



SPERMIOLOGIE

L'examen du sperme devenu systématique dans le cadre d'une infertilité a permis de mettre en évidence de nombreux facteurs masculins, responsable des problèmes rencontrés par des couples désirant une grossesse. Les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) proposent de nombreuses alternatives thérapeutiques, dont la micro-injection (ICSI) qui connaît actuellement un véritable succès en raison de sa capacité à court-circuiter les processus naturels de fécondation. L'ICSI ne doit pas être cependant le traitement de première intention, étant donné la prise en charge complexe et les conséquences inhérentes à la technique. Seule une étude approfondie du sperme permet d'apprécier le pouvoir fécondant réel des spermatozoïdes et de poser ainsi les différentes indications thérapeutiques (insémination intra-utérine, fécondation in-vitro ou ICSI).

La spermologie représente l'ensemble des explorations visant à déterminer les capacités fonctionnelles du sperme. Elle porte sur les spermatozoïdes, issus d'un processus complexe de formation au sein du parenchyme testiculaire (appelé spermatogénèse) et sur les sécrétions des différentes glandes annexes constituant le plasma séminal.

La spermatogénèse :

Dans le testicule, la spermatogénèse se déroule dans les tubes séminifères contenant les cellules de la lignée et les cellules somatiques (ou cellules de Sertoli). Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par du tissu conjonctif lâche au sein duquel sont disséminés des petits amas de cellules interstitielles, ou cellules de Leydig.

La spermatogénèse demeure le processus de différenciation qui à partir des cellules souches germinales aboutit à la production de spermatozoïdes. Elle comprend essentiellement 3 phases :

- une phase de prolifération à partir des cellules souches appelées spermatogonie.
- une phase de divisions méiotiques aboutissant à la formation de spermatides haploïdes.
- une phase de métamorphose de spermatides en spermatozoïdes appelées spermiogénèse.

Au cours de la méiose, la cellule germinale appelée spermatocyte I passe par 6 stades successifs (pré-leptotène, leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse) correspondant aux différentes étapes de spiralisation des chromosomes.

La spermiogénèse concerne la réorganisation du noyau, la formation de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi et la mise en place des structures flagellaires. En microscopie optique six types de spermatides ont été distingués en fonction de la forme du noyau, de l'aspect de la chromatine et de la morphologie générale de la cellule : Sa et Sb1 (spermatides rondes); Sb2 et Sc (spermatides en élongation); Sd1 et Sd2 (spermatides matures).

La succession chronologique des différents stades de maturation depuis la première division goniale jusqu'au détachement des spermatozoïdes définit le cycle spermatogénétique, d'une durée fixe chez l'homme (74 jours).

Plasma séminal :

Le plasma séminal se constitue au moment de l'éjaculation par le mélange des sécrétions des glandes de Cowper (5%), de la prostate (20 à 40%), des épидидymes (10 à 20%) et des vésicules séminales (40 à 60%). Le plasma séminal joue un rôle essentiel sur le spermatozoïde en modifiant son état physiologique lui permettant ainsi de séjourner dans le tractus génital féminin et de prendre contact avec la zone pellucide de l'ovocyte une fois capacité. Le dosage de marqueurs spécifiques permet de déceler un dysfonctionnement des glandes annexes, responsable d'hypofertilité.

PATHOLOGIES RESPONSABLES D'INFERTILITÉ MASCULINE

On peut estimer que les problèmes d'infertilité touchent environ 14% des couples dans la population, la responsabilité directe de l'homme apparaissant dans 20% des cas et celle des deux membres du couple approchant le chiffre de 39%. Les facteurs étiologiques peuvent être regroupés dans divers cadres nosologiques.

Les causes génétiques :

Elles sont plus facilement suspectées lorsqu'il existe une notion d'infertilité dans la fratrie.

1-Les azoospermies ou oligospermies sécrétoires congénitales :

- La forme la plus fréquente est représentée par le syndrome de Klinefelter, dysgénésie testiculaire atteignant 1,5 à 2 pour mille nouveaux-nés masculins. L'anomalie chromosomique 47 XXY provoque une atrophie constante des tubes séminifères et une lésion des cellules de Leydig très variable d'un sujet à l'autre. La faible taille des testicules est le seul signe clinique absolument constant.



– Des **remaniements des autosomes** comme les inversions, les marqueurs surnuméraires, les translocations réciproques équilibrées ou Robertsoniennes provoquent un blocage des derniers stades de la spermatogénèse. Le spermogramme révèle généralement une oligozoospermie sévère ou plus rarement une azoospermie, le phénotype du sujet étant le plus souvent normal.

– Les **anomalies du chromosome Y** induisent une azoospermie sécrétoire. L'étude des anomalies de structures (délétions Yq-, chromosomes en anneaux ou translocations Yq- autosome) a permis la mise en évidence, au niveau du bras long du chromosome Y, d'un facteur AZF (Azoospermia Factor) dont le rôle essentiel est le développement d'une spermatogénèse normale. Les techniques de biologie moléculaire ont permis de subdiviser le facteur AZF en trois locus (AZFa, AZFb, AZFc) et d'identifier de très nombreux gènes candidats dont le gène DAZ (Deleted Azoospermia), codant pour une protéine de liaison à l'ARN. Des études récentes montrent une incidence élevée des microdélétions du gène DAZ dans la population d'hommes infertiles. Ces microdélétions se traduisent le plus souvent par une altération profonde de la spermatogénèse (azoospermie ou oligozoospermie extrême).

La recherche d'une délétion de DAZ doit être systématique avant la réalisation d'une micro-injection, étant donné le risque de transmission de l'anomalie à la descendance. Elle sera proposée pour tout patient présentant une azoospermie (ou oligozoospermie extrême) sans étiologie retrouvée.

2- L'anomalie excrétoire congénitale :

– L'**absence congénitale des déférents** (CBVAD : Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens) est une cause relativement fréquente d'infertilité masculine touchant entre 1 et 2% des hommes consultant pour ce motif. Elle est associée très fréquemment à une mutation du gène codant pour la protéine CFTR (Cystis Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator) responsable de la mucoviscidose.

Le gène CFTR est un gène de grande taille localisé sur le bras court du chromosome 7 et possédant une structure introns-exons assez complexe. Les mutations pouvant affecter le gène sont multiples et classées en 4 types, la plus fréquente étant la mutation DF508.

- 50% des sujets atteints CBVAD sont porteurs d'une mutation isolée du gène CFTR.

- 15 à 20 % sont porteurs de deux mutations différentes, respectivement sur **chacun de** leurs chromosome 7 (hétérozygotes composites).

Il est important également d'étudier la séquence polymidique impliquée dans les phénomènes d'épissage. Elle se présente sous différentes formes dans la population générale à savoir une succession de 5T, 7T ou 9T, avec une fréquence respective de 5%, 84% et 11%. Un variant 5T aboutit à la formation d'un transcript tronqué dans 90% des cas avec synthèse cependant d'une protéine CFTR efficace. Par contre la présence concomitante d'une ou deux mutations et de l'allèle 5T suffit à rendre compte de l'absence de canaux déférents chez les patients.

A l'heure actuelle il est possible de détecter grâce à des techniques relativement simples une trentaine de mutations ce qui représente environ 90% des mutations existantes. En cas de recours aux techniques d'Assistance Médicales à la Procréation, le dépistage doit être effectué impérativement chez la partenaire. En effet la probabilité pour un couple de transmettre une mucoviscidose est élevée, quand la femme est porteuse hétérozygote d'une mutation (risque de 1/25 dans la population générale). Environ un couple sur 30, consultant pour une agénésie des déférents présente un risque de 25%, de transmettre l'anomalie à chaque grossesse.

Les causes endocriennes :

L'insuffisance testiculaire est secondaire à une lésion hypothalamique ou hypophysaire. Les causes hypothalamiques sont représentées classiquement par le syndrome de Kallmann de Morsier (dysplasie olfactogénitale) qui associe une atrophie des bulbes olfactifs et un déficit complet en LHRH. L'insuffisance androgénique complète s'accompagne de signes cliniques spécifiques (patient macroskèle, absence de pilosité faciale, micropénis, testicules mous de petites tailles).

Les atteintes hypophysaires sont plus globales et associent souvent un déficit en TSH, ACTH et GH.

Elles font rechercher l'existence de tumeurs (adénomes) ou l'existence d'une hémachromatose. Un bilan hormonal complet permettra de déterminer avec précision le niveau lésionnel.

Les causes infectieuses :

Les hypofertilités d'origine infectieuse se manifestent sous différentes formes :

- * une azoospermie sécrétoire après orchite bilatérale (d'origine ourlienne)

- * une azoospermie excrétoire par atteinte épididymo-déférentielle bilatérale secondaire à une orchépididymite à Chlamydiae, germes banaux ou d'origine tuberculeuse.

- * une oligoasthénospermie par infection chronique du tractus génital.

Les mécanismes de ces atteintes sont multiples :

- * altérations tissulaires épithéliales et modification du plasma séminal qui en résulte (prostatite, vésiculite chronique).

- * diminution de la mobilité des spermatozoïdes, liée ou non à la formation d'anticorps anti-spermatozoïdes.

- * production de radicaux libres (endogène ou exogène).

La pathogénicité des radicaux libres a été montrée par des études récentes : induction de la peroxydation lipidique des acides gras de la membrane des spermatozoïdes et formation de métabolites toxiques sur la mobilité des gamètes (diminution de l'AMPc intraflagellaire) ou sur l'intégrité de la chromatine (fragmentation de l'ADN).



APPORT DU LABORATOIRE

dans le diagnostic des infertilités d'origine masculine :

Le premier examen demandé dans le cadre d'une infertilité est un test post coïtal, qui permet d'évaluer, après un rapport sexuel, le comportement des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femme.

Le test post coïtal (test de Hühner) est réalisé 9 à 24 heures après le rapport sexuel, programmé dans une période proche de l'ovulation (2 à 3 jours avant la date présumée de l'ovulation). Le prélèvement chez la femme est effectué à 3 niveaux : cul de sac postérieur vaginal, exocol et endocol. La qualité du mucus cervical est définie selon 5 paramètres (volume, viscosité, filance, cristallisation en feuille de fougère et cellularité). Une lecture au microscope détermine le nombre de spermatozoïdes mobiles dans chaque prélèvement. Un test de Hühner est positif lorsqu'on observe, au niveau de l'endocol, au moins 10 spermatozoïdes mobiles progressifs par champ (grossissement 400). Un test négatif, ou faiblement positif nécessite la réalisation d'un spermogramme afin d'évaluer plus précisément les différents paramètres spermatiques.

Le spermogramme est réalisé après un délai d'abstinence court, de 3 à 5 jours. Les différents paramètres étudiés ainsi que leurs normes respectives figurent dans le tableau I

Il est important d'analyser la mobilité des spermatozoïdes selon 4 classes : la mobilité progressive rapide, la mobilité progressive lente, la mobilité non progressive et l'absence de mobilité. La mobilité progressive est un paramètre important. Une valeur supérieure à 50% permet au spermatozoïde d'exercer son pouvoir fécondant de manière optimale.

Le spermocytogramme, indissociable du spermogramme, étudie la morphologie des spermatozoïdes après la coloration d'un frottis sur lame. Il détermine les pourcentages de spermatozoïdes normaux (formes typiques) et anormaux (formes atypiques), après évaluation minimale de 100 cellules. Les anomalies intéressent, de manière isolée ou associée, la tête, la pièce intermédiaire ou le flagelle. La classification des anomalies peut-être réalisée selon les critères définis par David ou Krüger. La classification de David considère qu'un sperme normal contient au moins 30% de formes atypiques. La classification de Krüger est intéressante puisqu'elle a permis de déterminer une valeur seuil de 4% de formes typiques, au dessous de laquelle les chances de succès en fécondation in vitro sont nettement diminuées.

Une anomalie décelée au spermogramme (et/ou au spermocytogramme) impose impérativement un contrôle 3 mois après le premier prélèvement, en raison de la durée de la spermatogenèse (74 jours).

La présence de cellules rondes dans l'éjaculat doit conduire à leur identification différentielle (leucocytes, macrophages, ou cellules de la lignée germinale). Le test à la peroxydase permet de déceler les polynucléaires neutrophiles. Une leucospermie (taux de leucocytes supérieur à 1 million/ml) est évocatrice d'une infection du tractus uro-génital et nécessite la pratique d'un bilan infectieux (spermoculture, uroculture avant et après massage prostatique, et/ou prélèvement urétral).

La spermoculture permet de rechercher des agents infectieux responsable d'hypofertilité. Elle comprend de manière systémique la recherche de germes banaux dont *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasmes*,

mais également de parasites comme *T. Vaginalis*. La numération des colonies obtenues après isolements sur milieux spécifiques admet au seuil au delà duquel la bactérie est considérée comme pathogène : $5 \cdot 10^3$ UFC pour les entérobactéries, *Haemophilus* ou *Streptocoques* β Hémolytiques; 10^4 UFC pour les bactéries saprophytes comme les *Staphylocoques* coagulase négative ou les *Corynébactéries*.

L'interprétation des résultats est souvent difficile en raison d'une contamination fréquente du prélèvement par les bactéries de l'urètre antérieur. D'autres anomalies peuvent évoquer une infection du sperme sans pour autant être pathognomoniques (asthénospermie, prédominance de flagelles enroulés).

La recherche de *Chlamydia trachomatis* fait l'objet d'une demande spécifique s'inscrivant dans le cadre d'un bilan de stérilité ou celui d'une insémination intra-utérine. La technique la plus sensible est une technique de biologie moléculaire, la polymérase chaîne réaction (PCR). Cependant la mise en évidence de *Chlamydia trachomatis* est rendue difficile par l'existence fréquente d'inhibiteurs dans le plasma séminal. Une recherche par PCR sur premier jet d'urine permet de pallier à ces difficultés d'interprétation.

La visualisation d'agglutinats dans le sperme (attachement de spermatozoïdes mobiles entre eux) doit faire rechercher la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes.

Anticorps anti-spermatozoïdes caractérisent les infertilités d'origine auto-immune. Ils peuvent être formés suite à une infection des voies génitales (urétrite, prostatite, orchépididymite) ou à un traumatisme accidentel (ou chirurgical) avec atteinte testiculaire et/ou section des voies éférentes. La recherche des anticorps doit porter initialement sur les spermatozoïdes (méthode directe).

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles porteurs d'anticorps est déterminé grâce à l'agglutination de particules de latex (MAR test) ou de billes recouvertes d'anti-immunoglobulines (test aux immunobilles). Les tests sont positifs quand ce pourcentage dépasse 20%.

Il est important de noter le site de fixation de ces anticorps (tête, pièce intermédiaire ou flagelle), une liaison au niveau de la tête pouvant limiter considérablement la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide. Un pourcentage de spermatozoïdes mobiles, porteurs d'anticorps, supérieur à 50% diminue considérablement les chances de grossesse spontanée et justifie la mise en oeuvre d'une AMP.

Une recherche directe positive doit conduire à une recherche indirecte (mise en évidence des anti-corps anti-spermatozoïdes circulant librement dans le sérum et dans le plasma séminal).

La technique la plus utilisée est la technique des immunobilles qui permet de déterminer le type des anticorps (IgG, IgA ou IgM) ainsi que la topographie de fixation.

La recherche indirecte peut également être réalisée chez la femme dans le sérum et le mucus cervical. Il est important de dépister de tels anticorps puisqu'ils peuvent interférer sur de nombreuses étapes du processus de fécondation. Les anticorps présents



dans les sécrétions cervicales lient les spermatozoïdes à la trame glycoprotéique du mucus, empêchant leur migration. Les anticorps sériques peuvent transsuder dans le liquide folliculaire et gêner l'interaction des gamètes mâles avec le complexe ovocytaire. La présence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le mucus est respectée devant un test de Hühner faiblement positif avec tendance à l'immobilisation des spermatozoïdes (mobilité sur place dite mobilité "shaking").

Il est possible d'évaluer les effets délétères des anticorps anti-spermatozoïdes, grâce à des tests d'interaction mucus cervical/spermatozoïdes, réalisés au laboratoire (test de pénétration croisée).

Le test de pénétration croisée (TPC) permet de tester, in vitro, le comportement des spermatozoïdes dans le mucus cervical. La glaire préovulatoire

transférée dans un capillaire est mise en contact avec une suspension de spermatozoïdes du conjoint. Le test évalue la diffusion des spermatozoïdes selon 3 critères : l'intensité représentant le nombre de spermatozoïdes ayant migré, la progression définie par la plus grande distance parcourue par les spermatozoïdes dans le capillaire et la mobilité observée après 1 heure d'incubation. Les résultats sont interprétés en fonction de ceux obtenus après interactions "témoins" (glairé de la patiente avec sperme témoin, sperme du conjoint avec glaire témoin). Une lecture est également réalisée après la 4ème heure afin de déterminer la survie des spermatozoïdes.

Le TPC est également indiqué en cas de test de Hühner faiblement positif afin de déterminer la responsabilité féminine ou/et masculine des anomalies observées.

EXPLORATIONS en vue d'Assistance Médicale à la Procréation :

Le test le plus fréquemment utilisé en vue d'une AMP est **le test de migration survie**. Il consiste à sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles contenus dans l'éjaculat. En fonction de la qualité initiale du sperme, différentes techniques sont proposées : migration ascendante (ou "swim up"), gradient de densité (Pure Sperm) ou simple lavage en cas de sperme très altéré. Le nombre de spermatozoïdes sélectionnés permet de déterminer les indications thérapeutiques : insémination intra-utérine, fécondation in vitro ou micro-injection (ICSI). Un consensus est en faveur des seuils suivants :

Après sélection :	Orientations thérapeutiques
> 1 million de spermatozoïdes mobiles	IIU (insémination intra-utérine).
entre 0,5 et 1 million de spermatozoïdes mobiles	FIV (fécondation in vitro).
entre 0,2 et 0,5 million de spermatozoïdes mobiles	FIV (technique micro-gouttes)
< 0,5 million de spermatozoïdes mobiles	ICSI (microinjection)

Ces orientations sont définies d'un point de vue purement masculin, les indications pouvant être modifiées en cas de pathologie tubaire ou de dysfonctionnement ovarien associés.

Deux paramètres sont également étudiés après sélection : la morphologie des spermatozoïdes et leur survie après incubation de 24 heures dans un milieu de culture approprié. Une morphologie très perturbée après sélection peut orienter le couple directement en ICSI, surtout si les atypies prédominent sur la structure acrosomale. Une mobilité faible à 24 heures (<50% de la mobilité progressive observée immédiatement après sélection) est un facteur de mauvais pronostic témoignant d'un pouvoir fécondant altéré du spermatozoïde.

La présence de très nombreuses atypies portant sur l'acrosome peut conduire à l'analyse de la **réaction acrosomique**. Cette étude permet d'analyser in vitro la capacité des spermatozoïdes à effectuer leur réaction acrosomique, avant et après addition d'un agent inducteur comme le ionophore calcique. Le pourcentage de spermatozoïdes ayant "réagi" est déterminé grâce à l'utilisation de lectines fluorescentes comme la Pisum sativum agglutinine

marquant la matrice acrosomique du spermatozoïde. Ce pourcentage est normalement faible à l'état basal (<5%). Il augmente en présence du ionophore (<20%). Des résultats anormaux laissent supposer une incapacité des spermatozoïdes à pénétrer dans l'ovocyte. Il est important de noter que ce test ne respecte pas entièrement les conditions physiologiques, à savoir que la réaction acrosomique s'effectue après fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide.

L'absence totale de spermatozoïde dans l'éjaculat (azoospermie) doit induire une exploration approfondie afin de déterminer d'origine excrétoire de l'anomalie (voir arbre décisionnel).

L'azoospermie n'est plus synonyme de stérilité définitive, de nombreuses grossesses ayant été obtenues après injection de spermatozoïde épидидymaire ou testiculaire dans l'ovocyte. Le dosage des marqueurs séminaux et des hormones hypophysaires permet de diagnostiquer une anomalie des voies d'éjaculation ou une pathologie endocrinienne. En cas d'atteinte primitive du testicule la biopsie testiculaire est l'élément fondamental.

La biopsie testiculaire est soumise actuellement à deux types d'analyse : une étude histologique qui détermine l'origine de l'atteinte gonadique et un geste de dilacération, réalisé dans un laboratoire spécialisé de Biologie de la Reproduction. Ce geste est très important puisqu'il permet de potentialiser les chances de visualiser des spermatozoïdes matures au sein du testicule. En effet aucun paramètre clinique (taille des testicules) ou hormonal (dosage de FHS) ne permet de prédire avec certitude la présence ou non de spermatozoïdes dans le parenchyme testiculaire. Les résultats d'une équipe belge sont éloquentes : la dilacération a isolé des spermatozoïdes testiculaires dans 36,2% des cas d'azoospermies à FSH très élevée (>30 UI/ml) et dans 31,3% des cas d'azoospermies avec examen histologique négatif.

La dilacération est réalisée essentiellement à visée thérapeutique (micro-injection du spermatozoïde testiculaire directement dans l'ovocyte). Elle peut être également réalisée dans un cadre diagnostique. Les spermatozoïdes testiculaires isolés sont cryoconservés et utilisés au cours d'un cycle de stimulation ultérieur.

B. STRAUB - H. SARMINI