

Observation des spermatozoïdes au fort grossissement (MSOME) : intérêt et perspectives

Martine ALBERT^{1,2}, Mohamed Hassen CHELLI¹, Nathalie SERMONDADE¹,
Ibrahim HAMMOUD^{1,2}, Marianne BERGERE^{1,2}, François VIALARD¹,
Jacqueline SELVA^{1,2}

1 Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Biologie de la Reproduction et Génétique Médicale, CHI Poissy-Saint Germain en Laye - Poissy ;

2 UFR Paris Île de France Ouest, Université Versailles, Saint Quentin en Yvelines

RESUME

L'approche morphologique des spermatozoïdes à un fort grossissement appelée MSOME (Motile Sperm Organelle Morphology Examination) constitue un progrès intéressant. Elle permet de détecter sur cellules vivantes, avec un grossissement allant jusqu'à plus de X10 000, des anomalies non visualisables par les autres techniques. Cette technique a été d'emblée appliquée à la sélection du spermatozoïde injecté en ICSI, prenant alors le nom d'IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection*), avec un bénéfice très intéressant concernant les taux d'implantation, de grossesse, d'accouchement ainsi qu'une diminution des taux de fausses couches spontanées.

En dehors de la nécessité d'un système optique particulier, les contraintes techniques sont importantes et l'observation, en MSOME et en IMSI, sont plus longues et difficiles dans les cas de cryptozoospermie, d'oligozoospermie et/ou de térazoospermie importantes.

Comparativement au spermocytogramme conventionnel (sur cellules fixées et colorées), le MSOME offre une excellente lisibilité des anomalies céphaliques, notamment de vacuoles localisées dans la région céphalique et qui semblent avoir un effet délétère sur la fécondation et le développement embryonnaire. Ces observations conduisent à utiliser une grille de lecture détaillée des anomalies, et ce diagnostic morphologique sur spermatozoïdes vivants montre qu'un pourcentage notable des spermatozoïdes pré-sélectionnés pour une ICSI conventionnelle sont en fait anormaux en MSOME.

Au delà de ces résultats incontestables au plan thérapeutique, cette nouvelle approche ouvre des perspectives très intéressantes sur les relations à établir entre le phénotype du spermatozoïde injecté et son pouvoir fécondant et de développement embryonnaire. Au plan diagnostique, le MSOME ouvre la perspective de pouvoir

étudier avec nos outils habituels, des populations morphologiquement homogènes de spermatozoïdes normaux ou présentant une anomalie ciblée. De telles investigations et l'analyse morphologique fine de chaque spermatozoïde injecté associée au suivi de chaque ovocyte, puis au suivi embryon par embryon, permettraient de progresser dans la relation structure-fonction du spermatozoïde, l'identification des indications pertinentes de l'IMSI et le choix du spermatozoïde à injecter.

Mots clés : spermatozoïde, morphologie, MSOME, vacuoles, IMSI

Correspondance :

Dr Martine ALBERT - Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Biologie de la Reproduction et Génétique Médicale, CHI Poissy-Saint Germain en Laye, 78303 POISSY cedex - Email martine_albert@hotmail.com

I. INTRODUCTION

La morphologie des spermatozoïdes observée en microscopie optique est indéniablement un paramètre fondamental de la qualité du sperme [18]. Les anomalies qui sont ainsi détectées peuvent avoir des répercussions sur la fonction des spermatozoïdes et un impact sur leur aptitude au processus de reproduction.

Il existe des anomalies morphologiques qui rendent le spermatozoïde inapte à migrer dans les voies génitales féminines; ces anomalies concernent principalement le flagelle et peuvent être mises en évidence par l'étude de la mobilité lors du spermogramme, éventuellement identifiées par le spermocytogramme et confirmées par le défaut de progression dans le mucus cervical *in vivo* ou *in vitro* [2]. La répercussion de ces anomalies flagellaires sur la mobilité peut aussi être quantifiée par l'analyse automatisée du mouvement [3]. A l'échelle ultrastructurale, l'anomalie d'un ou plusieurs composants flagellaires peut être visualisée [17, 25]. On dispose donc sur cette aptitude migratoire de plusieurs voies d'abord, complémentaires et efficaces, sur cellules vivantes ou fixées et colorées, pour authentifier un déficit. Plusieurs alternatives de prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation permettent de contourner ce déficit migratoire [24].

Les autres fonctions attendues du spermatozoïde représentent l'aptitude fécondante, au sens de l'interaction efficace entre le spermatozoïde et l'ovocyte jusqu'à son issue la plus favorable, un embryon sain, apte à s'implanter puis à se développer [28]. Concernant le spermatozoïde, les structures impliquées dans cette interaction se situent essentiellement au niveau de la tête spermatique. Certaines anomalies sont repérées à l'évidence à la lecture du spermocytogramme; il est bien admis que les spermatozoïdes qui présentent une tête de volume augmenté [19, 34] ou diminué (microcéphalie) [21], une tête ronde (globozoospermie) [8, 13] ou double (duplication céphalique), sont autant d'acteurs incapables de féconder *in vivo* et le plus souvent *in vitro*.

Au delà de ces anomalies de taille ou de structure générale aisément identifiables, d'autres anomalies sont plus subtiles et restent sujettes à caution quant au seuil toléré d'anormalité, l'acrosome n'est-il pas un peu petit ? la base un peu carrée ? On peut multiplier à l'infini ces exemples de formes limites, qui font régulièrement débat dans les laboratoires de biologie de la reproduction. Au fil du temps, le seuil de normalité du pourcentage de formes typiques s'est abaissé. La première classification proposée par David et al. [15] en 1975 énonçait une morphologie normale au delà de 60% de formes typiques, puis le seuil a été abaissé à 30% dans la classification David modifiée [4], voire à 15% pour Kruger et al. sur la base de critères morphologiques stricts [22]. Quelle que soit la classification adoptée, lorsque la morphologie est très altérée, l'ICSI est en général la solution thérapeutique adoptée, souvent avec succès, même dans des cas de tératospermie totale [23] et parfois sans que la ou les anomalies en cause n'aient été clairement mentionnées.

Cependant, que l'indication de l'ICSI soit une tératospermie importante, associée ou non à une altération des autres paramètres, ou un échec de fécondation préalable inexpliqué en FIV, les résultats de l'ICSI sont parfois décevants, avec : un taux de fécondation faible ou nul, une qualité embryonnaire défectueuse, un taux d'implantation abaissé, voire un taux de Beta

hCG qui chute très rapidement. Bien sûr, la cohorte ovocytaire peut être en cause, mais on peut aussi s'interroger sur la part méconnue du spermatozoïde dans ces échecs. Or, quelles que soient les investigations conduites sur les spermatozoïdes et dont les résultats sont corrélés aux résultats de l'ICSI (étude de la fragmentation de l'ADN, hybridation *in situ* ou étude de la structure chromatinienne par exemple), elles ne sont pas applicables en temps réel, ni applicables au spermatozoïde injecté [10].

Dans ce contexte, l'approche morphologique des spermatozoïdes à un fort grossissement proposée par Bartoov et al. [5] et appelée MSOME (*Motile Sperm Organelle Morphology Examination*) a dès lors constitué une avancée considérable. Elle permet en effet de détecter sur cellules vivantes, avec un grossissement allant jusqu'à plus de X10 000, des anomalies non visualisables par les autres techniques. Cette technique a été d'emblée appliquée à la sélection du spermatozoïde injecté en ICSI [5] qui prend alors le nom d'IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection*) [7]. Ces dernières années, cette méthode s'est développée dans plusieurs centres d'Assistance Médicale à la Procréation, qui témoignent parfois d'un bénéfice quant au taux de fécondation [9] et d'un bénéfice constant concernant les taux d'implantation, de grossesse, d'accouchement ainsi que d'une diminution des taux de fausses couches spontanées [10, 11, 20]. Certains auteurs se sont attachés à analyser en détail les conséquences en IMSI des anomalies observées en MSOME [11, 33] ou les relations entre la morphologie des spermatozoïdes observés en MSOME et d'autres méthodes d'approche comme par exemple la fragmentation de l'ADN spermatique [12, 20].

L'objet de cet article est de tenter de répondre à plusieurs questions : (i) qu'est-ce que le MSOME ? (ii) le MSOME présente-t-il un intérêt au plan diagnostique, (iii) existe-t-il des indications particulièrement pertinentes ? (iv) quelle est la signification des anomalies décelées en MSOME ? (v) quelle est leur répercussion ? (vi) quelles études faudrait-il mettre en œuvre en utilisant cet outil pour valider l'intérêt du MSOME en thérapeutique ?

II. MÉTHODOLOGIE DE L'OBSERVATION À FORT GROSSISSEMENT DE LA MORPHOLOGIE SPERMATIQUE

1. Matériel

L'observation à fort grossissement de spermatozoïdes vivants nécessite un système optique particulier et si plusieurs configurations sont proposées sur le marché, il repose en pratique sur un équipement spécifique, à savoir :

- Un microscope inversé, doté d'un objectif x100 pour le contraste interférentiel de Nomarsky (\pm d'un zoom variable),
- Une caméra vidéo numérique couleur de bonne qualité (\pm d'un zoom variable),
- Un moniteur couleur de haute définition.

L'ensemble de ces systèmes optiques permet une observation des spermatozoïdes à un grossissement allant de l'ordre de 2000 à 12 500 fois selon les configurations spécifiques. Les progrès technologiques récents en matière de microscopie et la robotisation des systèmes optiques apportent dorénavant une grande aisance d'utilisation.

2. Préparation de la fraction de spermatozoïdes mobiles en vue de MSOME

La préparation des spermatozoïdes pour l'observation au MSOME consiste en une migration du sperme entier gradient double couche (45%/90%) PureSperm 100® (Nidacon) avec au maximum 2 mL de sperme par gradient, centrifugé à 300g pendant 20 minutes. Le culot obtenu est lavé avec 2 mL de milieu de culture Universal IVF Medium® (MediCult) et centrifugé à 600g pendant 10 minutes. L'observation d'une goutte calibrée de 2µL de la préparation obtenue entre lame et lamelle est essentielle pour estimer la richesse de la préparation et la facilité de l'observation ultérieure.

L'expérience de la technique et le fort grossissement utilisés montrent qu'une observation en MSOME est facilement réalisable quand on dénombre entre 1 et 5 spermatozoïdes par champ au grossissement x6000.

3. Contraintes techniques

Elles sont principalement liées au matériel utilisé, à savoir la préparation de la boîte de sélection, à la qualité du sperme observé et à l'éventuelle injection ultérieure du spermatozoïde sélectionné.

a) Contraintes liées à la préparation de la boîte de sélection

La boîte de sélection utilisée est à fond en verre de 0,17µm WillCo-dish® (WillCoWells B.V. Amsterdam, The Netherlands) pour permettre l'utilisation de l'objectif x100. Elle présente une fragilité relative mais, dans notre propre expérience, elle peut être utilisée pour l'injection et pour le test HOS (*Hypo Osmotic Swelling test*) [27]. Une fois le fond extérieur de la boîte enduit d'huile à immersion, il est impossible de poser la boîte sur une surface autre que l'objectif x100. Pour toute autre manipulation, il faut trouver un support qui ne soit pas en contact direct avec l'huile à immersion. Le couvercle de la boîte en verre, posé sur le plan de travail en position inversée, peut être utilisé à cette fin.

L'utilisation d'huile à immersion est impérative comme interface entre l'objectif x100 et la boîte en verre et elle doit recouvrir la totalité de la surface à analyser. Il est parfois nécessaire de rajouter quelques microlitres d'huile pendant la technique, en fonction de la configuration du microscope et de la durée de l'observation. Signalons enfin que l'huile devient parfois collante, gênant alors le déplacement de la boîte sur le plateau et altérant la qualité de l'observation.

b) Contraintes liées à la qualité du sperme observé

Les spermatozoïdes à observer sont placés dans un milieu visqueux (polyvinylpyrrolidone, acide hyaluronique), ce qui ralentit les spermatozoïdes, facilite leur observation et offre un meilleur contraste par rapport aux milieux de culture habituels. Le champ de prédilection de l'observation du spermatozoïde est le bord de la goutte, qui doit nécessairement avoir des bords bien aplatis pour afin que les têtes spermatiques ne soient pas de profil au cours de l'observation. Il faut prévoir 2 à 3 µL de sperme migré dilué dans 3 à 4 µL de PVP, sous huile de paraffine stérile. Une fois préparée, la boîte est déposée 15 minutes à 37°C sous 5% de CO2 dans l'air, pour permettre la migration des spermatozoïdes jusqu'en bord de goutte.

L'observation en MSOME est difficile dans les cas de cryptozoospermie et d'oligozoospermie extrême. Au grossissement x6000, la durée totale de la technique varie de

30 minutes à 2h30 selon la qualité de l'échantillon et l'expérience de l'opérateur.

c) Contraintes liées à l'injection du spermatozoïde sélectionné (IMSI)

La sélection morphologique est le temps le plus important et souvent le plus long de la technique, notamment en cas de tératozoospermie importante [20]. Deux variantes opératoires sont possibles en vue d'IMSI (Figure 1) :

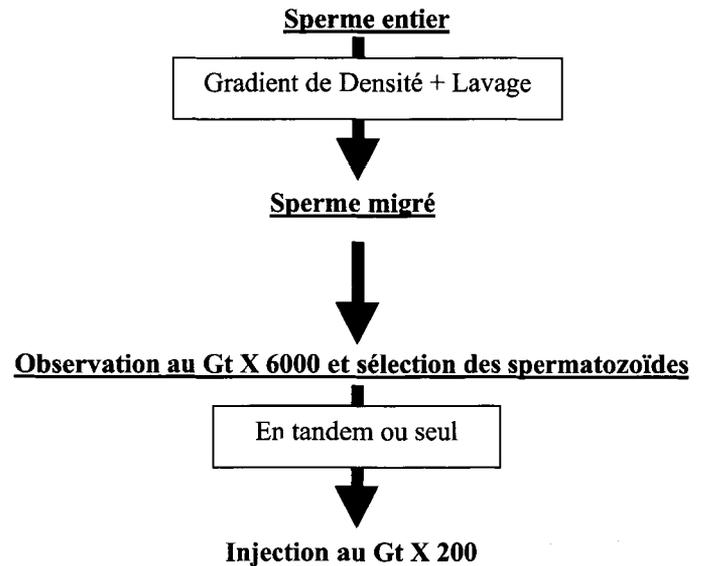


Figure 1 : Mode opératoire du MSOME et/ou de l'IMSI.

- La méthode la plus simple est de travailler en tandem : un opérateur « sélectionneur » sélectionne sur une boîte en verre le nombre de spermatozoïdes nécessaires. Il peut déplacer par la suite ces spermatozoïdes sur une boîte d'ICSI plastique dans une goutte de milieu visqueux. Un deuxième opérateur « injecteur » réalise l'ICSI en utilisant les spermatozoïdes sélectionnés. Cette procédure implique que deux micromanipulateurs soient alors disponibles dans le laboratoire et consomme deux fois plus de pipettes et de boîtes d'injection.
- L'alternative est que le même opérateur soit « sélectionneur » et « injecteur ». Il peut ainsi travailler avec la même boîte en verre, sur un même micromanipulateur, en ayant prévu de ne pas mettre d'huile à immersion sous la goutte d'injection.

III. OBSERVATION DES SPERMATOZOÏDES AU FORT GROSSISSEMENT

A notre connaissance, il n'existe pas de réelle standardisation de la classification des anomalies observées en MSOME et la plupart des travaux énoncent soit le pourcentage de spermatozoïdes ou de têtes spermatiques jugés de forme normale, soit le plus souvent, les issues des tentatives avec microinjection de spermatozoïdes sélectionnés et observés en MSOME et sélectionnés au fort grossissement. Si on dispose rarement de précision quant aux anomalies spermatiques observées en MSOME, ni à leur quantification, il semble toutefois y avoir un relatif consensus quant à la définition d'un spermatozoïde normal observé au fort grossissement, appelé

aussi « top spermatozoïde » [5]. Le spermatozoïde normal au fort grossissement a les caractéristiques suivantes :

- Taille : longueur = $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ et largeur : $3,28 + 0,2 \mu\text{m}$;
- Tête ovale, lisse et symétrique ;
- Absence de vacuoles au niveau céphalique ou présence d'une seule vacuole d'une surface inférieure à 4% par rapport à celle de la tête ;
- Absence d'anomalie flagellaire (pièce intermédiaire et pièce principale).

1. Description des anomalies

Dans notre centre, nous avons dans un premier temps tenté de recenser dans des préparations de spermatozoïdes migrés, les différentes anomalies observables en MSOME, dans le but de disposer d'un atlas à visée didactique, référentiel pour l'ensemble des utilisateurs du laboratoire [29]. En dehors des anomalies de la tête spermatisée aisément reconnaissables en MSOME telles que les anomalies de taille, de forme, de régularité du pourtour des têtes, nous avons noté deux particularités : 1) la moindre lisibilité des acrosomes, dont le plus souvent on ne devine que la limite et, à l'inverse, 2) l'excellente lisibilité des vacuoles localisées dans la région céphalique (**Figure 2**).

D'emblée lors de cette approche préliminaire, il est apparu indispensable de s'intéresser aux vacuoles et notamment d'avoir une lecture fiable de leur surface. A l'aide du logiciel Histolab (version 5.1.1 – Microvision Instruments), nous avons mesuré objectivement la surface des vacuoles sur des images acquises de spermatozoïdes photographiés en MSOME. Ces mesures objectives de la surface, rapportées à la surface des têtes spermatisées, ont été systématiquement comparées à leur évaluation visuelle avec l'aide d'un gabarit celluloïd (masque transparent). Avec l'expérience, l'évaluation visuelle directe et tridimensionnelle grâce à la vis micrométrique, est devenue très précise et appliquée en routine.

En ce qui concerne les flagelles, l'observation au fort grossissement des spermatozoïdes est d'autant plus difficile que les spermatozoïdes sont mobiles, difficulté contournable par l'utilisation d'une solution visqueuse. Les différentes anomalies de la pièce intermédiaire sont bien visualisées. La présence de restes cytoplasmiques est facilement repérée et il en est de même pour les défauts d'angulation, qu'il s'agisse d'un angle franc ou d'une implantation flagellaire plus ou moins désaxée par rapport à l'axe de la tête. Les irrégularités de calibre de la pièce intermédiaire peuvent elles aussi être observées avec beaucoup de précision. L'observation au fort grossissement des pièces principales retrouve les anomalies observées au grossissement classique, sans apport d'information particulière.

2. Classification des anomalies spermatisées observées au fort grossissement

Au terme de cette étude préliminaire détaillée des anomalies observables en MSOME, nous avons établi une grille de lecture [29], inspirée de celle proposée par Bartoov et al. [6] et de la classification de David modifiée [4] qui est utilisée pour la lecture des spermocytogrammes dans notre service et permet de prendre en compte les anomalies associées sur un même spermatozoïde.

Dans un but de précision optimale, nous avons ajouté à la grille élaborée par Bartoov 3 critères : contour irrégulier et anomalie

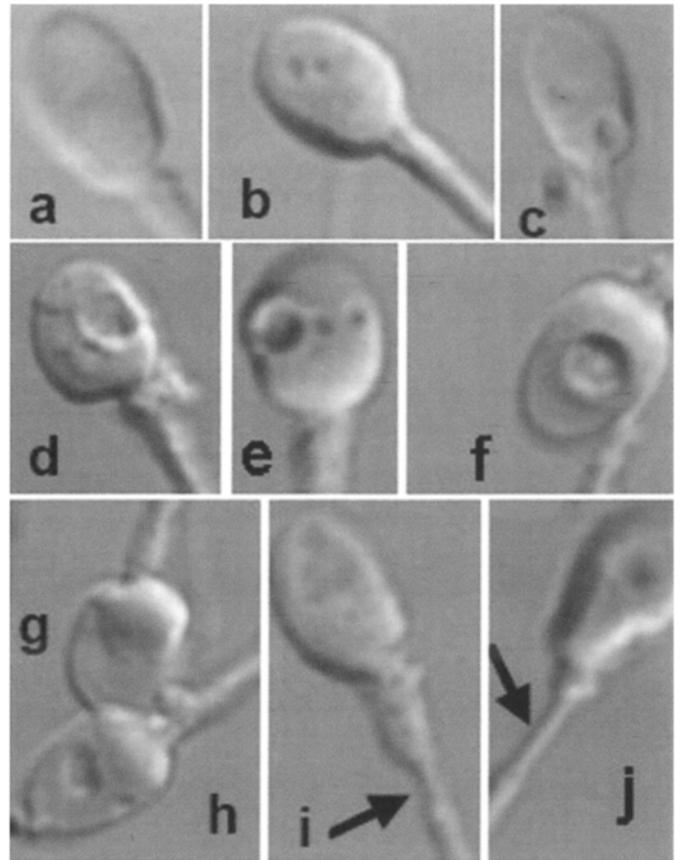


Figure 2 : Photos de spermatozoïdes observés au fort grossissement (GTx6000).

- a) Morphologie normale ou " top spermatozoïde " .**
- b) 2 vacuoles dans la région antérieure dont la surface cumulée est inférieure à 5% de celle de la tête.**
- c) 1 vacuole basale occupant 15% de la surface de la tête.**
- d) Base anormale et une vacuole occupant 35% de la surface de la tête.**
- e) Contour irrégulier dû à une vacuole périphérique déformante et 2 petites vacuoles occupant au total 30% de la surface de la tête.**
- f) 1 vacuole centrale occupant 30% de la surface de la tête.**
- g) Base anormale.**
- h) Contour anormal et 2 vacuoles occupant 20% de la surface de la tête.**
- i) Vacuole antérieure occupant 40% de la surface et pièce intermédiaire irrégulière.**
- j) Vacuole centrale occupant 15% de la surface de la tête, base anormale, angulation (flagelle désaxé) et pièce intermédiaire irrégulière (grêle).**

régionale au niveau de la tête, irrégularité de la pièce intermédiaire. La rubrique « vacuoles » a également été détaillée par le nombre de vacuoles observées (1, 2, ≥ 3) et l'estimation de leur surface (rapportée à celle de la tête spermatisée) classée en 7 catégories (<5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 30-40%, 40-50% et >50%). Dans un deuxième temps, nous avons choisi de noter également la localisation de ces vacuoles, dans la région antérieure de la tête (superposable à la région acrosomique) ou postérieure

(région de la base). La grille de lecture que nous utilisons est présentée sur la **Figure 3**. Le compte rendu destiné aux patients et à leur médecin traitant est moins détaillé, mais reprend les items essentiels.

Pour une évaluation fiable de la morphologie des spermatozoïdes dans les fractions migrées, le nombre de spermatozoïdes mobiles analysés au fort grossissement doit être au minimum de 100, sauf facteur limitant dans le cas d'oligospermie et/ou d'asthénospermie sévère, voire de cryptozoospermie. Une autre évaluation consiste à n'analyser au fort grossissement que les spermatozoïdes jugés injectables au grossissement conventionnel en usage en ICSI. Dans ce cas, on peut admettre qu'une bonne estimation de la morphologie en MSOME est obtenue en observant 25 spermatozoïdes pré-sélectionnés au grossissement conventionnel de l'ICSI.

3. Apport du MSOME au diagnostic morphologique

À l'évidence, le grossissement obtenu en MSOME permet de visualiser des anomalies qui ne l'auraient pas été avec les grossissements habituels. Dans une première série de 25 patients pris en charge en ICSI sans sélection particulière d'indication, les résultats du spermocytogramme effectué à partir de fractions de spermatozoïdes migrés ont été comparés à ceux de l'observation en MSOME de ces mêmes fractions. Les pourcentages de spermatozoïdes normaux étaient plus bas en MSOME et les différentes anomalies comme leur répartition étaient globalement bien corrélées, sauf pour les anomalies non répertoriées au spermocytogramme conventionnel, anomalie régionale et vacuoles [29].

Nous avons également comparé la morphologie de spermatozoïdes observée en MSOME dans ce même groupe de patients (n=25) pris en charge en ICSI et dans un groupe de patients fertiles (n=5). Cette étude a été réalisée sur les spermatozoïdes migrés puis sélectionnés pour l'ICSI au grossissement conventionnel (GT x400) et jugés donc injectables. Pour chaque sujet, 25 spermatozoïdes pré-sélectionnés au GT x400 ont été analysés en MSOME au GT x6000. Dans tous les cas, un pourcentage notable des spermatozoïdes pré-sélectionnés pour une ICSI conventionnelle étaient en fait anormaux en MSOME et le groupe de patients pris en charge en ICSI se distinguait par un taux d'anomalies significativement plus élevé que dans le groupe fertile (70,7% vs 46,4%, p<0.0001).

Dans cette étude, la présence d'une ou plusieurs vacuoles était de loin l'anomalie majoritaire au niveau des spermatozoïdes pré-sélectionnés, jugés injectables au grossissement en vigueur lors de la réalisation d'une ICSI conventionnelle (53,44%), avec des variations importantes tant dans le nombre de vacuoles que de la surface qu'elles occupent.

Dans notre expérience, il semble que les vacuoles soient plus fréquentes au niveau de la moitié antérieure de la tête, correspondant à la région principale de l'acrosome. Les autres anomalies assez fréquemment observées en MSOME sur spermatozoïdes pré-sélectionnés sont la base anormale et la présence d'un reste cytoplasmique, ce qui confirme les observations de Boughali et al. [12].

4. Signification de ces vacuoles céphaliques

Dès ses premières observations en MSOME, Bartoov et al. [5] parlent de « vacuoles nucléaires ». Ce type de vacuoles est bien décrit en microscopie électronique [36], sous l'aspect de zones apparaissant très claires, plus ou moins étendues, rarement

totallement optiquement vides, mais contenant des inclusions pléiomorphes. L'aspect de condensation de la chromatine n'est habituellement pas en rapport avec la présence de ces vacuoles. L'ultrastructure des spermatozoïdes peut aussi montrer des bulles acrosomiques qui peuvent faire saillie à l'extérieur du contour céphalique ou être internalisées et faire hernie dans la chromatine.

Pour certains auteurs, les vacuoles nucléaires pourraient correspondre à des zones de moindre condensation de la chromatine, où l'ADN serait moins protégé contre les lésions oxydatives et être ainsi potentiellement à l'origine de la fragmentation de l'ADN [1]. À ce jour, il ne semble pas que l'on dispose de certitude quant au support ultrastructural de cette anomalie, nucléaire ou acrosomique, ce qui nous engage à utiliser le terme de vacuoles « céphaliques ».

Par ailleurs, Peer et al. [26] ont montré récemment que l'incubation des spermatozoïdes à 37°C au delà de 2 heures s'associait à une altération de l'intégrité morphologique des noyaux et à une augmentation de l'incidence des vacuoles, observations réalisées en MSOME; ces auteurs suggèrent que les manipulations des spermatozoïdes ne dépassent pas deux heures à 37°C, comme l'avaient conseillé Yavas et Selub [35] ou soient réalisées à 21°C si elles s'étendent sur plus de 2 heures.

IV. INTÉRÊT DU MSOME DANS LE CADRE DE L'IMSI

La technique d'observation des spermatozoïdes au fort grossissement a été d'emblée appliquée à l'ICSI [5]. Les premiers résultats obtenus dans une série de 24 couples en échec de FIV ou d'ICSI ont fait état d'un taux de grossesse clinique avoisinant les 60% et même supérieur lorsque l'IMSI était réalisée avec des spermatozoïdes strictement normaux. Ces résultats se sont confirmés au fil des études, la normalité du noyau dans sa forme et son contenu étant corrélée au taux de fécondation en IMSI [6, 7].

Berkovitz et al. [9] confirment ces résultats en 2005, précisant que le taux de fécondation, le nombre de « top embryos », le taux d'implantation, le taux d'accouchement allaient de pair avec l'injection de spermatozoïdes strictement normaux en MSOME, réduisant ainsi le taux de FCS à un taux très bas (de l'ordre de 5%) ; en même temps, ces auteurs posent le problème de mieux définir les anomalies morphologiques du noyau impliquées dans les échecs. Ils ont ainsi montré que les vacuoles de grande taille (> 0,78µm) étaient sans effet sur le taux de fécondation mais affectaient le taux de grossesse clinique, donc augmentaient la mort embryonnaire précoce [11].

Une autre approche consiste à corréler les résultats du MSOME avec d'autres investigations spermatiques. Pour Boughali et al. [12], il existe une corrélation négative entre le pourcentage de spermatozoïdes présentant une morphologie nucléaire normale en MSOME et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique évalué par une technique SCD (*Sperm Chromatin Dispersion test*), sans que ce taux semble interférer avec les taux de fécondation et de développement embryonnaire précoce. Utilisant une méthode Tunel, Hazout et al. [20] n'ont pas observé de différence dans les issues des IMSI réalisées, quels que soient les taux de fragmentation de l'ADN spermatique dans le sperme entier.

En rapport avec le taux d'aneuploïdie spermatique, classiquement plus élevé chez les patients présentant une infertilité sévère, Chelli

SPERMATOZOÏDE		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normal								x		
TÊTE	Allongée									
	Amincie									
	Microcéphale									
	Macrocéphale									
	Contour irrégulier			x						
	Anomalie régionale	x								
	Base			x	x					
VACUOLES	Nombre	2	2	>5	1	3	1		2	
	Surface (%)	15	30	>50	<5	20	10		10	
	Localisation antérieure	x	x	x	x		x		x	
	Localisation basale			x		x			x	
PIECE INTERMEDIAIRE	Reste cytoplasmique					x			x	
	Grêle						x			
	Angulation									
	Irrégulier	x								
PIECE PRINCIPALE	Absent									
	Ecourté									
	Irrégulier									
	Enroulé									
	Multiple									

Figure 3 : Grille de lecture des spermatozoïdes et des anomalies observés au fort grossissement.

[14] a recherché si la sélection de spermatozoïdes strictement normaux en MSOME apportait un bénéfice par rapport à la sélection des spermatozoïdes en ICSI conventionnelle. Cette étude réalisée dans un groupe de patients à taux d'aneuploïdie élevé (porteurs de translocations constitutionnelles, caryotype 47,XY,Y et macrocéphalie syndromique), n'a pas mis en évidence d'amélioration des taux globaux d'euploïdie par la sélection en MSOME. Par contre, chez les patients porteurs de translocation, il a observé une modification de la répartition des malségrégations méiotiques, et donc, une sélection de certaines d'entre elles, ce qui pourrait être lié à des modifications particulières de la structure même du matériel génétique dans certains types de ségrégation.

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'intérêt majeur du MSOME réside donc dans la possibilité d'observer à fort grossissement les spermatozoïdes vivants, de sélectionner préférentiellement ceux qui sont exempts de toute anomalie pour les microinjecter dans des ovocytes. Les auteurs rapportant la pratique de l'IMSI, témoignent tous de taux de succès très élevés, notamment concernant les taux d'implantation, de grossesse clinique et d'accouchement. Ces résultats en IMSI sont d'autant meilleurs que l'on a pu sélectionner et injecter un spermatozoïde parfait au fort grossissement.

Il serait toutefois regrettable de ne s'intéresser qu'à l'amélioration des taux de grossesse en IMSI et de négliger les relations à établir entre le phénotype du spermatozoïde injecté, son pouvoir fécondant et de développement embryonnaire.

Il y a avant tout nécessité d'utiliser une grille de lecture détaillée et de l'appliquer avec la plus grande rigueur aux spermatozoïdes sélectionnés au fort grossissement avant leur injection. Si l'on n'a pas pu injecter un spermatozoïde strictement normal en MSOME, vaut-il mieux choisir un spermatozoïde avec 1 vacuole représentant 10% de surface de la tête ou 2 petites représentant 5% chacune ? Faut-il privilégier des vacuoles localisées dans la région antérieure ou vers la base de la tête spermatique ? L'équipe de Berkovitz a déjà démontré l'effet préjudiciable des grandes vacuoles sur l'issue de l'IMSI [11]. Ces résultats démontrent que seule l'analyse morphologique fine de chaque spermatozoïde injecté et le suivi de chaque ovocyte, puis le suivi embryon par embryon, permettront de répondre à ces questions et de progresser dans la relation structure-fonction du spermatozoïde et le choix du spermatozoïde à injecter.

Par ailleurs, au-delà de ces succès en IMSI, qu'est-ce qui fait qu'un « top spermatozoïde » est meilleur qu'un autre ? Qu'y a-t-il de déterminant dans cette équation structure-fonction ? Avec ces interrogations, c'est toute la question de l'effet paternel du spermatozoïde sur la fécondation et les premiers stades de développement embryonnaire qui est posée.;

Tesarik et al. [32], font la distinction entre un effet paternel précoce au stade de zygote, qui conditionne le développement de l'embryon, facteur d'origine génétique ou épigénétique [30], indépendant de la fragmentation de l'ADN spermatique, et un effet tardif qui n'interfère qu'au delà du développement embryonnaire des 3 premiers jours, et serait lié à la fragmentation de l'ADN [31]. Tout dépendrait-il de la fragmentation ou de l'altération de l'ADN spermatique ? Cela suggérerait que les « top spermatozoïdes » ont un ADN « intact » et dans ce cas, qu'en est-il des spermatozoïdes « imparfaits » ? De quels défauts cachés s'agit-il ? Concernent-ils l'intégrité nucléaire, la condensation de la chromatine, des cassures de l'ADN ?

De Vos et al. [16] ont analysé attentivement les spermatozoïdes injectés en ICSI et ont comparé les taux de fécondation selon les anomalies observées ; ils constatent un déficit dans la capacité implantatoire des embryons conçus après injection d'un spermatozoïde anormal et suggèrent l'existence d'un facteur masculin d'infertilité qui affecterait la qualité et la formation du blastocyste. Récemment, Vanderzwalmen et Zech [33] ont montré que la proportion d'embryons capables d'évoluer *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste était corrélée à l'existence d'anomalies céphaliques et en particulier à la présence de vacuoles. Le fait que ces vacuoles aient un effet délétère sur le développement embryonnaire mérite d'autres investigations.

Avant l'avènement du MSOME, l'étude ultrastructurale des pathologies spermatiques syndromiques, comme par exemple des globozoospermies, des microcéphalies ou des syndromes de flagelles courts, a toujours démontré l'hétérogénéité des phénotypes spermatiques. Ces variations à l'intérieur même de la population spermatique d'un individu sont observées quel que soit l'« outil » diagnostique » utilisé et ceci d'autant plus qu'il ne s'agit pas d'une pathologie spermatique syndromique. En d'autres termes, on peut déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, vivants, aneuploïdes, aptes à faire leur réaction acrosomique, hyperactivés ou à ADN fragmenté, etc... mais tous ces éléments n'ont qu'une valeur indicative puisque par définition, les spermatozoïdes qui sont ainsi évalués ne sont jamais ceux qui fécondent...

Au plan diagnostique, face à cette hétérogénéité, le MSOME ouvre la perspective de pouvoir étudier avec nos outils habituels, des populations morphologiquement homogènes de spermatozoïdes normaux ou présentant une anomalie ciblée. Bien sûr, cela impose le tri des spermatozoïdes au fort grossissement et l'adaptation de nos procédures techniques, quelles qu'elles soient, à des quantités restreintes de spermatozoïdes. Mais dans des situations à risque comme par exemple l'oligospermie sévère, suspecte d'être associée à un fort taux d'aneuploïdie spermatique, il serait très intéressant de pouvoir par exemple corrélérer l'aneuploïdie ou la fragmentation de l'ADN spermatiques à la morphologie au fort grossissement. En faveur de cette démarche, on retiendra l'étude menée par Chelli [14], qui a adapté la technique d'hybridation *in situ* à un nombre restreint de spermatozoïdes (<100). Il a ainsi pu montrer que, chez des patients à risque augmenté d'aneuploïdie spermatique, la sélection en MSOME de spermatozoïdes strictement normaux ne permettait pas d'éliminer les spermatozoïdes aneuploïdes.

Étudier des populations de spermatozoïdes morphologiquement homogènes en MSOME, c'est mieux cerner par nos investigations habituelles quelles pathologies spermatiques justifient une observation des spermatozoïdes en MSOME et éventuellement une prise en charge en IMSI. Compte tenu des contraintes techniques imposées par le MSOME et éventuellement l'IMSI, notamment l'augmentation significative du temps technique, la formation de manipulateurs expérimentés et le coût du matériel, il est en effet indispensable de préciser les bonnes indications du MSOME et de l'IMSI [9, 20], c'est-à-dire celles où les couples infertiles pris en charge en AMP vont tirer un réel bénéfice de la mise en œuvre de ces techniques.

VI. CONCLUSION

Au total, au niveau diagnostique, le MSOME offre la possibilité de faire un diagnostic morphologique précis sur spermatozoïde vivant ; cet outil promet ainsi d'être riche

d'enseignements sur ce qui importe dans la morphologie du spermatozoïde pour qu'il soit fécondant et que cette fécondation se poursuive par une implantation, une grossesse évolutive et la naissance d'un bébé bien portant. C'est en effet, au plan thérapeutique, une opportunité extraordinaire dans le cadre de la prise en charge des couples souffrant d'infécondité masculine sévère, si l'on peut associer le MSOME et l'ICSI, couplé ensuite au suivi des ovocytes et des embryons, sous réserve que les bonnes indications soient précisées dans un avenir proche.

RÉFÉRENCES

1. AITKEN R.J., BAKER M.A., SAWYER D. : Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online*, 2003, 7 : 65-70.
2. ALBERT M. : Le test post coïtal à l'heure de l'Assistance Médicale à la Procréation. *Andrologie*, 2005, 15 : 160-166.
3. AUGER J., SERRES C., WOLF J.P. et al. : Sperm motility and fertilization. *Contracept. Fertil., Sex.*, 1994, 22 : 314-318.
4. AUGER J., EUSTACHE F. : Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 2000, 10 : 358-373.
5. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F. et al. : Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345 : 1067-1068.
6. BARTOOV B., BERKOVITZ A., ELTES F. et al. : Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J. Androl.*, 2002, 23 : 1-8.
7. 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.
8. BATTAGLIA D.E., KOEHLER J.K., KLEIN N.A. et al. : Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 118-122.
9. 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.
10. BERKOVITZ A., ELTES F., LEDERMAN H. et al. : How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod. Biomed. Online*, 2006, 12 : 634-638.
11. BERKOVITZ A., ELTES F., ELLENBOGEN A. et al. : Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome ? *Hum. Reprod.*, 2006, 21 : 1787-1790.
12. BOUGHALI H., WITTEMER C., VIVILLE S. : Intérêt de l'analyse de la morphologie fine et de la qualité nucléaire des spermatozoïdes dans le cadre des techniques d'AMP. *Andrologie*, 2006, 16 : 39-45.
13. CHECK J.H., LEVITO M.C., SUMMERS-CHASE D. et al. : A comparison of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperm selected by high magnification versus ICSI with testicular sperm both followed by oocyte activation with calcium ionophore. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2007, 34 : 111-112.
14. CHELLI M.H. : La sélection des spermatozoïdes à fort grossissement permet-elle une diminution de la fréquence des aneuploïdies spermatiques ? Mémoire de Master PRO BDR, Cochin 2007.
15. DAVID G., BISSON J.P., CZYGLIK F. : Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1) propositions pour un système de classification. *J. Gyn. Obst. Biol. Reprod.*, 1975, 4 : 17-36.
16. DE VOS A., VAN DE HELDE H., JORIS H. et al. : Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2003, 79 : 42-48.
17. ESCALIER D., ALBERT M. : New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity. *Fertil. Steril.*, 2006, 86 : 219 e1-9.
18. GUICHAOUA M.R., PERRIN J., GEOFFROY-SIRAUDIN C. : Quelle valeur attribuer à l'analyse morphologique des spermatozoïdes en microscopie optique ? *Andrologie*, 2008, 18 : 18-25 .
19. GUTHAUSER B., VIALARD F., DAKOUANE M. et al. : Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil. Steril.*, 2006, 85 : 750 e5-750 e7.
20. HAZOUT A., DUMONT-HASSAN M., JUNCA A.M. et al. : High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod. Biomed. Online*, 2006, 12 : 19-25.
21. JOUANNET P., DUCOT P., FENEUX D. et al. : Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int. J. Androl.*, 1988, 11 : 379-394.
22. KRUGER T.F., ACOSTA A.A., SIMMONS K.F. et al. : New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*, 1987, 30 : 248-251.
23. McKENZIE L.J., KOVANI E., AMATO P. et al. : Pregnancy outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with profound teratospermia. *Fertil. Steril.*, 2004, 82 : 847-849.
24. MITCHELL V., RIVES N., ALBERT M. et al. : Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum. Reprod.*, 2006, 21 : 2065-2074.
25. MITCHELL V., PEERS M.C., MARCHETTI C. et al. : Altérations morphologiques des spermatozoïdes en microscopie électronique : indications, phénotypes, fécondance et pronostic de fertilité. *Andrologie*, 2008, 18 : 35-45.
26. PEER S., ELTES F., BERKOVITZ A. et al. : Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C ? *Fertil. Steril.*, 2007, in press.
27. SALLAM H.N., EZZELDIN F., SALLAMA. et al. : Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo-osmotic swelling test as predictors of fertilization potential : experience from the IVF model. *Int. J. Fertil. Womens Med.*, 2003, 48 : 88-95.
28. SELVA J., BERGERE M., ALBERT M. : Fécondation humaine. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Gynécologie/Obstétrique*, 2001, 5-001-A-10.
29. SERMONDADE N., VIALARD F., BERGERE M. et al. : Evaluation de l'apport de la méthode d'observation des spermatozoïdes à fort grossissement en ICSI. *Andrologie*, 2007, 17 : 212-222.
30. TESARIK J., MENDOZA C., GRECO E. : Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 184-189.
31. TESARIK J., GRECO E., MENDOZA C. : Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 611-615.
32. TESARIK J., MENDOZA C. : Treatment of severe male infertility by micromanipulation -assisted fertilization: an update. *Front. Biosci.*, 2007, 12 : 105-114.
33. VANDERZWALMEN P., ZECH H. : Selection of the best spermatozoa at high magnification: a way to improve the rate of development to the blastocyst stage before elective single embryo transfer (eSET). *Fert. Mag.*, 2007, 6 : 16-19.
34. VIVILLE S., MOLLARD R., BACH M.L. et al. : Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies ? *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2563-2566.
35. YAVAS Y., SELUB M.R. : Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil. Steril.*, 2004, 82 : 1638-1647.
36. ZAMBONI, L. : The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil. Steril.*, 1987, 48 : 711-734.

ABSTRACT

Value and prospects of Motile Sperm Organelle Morphology Examination

Martine ALBERT, Mohamed Hassen CHELLI, Nathalie SERMONDADE, Ibrahim HAMMOUD, Marianne BERGERE, François VIALARD, Jacqueline SELVA

Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME) constitutes a real improvement in ART management and outcome, as it allows detection of specific sperm anomalies on living cells, which cannot be detected by routine analysis. MSOME applied to the selection of sperm injected into the oocyte is called IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection) and is associated with a considerable improvement of implantation, clinical pregnancy and delivery rates.

A high-power microscope (X 2,000 to X 10,000) and video enhancement system are necessary and technical limitations are related to cryptozoospermia and/or severe teratozoospermia.

Compared to routine sperm morphology assessment, MSOME allows the detection of subtle cephalic anomalies, such as vacuoles. These vacuoles seem to have a deleterious effect on fertilization and embryo development *in vitro*. These observations have led to a detailed classification of anomalies and this morphological diagnosis on living sperm demonstrates that most sperm selected for conventional ICSI at X 400 are actually abnormal on MSOME at X 6,000 or more.

In addition to the very good results obtained in IMSI, this new approach opens up interesting prospects concerning the relationship between the phenotype of the injected sperm and its fertilization capacity and embryo development. In terms of diagnosis, MSOME could be used to select and study homogeneous groups of normal sperm or homogeneous groups of sperm exhibiting the same well defined anomaly. Such studies, associated with fine analysis of injected sperm and follow-up of each oocyte and each embryo, should provide more information about the relationship between sperm structure and function and should help to define the relevant indications for IMSI and the choice of spermatozoa to be injected.

Key words: *spermatozoa, morphology, MSOME, vacuoles, IMSI*