

# Intérêt de l'analyse de la morphologie fine et de la qualité nucléaire des spermatozoïdes dans le cadre des techniques d'AMP

Hicham BOUGHALI, Christiane WITTEMER, Stéphane VIVILLE

Service de Biologie de la Reproduction, CHU de Strasbourg,  
CMCO-SIHCUS, 19, rue Louis Pasteur, BP120, 67303 Schiltigheim

## RESUME

Des travaux récents ont démontré l'intérêt d'étudier la morphologie fine des spermatozoïdes mobiles au grossissement x10000. Cette technique d'observation accorde une importance toute particulière à la morphologie du noyau dont les anomalies pourraient refléter des altérations de l'ADN. Notre travail avait précisément pour objectif de combiner cette approche morphologique à un test de fragmentation de l'ADN pour en évaluer l'impact sur les résultats en fécondation *in vitro* (FIV) et en injection intra cytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI). L'étude a porté sur 52 couples inclus en FIV ou en demi FIV – demi ICSI, présentant tous des spermes normaux ou subnormaux en termes de numération, mobilité et morphologie standard. Le jour de la tentative, pour chaque patient étaient réalisés une analyse morphologique fine et un test de fragmentation de l'ADN.

L'analyse des résultats a mis en évidence une valeur seuil de 8% de spermatozoïdes à morphologie fine normale au-dessous de laquelle un échec complet de fécondation en FIV intervient dans 40% des cas. Le développement embryonnaire précoce de J2 à J3 ne paraît pas être influencé par la morphologie du spermatozoïde. Il apparaît également une corrélation négative entre le taux de spermatozoïdes à morphologie nucléaire normale et le taux de fragmentation de l'ADN. Ces résultats laissent entrevoir un intérêt pronostique pour ces techniques dans les échecs de FIV.

**Mots clés :** spermatozoïdes, morphologie fine, fragmentation de l'ADN

## I. INTRODUCTION

De nombreux travaux ont été consacrés à l'importance de la morphologie spermatique comme facteur pronostique du potentiel de fécondation *in vitro*. Pour certains auteurs, sa valeur prédictive est très faible, voire nulle. Pour d'autres, elle serait le meilleur paramètre prédictif indépendant [12]. L'une des principales raisons de ces résultats contradictoires réside dans la variabilité des critères d'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes [15]. En FIV classique, différentes études montrent que des tératozoospermies sévères, portant notamment sur l'acrosome et la région post-acrosomique, sont associées à des retards ou des échecs de fécondation, des anomalies du développement embryonnaire préimplantatoire et de faibles taux de grossesses évolutives.

L'avènement de l'ICSI a constitué une avancée majeure dans le traitement de l'infertilité masculine, permettant l'obtention de fécondations et de grossesses chez des patients en échec de FIV classique ou ayant des paramètres spermatiques, notamment morphologiques, très altérés. Mis à part les cas particuliers d'anomalies spécifiques de la majorité des têtes spermatiques ou de dyskinésies flagellaires généralement associés à des échecs de fécondation, le caractère prédictif de la morphologie spermatique reste controversé s'agissant des résultats de l'ICSI. Ce paramètre semble néanmoins avoir son importance et la micro-injection implique la sélection de spermatozoïdes ayant la morphologie la plus normale possible au vu de l'analyse qu'autorise le faible grossissement utilisé.

Correspondance :

Dr Hicham BOUGHALI - Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, Pavillon AX 3, 67200 Strasbourg. France -  
Email [hboughali@hotmail.com](mailto:hboughali@hotmail.com)

Pour autant, les anomalies éventuelles de la structure fine de spermatozoïdes d'apparence normale restaient inaccessibles à l'analyse en temps réel et étaient du seul ressort de techniques, telles que la microscopie électronique, nécessitant une fixation préalable. A cet égard, les travaux de Bartoov *et al.* [2] ont constitué une avancée remarquable. Cette équipe a mis au point un système optique permettant d'analyser à très fort grossissement (x6600 à x12500) la morphologie fine, notamment nucléaire, des spermatozoïdes et de sélectionner pour l'ICSI les plus normaux possibles d'après des critères ultramorphologiques pré-établis. Ceux-ci tiennent compte en particulier des caractéristiques morphométriques et du contenu du noyau. Ainsi, la visualisation de vacuoles nucléaires peut être associée à des altérations de type fragmentation ou décondensation à l'origine d'une instabilité chromatinienne et donc, entre autres conséquences, une influence possible sur le développement embryonnaire. En effet, la plupart des auteurs s'accordent sur une corrélation négative entre la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et le potentiel implantatoire de l'embryon.

L'objectif du présent travail était de combiner ces deux approches, à savoir l'analyse morphologique fine des spermatozoïdes et l'évaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique et d'étudier leur impact sur les résultats de FIV et d'ICSI.

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Patients

L'étude, réalisée au centre d'AMP du CHU de Strasbourg (Service de Biologie de la reproduction, CMCO-SIHCUS), concerne des couples présentant un sperme normal ou subnormal (critères classiques de numération, mobilité et morphologie selon Kruger) inclus en FIV ou en demi FIV-demi ICSI après échecs répétés d'inséminations intra-utérines.

Les patientes ont été traitées selon un schéma classique de désensibilisation par analogue du GnRH (Décapeptyl® ou Suprefact®) en protocole long puis stimulation par FSH recombinante (GonalF® ou Puregon®). La préparation du sperme, recueilli au laboratoire, a été effectuée par centrifugation sur gradient de densité à deux couches (40% - 80%) de SpermFilter®. Le recueil ovocytaire a été effectué par ponction transvaginale écho-guidée et les techniques habituelles, décrites dans la littérature, ont été mises en œuvre pour la fécondation *in vitro* et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde. Dans le cas des demi FIV-demi ICSI, les complexes cumulo-ovocytaires sont étalés en boîtes de pétri et examinés au microscope inversé pour déterminer leur stade de maturité nucléaire. Seuls les ovocytes au stade de métaphase II, attesté par la présence du premier globule polaire, sont retenus et répartis aléatoirement pour une moitié en FIV et pour l'autre moitié en ICSI.

La fécondation est contrôlée 14 à 18 heures après l'insémination ou l'injection par l'observation détaillée des zygotes obtenus. Les éléments morphologiques pris en compte sont le nombre et la distribution des nucléoles dans les pronu-

clei, la position, l'éloignement, les dimensions comparées des deux pronuclei, et les caractéristiques cytoplasmiques (concentration, vacuoles). Le clivage précoce est contrôlé entre la 25ème et la 27ème heure. La vitesse de clivage et la morphologie embryonnaire (nombre et taille relative des blastomères, taux de fragmentation) sont évaluées à J2 et J3 après le recueil ovocytaire.

Les transferts embryonnaires sont réalisés à J3 et impliquent un ou deux embryons. Le choix des embryons à transférer tient compte des paramètres morphologiques observés à J3, de la cinétique de clivage J2-J3 et de la morphologie des zygotes. Les embryons surnuméraires sont congelés selon un protocole classique de congélation lente. L'obtention d'une grossesse est mise en évidence par un dosage sérique de  $\beta$ hCG quinze jours après le transfert.

### 2. Analyse morphologique des spermatozoïdes

Pour chaque patient, la morphologie des spermatozoïdes capacités est évaluée :

- par un spermocytogramme classique : frottis coloré au Diff-Quik®, avec lecture selon les critères stricts de Kruger;
- par une analyse fine (MSOME ou motile sperm organelle morphology examination), au très fort grossissement, selon les critères de Bartoov *et al.* [3].

Le système optique utilisé est un microscope inversé à contraste interférentiel de Nomarski (Leica DMIRE 2 HC) équipé d'un zoom variable (VarioC-mount) couplé à une caméra vidéo et un moniteur couleurs de haute résolution. L'utilisation de l'objectif x100 à immersion permet un grossissement final à l'oculaire de x1500 et, sur moniteur, de x2200 à x12500. L'observation est effectuée sur une goutte de 3  $\mu$ l de sperme capacité sous huile, dans une boîte Willco® à fond en verre d'épaisseur 0,17  $\mu$ m (GWSt-1000; BioSoft International). La goutte de sperme, dont la concentration est ramenée à une valeur maximale de 1 million de spermatozoïdes/ml, est diluée dans 3  $\mu$ l de PVP préalablement refroidi à 4°C. Le pourcentage de formes normales selon Bartoov est établi sur un nombre total de 100 à 150 spermatozoïdes mobiles.

### 3. Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

Le taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté est déterminé à l'aide du kit Halosperm® (laboratoires INDAS) faisant appel à la technique SCD (sperm chromatin dispersion test) [9]. La concentration du sperme étudié doit être ramenée, le cas échéant après dilution dans du milieu de culture (Ferticult IVF), à une concentration comprise entre 5 et 10 millions de spermatozoïdes/ml. Un échantillon de 60  $\mu$ l est alors homogénéisé, en tube eppendorf, avec 100  $\mu$ l d'agarose 1% à bas point de fusion préalablement liquéfié au bain-marie à 90°C et équilibré pendant 5 minutes à l'étuve à 37°C.

Une goutte de 50  $\mu$ l du mélange sperme-agarose est déposée sur une lame de verre pré-traitée (agarose 0,65% séché à 80°C) refroidie à 4°C, puis recouverte d'une lamel-

le 24 x 60 mm. La lame ainsi préparée est remise à 4°C pendant 5 minutes, temps nécessaire à la gélification de l'échantillon. La lamelle est ensuite retirée puis la lame, maintenue horizontale, est incubée successivement, à température ambiante, pendant 7 minutes dans une solution acide dénaturante (HCl 0,08N) et pendant 25 minutes dans une solution de déprotéinisation (Tris 0,4M, DTT 0,8M, SDS 1%, EDTA 50mM). Après rinçage à l'eau distillée, la préparation est fixée dans trois bains successifs (2 min chacun) d'éthanol à 70%, 90% et 100% avant coloration (8 min) dans une solution de Wright diluée de moitié en tampon phosphate. L'observation au microscope à l'objectif x100 à immersion permet de distinguer :

les têtes spermatiques entourées d'un halo d'épaisseur supérieure au tiers du petit diamètre du noyau, qui correspondent aux spermatozoïdes sans ADN fragmenté;

les têtes spermatiques ne présentant pas de halo périphérique ou entourées d'un halo d'épaisseur inférieure ou égale au tiers du petit diamètre du noyau, qui correspondent aux spermatozoïdes avec ADN fragmenté.

Le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté est établi après observation de 500 cellules.

#### 4. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart-types et en pourcentages. L'analyse de variance a été utilisée pour comparer les moyennes et le test du  $\chi^2$  pour les pourcentages. Le niveau de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ .

### III. RÉSULTATS

#### 1. Résultats généraux

Cette étude a concerné cinquante-deux couples, d'âge moyen  $34,3 \pm 3,9$  ans pour les femmes et  $36,0 \pm 4,7$  ans pour les hommes, inclus dans 13 cycles de FIV et 39 cycles de demi FIV - demi ICSI. Les 46 transferts embryonnaires (TE) effectués (88,5% de TE par ponction) ont permis d'initier 14 grossesses, soit un taux global de 30,4% de grossesse par TE et 26,9% de grossesse par ponction. Le nombre total d'ovocytes en métaphase II recueillis était de 408,

soit une valeur moyenne de 7,9 par ponction. Les taux de fécondation et d'évolution embryonnaire de J2 à J3 étaient respectivement de 59,3% et 69,0% (Tableau 1).

#### 2. Impact de la morphologie fine des spermatozoïdes sur la fécondation et le développement embryonnaire

L'analyse de la morphologie fine a été réalisée pour un nombre total de 6190 spermatozoïdes issus de 52 éjaculats. 86,6% des spermatozoïdes présentaient au moins deux vacuoles nucléaires, isolées (44,2%) ou associées à d'autres anomalies (42,4%) qui sont principalement : des restes cytoplasmiques, des bases anormales et des angulations. Le pourcentage de spermatozoïdes à morphologie nucléaire normale, c'est-à-dire ayant moins de deux vacuoles nucléaires associées ou non à d'autres anomalies n'affectant pas le noyau, était de 13,4%. Peu de spermatozoïdes (8,0%) ne présentaient aucune anomalie morphologique. L'analyse des résultats a mis en évidence une valeur seuil de 8% de spermatozoïdes à morphologie fine normale au-dessous de laquelle il existe une différence significative entre les taux de fécondation en FIV et en ICSI, un échec complet de fécondation en FIV intervenant alors dans 40% des cas (Tableau 2).

Le développement embryonnaire précoce de J2 à J3 ne paraît pas cependant être influencé par la morphologie fine du spermatozoïde. Il en est de même pour les taux de grossesse, respectivement de 34,6% et 25% dans les groupes spermatozoïdes à morphologie fine normale  $< 8\%$  et  $\geq 8\%$  (différence non significative).

#### 3. Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique

Les valeurs de fragmentation de l'ADN spermatique obtenues pour les cinquante-deux échantillons de sperme recueillis sont comprises entre 1,1% et 33,6% avec une valeur moyenne de  $15,3 \pm 7,5\%$ .

L'analyse des résultats a montré une corrélation positive, à la limite de la significativité ( $p < 0,07$ ), entre le taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté et le pourcentage de spermatozoïdes de morphologie fine globale anormale (Tableau 3). En revanche, les taux de spermatozoïdes à morphologie

Tableau 1 : Résultats généraux.

technique	ovocytes métaphase II	embryons J2	taux de fécondation	embryons J3	taux d'évolution J2-J3	transferts embryonnaires	grossesses
FIV (n=13)	67	42	62,7	29	69,0	9	1
demi FIV- demi ICSI (n=39)	182	79	43,4	51	64,5	6 TE FIV 22 TE ICSI 9 TE FIV+ICSI	3 8 2
Total	408	242	59,3	167	69,0	46	14

**Tableau 2 : Impact de la morphologie fine des spermatozoïdes sur la fécondation et le développement embryonnaire.**

% spz à morphologie fine normale	nb de cas	% fécondation en FIV	% fécondation en ICSI	p	% évolution en FIV	% évolution en ICSI	p
< 8 %	30	36,7 <sup>a</sup>	75,9 <sup>b</sup>	<0,001	72,2 <sup>c</sup>	69,9 <sup>d</sup>	ns
≥ 8 %	22	65,7 <sup>a</sup>	76,3 <sup>b</sup>	ns	61,2 <sup>c</sup>	74,1 <sup>d</sup>	ns

a :  $p < 0,05$  ; b, c, d : non significatif (ns).

**Tableau 3 : Morphologie fine et fragmentation de l'ADN spermatiques.**

% spz à ADN fragmenté	nombre de spz analysés	% spz à morphologie fine globale normale	% spz à morphologie fine nucléaire normale
< 20 %	3068	7,0 <sup>a</sup>	49,3 <sup>b</sup>
≥ 20 %	1606	5,5 <sup>a</sup>	41,7 <sup>b</sup>

a : ns ; b :  $p < 0,01$ .

fine nucléaire normale, c'est-à-dire comportant moins de deux vacuoles nucléaires associées ou non à d'autres anomalies morphologiques, sont significativement différents selon que le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté est inférieur ou supérieur à 20% (respectivement 49,3% et 41,7%).

Aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le taux de fragmentation de l'ADN et les taux de fécondation et de développement embryonnaire précoce, que ce soit en FIV ou en ICSI.

#### IV. DISCUSSION

L'impact de la morphologie spermatique sur les résultats en AMP est une problématique loin d'être résolue. L'analyse bibliographique fait état de données contradictoires quant à l'influence de la forme des spermatozoïdes sur les taux de fécondation, de développement embryonnaire précoce, d'implantation et de grossesse clinique [7, 8, 16]. Les résultats varient également selon la technique considérée (FIVc ou ICSI) et suivant les définitions de la normalité morphologique des spermatozoïdes.

A la suite des travaux de Bartoov *et al.* [2], nous avons tenté d'évaluer le rôle de la morphologie fine des spermatozoïdes en FIVc et en ICSI. Les critères retenus pour l'observation des spermatozoïdes sont issus de l'analyse ultramorpholo-

gique quantitative qui combine les résultats de la microscopie électronique à transmission pour la structure interne du caryoplasme et ceux de la microscopie à balayage pour la structure externe de la tête spermatique. Ainsi, l'analyse du noyau tient compte du contenu chromatinien et de paramètres morphométriques. Il doit présenter un contour régulier, de forme ovale et symétrique, avec un grand axe et un petit axe mesurant respectivement  $4,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$  et  $3,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . La chromatine doit être homogène, sans invaginations ni extrusions, comportant au plus une vacuole qui n'excède pas 4% de la surface du noyau.

Pour les patients étudiés, qui ont tous un sperme normal ou subnormal selon les critères morphologiques de Kruger, les pourcentages moyens de spermatozoïdes à morphologie fine globale et nucléaire normales selon Bartoov étaient respectivement de  $8,0\% \pm 5,3\%$  et  $13,4\% \pm 3,9\%$ .

Bartoov *et al.* [3] ont réalisé une étude prospective sur 100 couples pris en charge en ICSI dans laquelle ils ont analysé, pour chaque sperme, 100 spermatozoïdes mobiles non utilisés pour l'ICSI et d'apparence normale au faible grossissement habituellement employé pour la micro-injection. Ils ont mis en évidence que les pourcentages moyens de spermatozoïdes globalement normaux et de noyaux spermatiques normaux étaient respectivement de 3,3% et 26,8%.

Ces données vont dans le sens des résultats que nous avons obtenus, à savoir l'absence de toute corrélation entre la morphologie fine et l'analyse morphologique selon les critères normalisés de l'OMS. Il convient de noter que, dans notre étude, les spermatozoïdes analysés par MSOME ne sont pas présélectionnés au faible grossissement. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés uniquement aux spermatozoïdes mobiles, c'est-à-dire une fraction particulière de la population analysée par un spermocytogramme. Ces considérations rendent compte, du moins en partie, des différences observées.

La corrélation de ces données aux résultats des tentatives de FIVc (FIV ou demi FIV-demi ICSI) nous a permis de mettre en évidence des taux de fécondation significativement différents selon que le pourcentage de spermatozoïdes à

morphologie fine globale normale était inférieur ou supérieur à 8% (respectivement 36,7% et 65,7%). De plus, au-dessous de cette valeur seuil, un échec complet de fécondation en FIV est intervenu dans 40% des cas. L'interrogation de la base de données Medline ne fait ressortir à l'heure actuelle aucune publication à ce sujet. Notre étude permet ainsi une approche nouvelle de la notion de pourcentage seuil de spermatozoïdes de forme normale pour la fécondation en FIV, déjà mise en évidence par l'analyse morphologique classique selon les critères stricts de Kruger et évaluée entre 4 et 14% selon les auteurs. Les taux d'évolution embryonnaire de J2 à J3 et de grossesse ne paraissent pas en revanche influencés par la morphologie fine des spermatozoïdes. Ce résultat va dans le sens de l'étude *princeps* réalisée par Terriou *et al.* [19] et qui montrait que les scores embryonnaires, les taux d'implantation, de grossesse par transfert et de naissances normales n'étaient pas corrélés à la tératospermie en FIV classique.

Lorsque le pourcentage de spermatozoïdes à morphologie fine normale est inférieur à 8%, les taux de fécondation en ICSI sont significativement supérieurs à ceux obtenus en FIV, ce qui n'est pas le cas lorsque ce pourcentage est supérieur ou égal à 8%. Ce résultat est vraisemblablement lié à la technique de micro-injection qui contourne des étapes du déroulement naturel de la fécondation, palliant ainsi le déficit de fécondance observé en FIV lorsque le pourcentage de spermatozoïdes normaux par analyse MSOME est inférieur à 8%. Dans les seules ICSI, cette valeur seuil n'influence pas les taux de fécondation et de développement embryonnaire précoce.

Nos résultats, obtenus chez des couples pris en charge en demi FIV- demi ICSI, contrastent avec ceux de Bartoov *et al.* [3] pour 100 couples avec une indication d'ICSI d'emblée. En effet, il en ressort des valeurs prédictives élevées (i) du pourcentage de spermatozoïdes à morphologie fine normale pour les taux de fécondation en ICSI (aire sous la courbe AUC-ROC 88%; sensibilité 81%; spécificité 78%) et (ii) du pourcentage de spermatozoïdes à morphologie fine nucléaire normale pour les taux de fécondation et de grossesse en ICSI (respectivement AUC-ROC 72%; sensibilité 66%; spécificité 64% et AUC-ROC 74%; sensibilité 68%; spécificité 67%).

A l'exception des cas particuliers de tératozoospermies spécifiques ou extrêmes, la plupart des auteurs s'accordent cependant sur l'absence de corrélation entre les anomalies spermatiques révélées par l'analyse morphologique classique et les résultats des tentatives d'ICSI. A cet égard, les principaux arguments avancés sont (i) les spécificités techniques liées à l'ICSI permettant de contourner certains obstacles à la fécondation naturelle; (ii) l'exclusion, au moment de la micro-injection, des spermatozoïdes présentant des anomalies majeures; (iii) l'absence de corrélation entre les résultats globaux du spermocytogramme et les caractéristiques morphologiques des quelques spermatozoïdes micro-injectés; (iv) la présence possible d'anomalies morphologiques indétectables aussi bien au faible grossissement utilisé pour l'ICSI qu'au grossissement x1000 lors de la lecture du spermocytogramme.

Cette dernière éventualité a été à l'origine de la mise au point par Bartoov *et al.* [2] d'une variante de l'ICSI, appelée IMSI (Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection), mettant à profit l'analyse MSOME de façon à micro-injecter des spermatozoïdes dépourvus, dans la mesure du possible, d'anomalies morphologiques fines. Dans une étude préliminaire portant sur 24 couples ayant eu au moins 5 échecs consécutifs en ICSI, les taux de grossesse et d'implantation par IMSI étaient respectivement de 58% et 47%, avec naissance de 17 enfants tous normaux. Par ailleurs, il n'y a pas eu de grossesse chez les trois couples pour lesquels aucun spermatozoïde à morphologie nucléaire normale n'a pu être trouvé [2]. Cette même équipe a réalisé en 2003 une étude prospective sur 50 couples inclus dans un cycle d'IMSI et ayant eu au moins deux échecs consécutifs d'ICSI, appariés à 50 couples témoins pris en charge pour une ICSI classique, le critère d'appariement étant le nombre d'échecs en ICSI [4]. Le taux de grossesse clinique et le taux d'implantation ont respectivement doublé et triplé dans le groupe IMSI : 66% par ponction *versus* 30% et 28% *versus* 9,5%. L'impact de la morphologie spermatique fine a été en outre précisé par la comparaison des résultats de 38 cycles d'IMSI où tous les spermatozoïdes micro-injectés avaient un noyau strictement normal (groupe positif) selon les critères de Bartoov, appariés à 38 cycles d'IMSI où aucun spermatozoïde à morphologie nucléaire normale n'a pu être trouvé, les spermatozoïdes utilisés étant alors ceux dont le noyau présente le moins d'anomalies (groupe négatif). Les taux de grossesse clinique, d'implantation et d'embryons "top" étaient significativement supérieurs dans le groupe positif : respectivement 53% *versus* 18%; 25% *versus* 6% et 35% *versus* 19% [6].

Dans ces différentes études comparatives, il est à noter que, contrairement aux autres paramètres, les taux de fécondation en IMSI n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus en ICSI classique. Il s'agit là d'un point important qui suggère que la morphologie fine nucléaire, principal critère de sélection en IMSI, n'interviendrait pas aux stades de la fécondation ou du clivage précoce mais serait plutôt à l'origine d'un "effet paternel tardif" lors du développement embryonnaire préimplantatoire. Cette analyse morphologique tient compte essentiellement des vacuoles nucléaires, dont la taille paraît significativement corrélée à la stabilité chromatinienne évaluée par SCSA, d'après les travaux non encore publiés de Berkovitz *et al.*

Dans le même ordre d'idées, nous avons analysé les liens éventuels de la fragmentation de l'ADN spermatique mesurée par la technique SCD avec la morphologie fine nucléaire des spermatozoïdes et son influence sur la fécondation et le développement embryonnaire.

Les pourcentages de spermatozoïdes comportant moins de deux vacuoles nucléaires étaient significativement différents selon que le taux de fragmentation de l'ADN était inférieur ou supérieur à 20%. Certaines publications font également état d'une corrélation négative entre le pourcentage de spermatozoïdes normaux selon les critères morphologiques stricts de Kruger et la condensation ou fragmenta-

tion de l'ADN spermatique déterminées par coloration au bleu d'aniline, marquage à la chromomycine A3 ou par les techniques TUNEL et Nick translation *in situ* [11, 21].

L'impact de la fragmentation de l'ADN spermatique sur la fécondation et le développement embryonnaire est un sujet qui suscite un intérêt croissant. S'agissant de notre travail, aucune relation significative n'a pu être établie dans ce sens. Des études antérieures ont cependant mis en évidence une corrélation négative avec les taux de fécondation, dépendant parfois de la technique d'AMP utilisée (FIVc ou ICSI) [1, 5, 13, 14, 17, 18]. D'autres résultats mettent en évidence une valeur seuil comprise entre 10% et 30% de taux de fragmentation au-delà de laquelle le pourcentage d'embryons atteignant le stade blastocyste est significativement diminué; le développement embryonnaire précoce n'étant, en revanche, pas affecté [5, 22]. Dans ce dernier cas, la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes serait alors à considérer comme étant plutôt le reflet d'un "effet paternel tardif" [20]. Cette hypothèse est la plus souvent retenue dans la mesure où les stades précoces du développement embryonnaire sont principalement sous la dépendance des transcrits ovocytaires; le génome propre à l'embryon, impliquant l'ADN spermatique, ne s'active qu'à partir du stade 6-8 cellules.

A ce titre, notre travail pourrait être complétée par l'étude de l'impact de la fragmentation de l'ADN évaluée par SCD et de la morphologie fine nucléaire sur le développement au stade blastocyste et sur les taux d'implantation.

L'étude de la morphologie fine des spermatozoïdes à fort grossissement et l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique par technique SCD pourraient constituer de nouveaux marqueurs pronostiques à prendre en compte pour la poursuite des tentatives d'AMP, en cas d'échec d'implantation inexplicable en FIV, lorsque les patients présentent un bilan spermiologique *a priori* normal. S'il existe un taux élevé de fragmentation de l'ADN, un traitement antioxydant (vitamines C et E) pourrait leur être proposé selon les modalités récemment décrites [10]. Des diminutions des taux de fragmentation de l'ordre de 60% ont ainsi été rapportées. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact d'un tel traitement sur le pourcentage de spermatozoïdes à morphologie fine nucléaire normale. Une étude comparative permettrait alors de déterminer la sensibilité des deux paramètres et leur cinétique de normalisation ou d'amélioration, si tel est le cas, sous traitement anti-oxydant.

Comme pour toutes les analyses fonctionnelles concernant les spermatozoïdes, ces données restent à valider et doivent être interprétés avec prudence et nuance. Il serait certainement tout aussi excessif de réaliser une analyse MSOME à titre systématique, sans indications validées, que de mettre un terme aux tentatives d'AMP pour un couple sur la seule base d'un taux de fragmentation de l'ADN ou d'un résultat d'analyse morphologique fine des spermatozoïdes. Au demeurant, le caractère innovant et les applications potentielles de ces techniques justifient l'intérêt que leur porte un nombre croissant d'équipes d'AMP.

## REFERENCES

1. AGARWAL A., SAID T.M. : Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum. Reprod. Update, 2003, 9 : 331-345.
2. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F. : Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. N. Engl. J. Med., 2001; 345:1067-1068.
3. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F., KOGOSOWSKI A., MENEZO Y., BARAK Y. : Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. J. Androl., 2002; 23 :1-8.
4. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F. et al. : Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. Fertil. Steril., 2003; 80 :1413-1419.
5. BENCHAIIB M., BRAUN V., LORNAGE J. : Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum. Reprod., 2003; 18 : 1023-1028.
6. BERKOVITZ A., ELTES F., YAARI S., et al. : The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. Hum. Reprod., 2005; 20 :185-190.
7. COETZEE K., KRUGE T.F., LOMBARD C.J. : Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Hum. Reprod. Update, 1998; 4 : 73-82.
8. DE VOS A., VAN DE VELDE H., JORIS H., VERHEYEN G., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A. : Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 2003; 79 :42-48.
9. FERNANDEZ J., MURIEL L., RIVERO M. et al. : The sperm chromatin dispersion test : a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J. Androl., 2003; 24 : 59-66.
10. GRECO E., IACOBELLI M., RIENZI L., UBALDI F., FERRERO S., TESARIK J. : Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. J. Androl., 2005, 26 : 349-353.
11. IRVINE D.S., TWIGG J.P., GORDON E.L., FULTON N., MILNE P.A., AITKEN R.J. : DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J. Androl., 2000; 21 : 33-344.
12. KRUGER T.F., COETZEE K. : The role of sperm morphology in assisted reproduction. Hum. Reprod. Update., 1999; 5 : 172-178.
13. LARSON K.L., DEJONGE C.J., BARNES A.M., JOST L.K., EVENSON D.P. : Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum. Reprod., 2000; 15 : 1717-1722.
14. LOPES S., SUN J.G., JURISICOVA A., MERIANO J., CASPER R.F. : Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 1998; 69 : 528-532.
15. MENKVELD R., WONG W.Y., LOMBARD C.J. et al. : Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. Hum. Reprod., 2001; 16 :1165-1171.
16. NAGY Z.P., VERHEYEN G., TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A.C. : Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. Hum. Reprod., 1998; 13 Suppl 1 : 143-154.

17. SAKKAS D., URNER F., BIZZARO D., MANICARDI G., BIANCHI P.G., SHOUKIR Y., CAMPANA A. : Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.*, 1998; 13 Suppl 4 : 11-19.
18. SALEH R.A., AGARWAL A., NADA E.A. et al. : Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 2003; 79 Suppl 3 :1597-1605.
19. TERRIOU P., GIORGETTI C., AUQUIER P., et al. : Teratozoospermia influences fertilization rate in vitro but not embryo quality. *Hum. Reprod.*, 1997; 12 : 1069-1072.
20. TESARIK J. : Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod. Bio. Med. Online*, 2005; 10 : 370-375.
21. TOMLINSON M.J., MOFFATT O., MANICARDI G.C., BIZZARO D., AFNAN M., SAKKAS D. : Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.*, 2001; 16 : 2160-2165.
22. VIRRO M.R., LARSON-COOK K.L., EVENSON D.P. : Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.*, 2004; 81 : 1289-1295.

---

*Prix SALF meilleur Mémoire de DESS 2005.  
Manuscrit reçu : janvier 2006 ; accepté février 2006.*

## ABSTRACT

**Fine morphology and nuclear quality of spermatozoa:  
relevance for the assessment of ART outcome**

**Hicham BOUGHALI, Christiane WITTEMER,  
Stéphane VIVILLE**

**Routine semen examination does not identify minor malformations of the sperm nucleus and chromatin architectural defects, which may be associated with ART outcome and cannot be detected by the embryologist even at 1000x magnification. Recent publications have demonstrated the advantages, compared to routine analysis, of a new method of real-time detailed morphological evaluation of motile spermatozoa: motile sperm organellar morphology examination (MSOME).**

**MSOME is performed with an inverted light microscope equipped with high-power differential interference contrast optics enhanced by digital imaging to achieve a magnification of 10000x. To be considered morphologically normal, a sperm nucleus must have both a normal shape and a normal chromatin content.**

**The aim of the present study was to combine MSOME and sperm DNA fragmentation characteristics to assess reproductive outcome. The study population consisted of the male partners of 52 couples referred for conventional IVF or split cycles (half IVF-half ICSI cycles) and exhibiting normal routine sperm parameters.**

**Spermatozoa were analysed by examining the fine nuclear morphology and DNA integrity using the sperm chromatin dispersion test (SCD test), based on the principle that the deproteinized nuclei of spermatozoa with nonfragmented DNA show extended halos of DNA dispersion that are either absent or only minimally present in sperm nuclei with fragmented DNA.**

**Fertilization rates were significantly lower in the group showing less than 8% of normal spermatozoa according to MSOME criteria, but early embryo development was not affected. Fine sperm morphology correlated with DNA fragmentation rate.**

**These results demonstrate that the assessment of sperm nuclear normality by MSOME analysis and SCD test improves characterization of the semen sample and should be evaluated as a tool for allocating patients to specific assisted reproduction treatments.**

***Key-words:** spermatozoa, motile sperm morphology, DNA fragmentation*