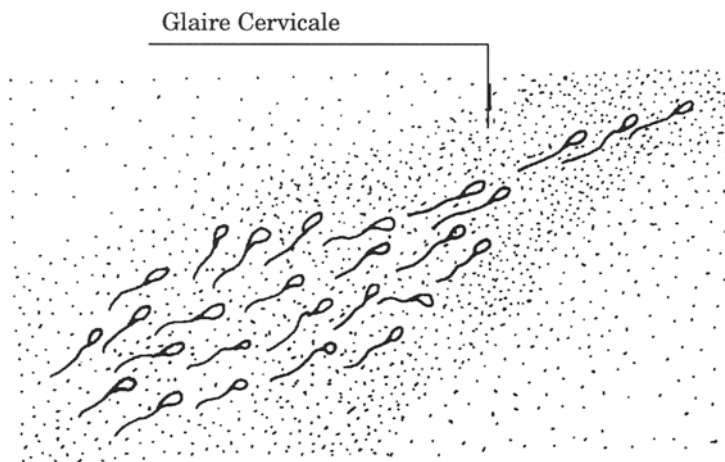


Figure 7 : Représentation schématique d'une "Phalanx formation" dans la glaire cervicale.

- les spermatozoïdes pénètrent très peu ou s'immobilisent rapidement ou présentent des mouvements hyperkinétiques C'est un TP médiocre voire très médiocre.

Aucune migration ne peut être observée. Les spermatozoïdes s'accumulent alors le long de l'interface. C'est un mauvais TP.

La lecture et l'interprétation de ce TP sur lame nous paraissent trop délicates et très subjectives. Aussi nous préférons :

2. TP en tube capillaire (Figure 8)

3 critères sont évalués à 30 minutes, 2 heures et 6 heures après le début du test et sont notés sur un imprimé conçu à cet effet.

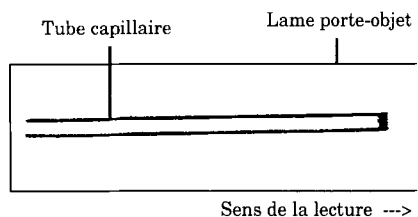


Figure 8 : Lecture des tests de pénétration au m.o. obj. 10.

a) La migration : elle débute par la formation d'une seule phalanx [3]. Rapidement, les spermatozoïdes quittent et suivent une direction parallèle à l'axe du tube. Normalement, les spermatozoïdes migrent en 30 minutes en haut du tube, puis ils redescendent.

En cas de mauvais test, les spermatozoïdes peuvent s'arrêter en front à l'entrée du tube, butant sur un obstacle invisible. La progression peut être très lente : le cheminement semble difficile et se termine par l'épuisement des spermatozoïdes en 1 ou 2 heures.

b) Le nombre des spermatozoïdes migrant

Nous l'évaluons par des qualificatifs tels que : nombreux, peu nombreux, rares, très rares spermatozoïdes.

L'OMS [8] propose une méthode de comptage des spermatozoïdes par mm^2 . Pour nous, cette évaluation précise ne nous semble pas obligatoire sauf pour un travail scientifique. Le critère de numération nous semble moins important que les deux autres. Un seul cas nous paraît intéressant : la polyspermie dans la GC est défavorable, les spermatozoïdes s'épuisant alors en moins de trois heures.

c) La vitalité et la survie des spermatozoïdes :

Leur appréciation est très importante dans l'interprétation. La mobilité doit être excellente 6 heures après le début du test.

Au terme des observations successives, la pénétration est qualifiée d'excellente, médiocre, mauvaise ou nulle. Un bon TP se caractérise par une migration totale en 30 minutes et une bonne survie à 6 heures.

INTERPRETATION DU TEST CROISE

Trois TP seront donc réalisés au cours du TC :

- Un TP entre la femme et son conjoint,
- Un TP entre la femme et un sperme témoin,
- Un TP entre le conjoint et une glaire témoin.

Chacun de ses tests est qualifié de bon, mauvais etc. La confrontation de ces trois tests permet de conclure le test croisé (Tableau 1). Là encore, il sera excellent, bon, médiocre ou mauvais. En cas de test médiocre ou mauvais, on recherchera le facteur en cause :

- la glaire cervicale : si elle ne se laisse pas pénétrer par les spermatozoïdes du conjoint et d'un témoin.
- le sperme du conjoint : si les spermatozoïdes ne pénètrent pas les glaires cervicales de sa femme et d'une femme témoin.

L'interprétation est plus complexe quand glaire et sperme se révèlent incompatibles entre eux et avec les témoins respectifs.

	Glaire de la femme + sperme du mari	Glaire de la femme + sperme témoin	Glaire témoin + sperme du mari	Résultats
Pénétration et survie	Bonne	Bonne	Bonne	Bon test croisé
	Mauvaise	Mauvaise	Mauvaise	Glaire hostile
	Mauvaise	Bonne	Mauvaise	Sperme déficient
	Mauvaise	Mauvaise	Mauvaise	Glaire hostile et sperme déficient

Tableau 1 : Conclusions du test croisé.

PLACE DU TEST CROISE DANS LA STRATEGIE DU CLINICIEN

Le TC est indiqué devant des tests post-coïtaux déficients ou mauvais alors que la glaire cervicale et le sperme semblent normaux. Techniquement, il est facile à réaliser mais ne peut être pratiqué en dehors d'un laboratoire spécialisé. Comme pour le test post-coïtal, l'interprétation doit être prudente : les résultats doivent toujours être confrontés au spermogramme réalisé le même jour du test et à la courbe thermique de la patiente en fin de cycle.

Un test médiocre ou mauvais sera toujours contrôlé sous traitement susceptible d'améliorer la quantité et la qualité de la glaire cervicale.

La persistance de mauvais tests croisés malgré les traitements impose la poursuite d'investigations à la recherche d'une cause immunologique féminine ou/et masculine.

COUT DU TEST CROISE

Le test croisé est coté B 180 et 1Cs. le B 180 comprend B60 pour le spermogramme et B120 pour le TC.

CONCLUSION

Le test croisé est un test essentiel dans le bilan de stérilité conjugale. Son indication

est le test post-coïtal médiocre ou mauvais sans raison apparente. Sa technique doit être rigoureuse pour que l'interprétation soit valable. Il est indispensable avant toute orientation du couple vers la PMA que ce soit les IAC ou les FIV.

Note de la rédaction : Tous les laboratoires qui effectuent le test croisé utilisent du sperme témoin provenant de patients venus pour un spermogramme.

Depuis le 30 juillet 1994, l'application stricte de la loi bioéthique implique que les patients soient informés de l'usage qui peut être fait de leur sperme si celui-ci est considéré comme normal et qu'ils donnent leur consentement par écrit.

Article 511-6 du code pénal : Le fait de recueillir ou de prélever des gamètes sur une personne vivante sans son consentement écrit est puni de cinq ans d'emprisonnement et de 500.000F d'amende.

REFERENCES

1. CHRETIEN F.C : Mucus et Sas cervical - In : La part de l'homme et la part de la femme dans la stérilité du couple. Société Française de Gynécologie, Masson Edit. Paris, 1987 : 137-148.
2. FERRARO-HAYES M., SEGAL S., MOGHISSI K.S., MAGYAR D.M. : Sperm cervical mucus interaction : a comparison of the *in vitro* sperm penetration test using human cervical mucus and bovine estrus cervical mucus with the post-coïtal test. Abstracts, 1983, 37, 315.
3. GADDUM-ROSSE P., BLANDAU R.J., LEE W.I. : Sperm penetration into cervical mucus *in vitro* -I- Comparative Studies. Fertil. Steril., 1980, 33, 636-643.

