

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2013

THESE N°

**Impact de la morphologie des spermatozoïdes, analysée par une  
méthode semi-automatisée, sur les résultats de fécondation in vitro  
classique et d'insémination intra-utérine.**

**Etude prospective au laboratoire d'AMP de l'hôpital mère-enfant de Limoges en 2012.**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE**

**du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

Présentée et soutenue publiquement le lundi 3 juin 2013

PAR

ROULET-COUDRIER BONNELIE Fanny

Née le 24 juillet 1982 à LIMOGES

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Madame le Pr YARDIN ..... - Président

Monsieur le Pr DUMAS ..... - Juge

Monsieur le Pr PARINAUD..... - Juge

Monsieur le Pr PREUX..... - Juge

Madame le Pr ROGEZ..... - Juge

Madame le Dr DELCLEVE-PAULHAC..... - Directeur de thèse

Monsieur le Dr PIVER ..... - Membre invité

CENTRE  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LIMOGES  
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2013

THESE N°

**Impact de la morphologie des spermatozoïdes, analysée par une méthode semi-automatisée, sur les résultats de fécondation in vitro classique et d'insémination intra-utérine.**  
**Etude prospective au laboratoire d'AMP de l'hôpital mère-enfant de Limoges en 2012.**

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**  
**Obtenu après soutenance du**  
**MEMOIRE**  
**du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**  
Présentée et soutenue publiquement le lundi 3 juin 2013

PAR  
ROULET-COUDRIER BONNELIE Fanny  
Née le 24 juillet 1982 à LIMOGES

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Madame le Pr YARDIN ..... - Président  
Monsieur le Pr DUMAS ..... - Juge  
Monsieur le Pr PARINAUD..... - Juge  
Madame le Pr ROGEZ ..... - Juge  
Monsieur le Pr PREUX ..... - Juge  
  
Madame le Dr DELCLEVE-PAULHAC..... - Directeur de thèse  
Monsieur le Dr PIVER ..... - Membre invité



UNIVERSITE de LIMOGES

FACULTE de MEDECINE

TITRES des PROFESSEURS et MAITRES de CONFERENCES des UNIVERSITES

<b>ABOYANS</b> Victor	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE
<b>ACHARD</b> Jean-Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>ADENIS</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE
<b>ALAIN</b> Sophie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>ALDIGIER</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE
<b>ARCHAMBEAUD</b> Françoise	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>ARNAUD</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>AUBARD</b> Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE Responsable de service
<b>AUBRY</b> Karine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L.
<b>BEDANE</b> Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE Responsable de service
<b>BERTIN</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE Responsable de service de RHUMATOLOGIE
<b>BESSEDE</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L. Responsable de service
<b>BONNAUD</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Doyen Honoraire

<b>BORDESSOULE</b> Dominique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service d'HEMATOLOGIE CLINIQUE et THERAPIE CELLULAIRE
<b>CHARISSOUX</b> Jean-Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>CLAVERE</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOTHERAPIE Responsable de service
<b>CLEMENT</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PSYCHIATRIE d'ADULTES Responsable de service
<b>COGNE</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE Responsable de service
<b>COLOMBEAU</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE
<b>CORNU</b> Elisabeth	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>COURATIER</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE Responsable de service
<b>DANTOINE</b> Thierry	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GERATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT Responsable de service
<b>DARDE</b> Marie-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE Responsable de service
<b>DAVIET</b> Jean-Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
<b>DESCAZEAUD</b> Aurélien	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE
<b>DESSPORT</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NUTRITION
<b>DRUET-CABANAC</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE et SANTE au TRVAIL Responsable de service
<b>DUMAS</b> Jean-Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE Responsable de service

<b>ESSIG</b> Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE Responsable de service
<b>FAUCHAIS</b> Anne-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>FEISS</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>FEUILLARD</b> Jean	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service du Laboratoire d'HEMATOLOGIE
<b>FOURCADE</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE INFANTILE Responsable de service
<b>FUNALOT</b> Benoît	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>GAINANT</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>GUIGONIS</b> Vincent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE
<b>JACCARD</b> Arnaud	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE
<b>JAUBERTEAU-MARCHAN</b> M. Odile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE
<b>LABROUSSE</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES Responsable de service
<b>LACROIX</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE VASCULAIRE
<b>LASKAR</b> Marc	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE Responsable de service Assesseur
<b>LIENHARDT-ROUSSIE</b> Anne	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE Responsable de service

<b>LOUSTAUD-RATTI</b> Véronique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEPATOLOGIE
<b>MABIT</b> Christian	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service d'ORTHOPEDIE-TRAUMATOLOGIE
<b>MAGY</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE
<b>MARQUET</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE Responsable de service
<b>MATHONNET</b> Muriel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>MELLONI</b> Boris	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Responsable de service
<b>MERLE</b> Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE
<b>MONTEIL</b> Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE Responsable de service
<b>MOREAU</b> Jean-Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROCHIRURGIE Responsable de service Assesseur
<b>MOULIES</b> Dominique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE INFANTILE
<b>MOUNAYER</b> Charbel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
<b>NATHAN-DENIZOT</b> Nathalie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANESTHESIOLOGIE-RENIMATION Responsable de service
<b>PARAF</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE Responsable de service
<b>PLOY</b> Marie-Cécile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE Responsable de service

<b>PREUX</b> Pierre-Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION Responsable de service du SIME Assesseur
<b>ROBERT</b> Pierre-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE Responsable de service
<b>SALLE</b> Jean-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION Responsable de service
<b>SAUTEREAU</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE Responsable de service
<b>STURTZ</b> Franck	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE Responsable de service
<b>TEISSIER-CLEMENT</b> Marie- Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
<b>TREVES</b> Richard	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RHUMATOLOGIE
<b>TUBIANA-MATHIEU</b> Nicole	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CANCEROLOGIE Responsable de service
<b>VALLAT</b> Jean-Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE
<b>VALLEIX</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service de CHIRURGIE DIGESTIVE et ENDOCRINIENNE Doyen
<b>VERGNENEGRE</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>VERGNE-SALLE</b> Pascale	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE
<b>VIDAL</b> Elisabeth	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE
<b>VIGNON</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier REANIMATION  Responsable de service



<b>VINCENT</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>VIROT</b> Patrice	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE Responsable de service
<b>WEINBRECK</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MALADIES INFECTIEUSES Responsable de service
<b>YARDIN</b> Catherine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE Responsable de service
<b>BUCHON</b> Daniel	Professeur des Universités MEDECINE GENERALE
<b>BUISSON</b> Jean-Gabriel	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>DUMOITIER</b> Nathalie	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>PREVOST</b> Martine	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>AJZENBERG</b> Daniel	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
<b>ANTONINI</b> Marie-Thérèse	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE Responsable de service
<b>BOURTHOUMIEU</b> Sylvie	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
<b>BOUTEILLE</b> Bernard	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
<b>CHABLE</b> Hélène	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>DURAND-FONTANIER</b> Sylvaine	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE
<b>ESCLAIRE</b> Françoise	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>HANTZ</b> Sébastien	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

<b>LAROCHE</b> Marie-Laure	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE
<b>LE GUYADER</b> Alexandre	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>MARIN</b> Benoît	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>MOUNIER</b> Marcelle	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE
<b>PICARD</b> Nicolas	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
<b>QUELVEN-BERTIN</b> Isabelle	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
<b>TERRO</b> Faraj	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>MENARD</b> Dominique	Maître de Conférences associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>BONNETBLANC</b> Jean-Marie	Professeur des Universités Emérite
<b>DENIS</b> François	Professeur des Universités Emérite
<b>SAUVAGE</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités Emérite
<b>VANDROUX</b> Jean-Claude	Professeur des Universités Emérite

LE 15 JANVIER 2013

UNIVERSITE de LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**  
1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences  
2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

**PROFESSEURS** :

<b>BENEYTOU</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CHULIA</b> Albert (jusqu'au 8/10/2012)	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique (jusqu'au 28/02/2013)	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ODART</b> Nicole (surnombre à compter du 19.12.2011)	PHARMACOLOGIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES :**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE

**MOREAU** Jeanne  
IMMUNOLOGIE

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-

**POUGET** Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**SIMON** Alain

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

**TROUILLAS** Patrick

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET  
INFORMATIQUE

**VIGNOLES** Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET  
INFORMATIQUE

**PROFESSEUR :**

**ROUMIEUX** Gwenhaël

ANGLAIS

**ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

**IMBERT** Laurent

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

## REMERCIEMENTS

### **A notre Maître et Président de thèse**

**Madame le Professeur Catherine Yardin,**

Professeur des Universités de Cytologie et Histologie

Praticien Hospitalier, Responsable de service de Cytogénétique

Vous nous faites le très grand honneur de présider cette thèse.

Je vous remercie pour la formation que vous m'avez dispensée et pour tout le temps et l'intérêt que vous m'avez accordés.

Je vous remercie très sincèrement pour votre gentillesse et garderai un excellent souvenir de mon passage en cytogénétique.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **A nos Maîtres et Juges**

**Monsieur le Professeur Jean-Philippe Dumas**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Responsable de service d'Urologie

Nous vous remercions de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Nous sommes honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir initiée à la médecine et de m'avoir guidée tout au long de mes études. Je vous remercie pour votre gentillesse ainsi que pour m'avoir accordé votre confiance pour ce que vous avez de plus précieux.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Jean Parinaud**

Professeur des universités, praticien hospitalier

Biologie de la reproduction

Nous vous remercions de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de venir à Limoges pour juger ce travail.

Nous sommes honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Pierre-Marie Preux**

Professeur des Universités-Praticiens Hospitalier

Epidémiologie, Economie de la santé et Prévention

Nous vous remercions de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Nous sommes honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Je vous remercie très sincèrement pour le temps que vous m'avez consacré ainsi que pour vos réponses rapides à toutes mes questions.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Madame le Professeur Sylvie Rogez,**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Responsable de service de Virologie

Nous vous remercions de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Nous sommes honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre service et je garde un très bon souvenir de mon passage en virologie. Je vous remercie très sincèrement pour votre disponibilité ainsi que pour vos précieux conseils tout au long de mon internat.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.



**Madame le Docteur Sophie Delclève-Paulhac**

Praticien hospitalier

Biologie de la reproduction

Je vous remercie pour votre encadrement attentif et votre disponibilité tout au long de ce travail.

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre service et de m'avoir initiée sur le plan pratique et théorique à la biologie de la reproduction.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Pascal Piver**

Praticien hospitalier, chirurgien des hôpitaux

Biologie de la reproduction

Nous vous remercions de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Nous sommes honorés de votre présence dans notre jury de thèse.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**A mon papa**, à toi ce papa que je n'ai pas vraiment connu mais qui m'a transmis l'envie d'apprendre, ce travail t'est dédié.

**A mes parents, pour la chance d'avoir des parents aussi merveilleux**

**A toi ma maman** sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, je n'y serais jamais arrivée sans toi. Pour m'avoir apporté autant d'amour avec autant de force et pour les valeurs que tu m'as inculquées. Merci pour ton soutien sans faille dans n'importe quelle circonstance et pour avoir toujours cru en moi. A notre complicité.

**A toi papounnet**, qui a su t'insérer dans ma vie comme une évidence et pour m'avoir aimée comme ta fille, merci pour ta patience, pour ton calme et ton soutien. Merci pour tes silences apaisants et tous tes heuheuheu! Je suis très fière d'être ta fille. Merci pour ton aide précieuse pour ma thèse.

**A Loïs**, mon bébé, mon amour, à ton courage et à ta force de vivre qui m'ont donné une belle leçon de vie, à tes sourires permanents qui me portent chaque jour.

**A Sylvain**, mon frère tant attendu, à notre complicité malgré notre différence d'âge, merci d'être l'opposé de moi c'est-à-dire zen en prenant la vie comme elle vient. A nos délires que seuls nous deux comprenons. Je regrette que tu ne sois pas là mais je sais que tu penses très fort à moi quelque part en Espagne. Merci de m'avoir fait découvrir le mode justifié!!!

**A Sébastien**, pour avoir cru en moi et en mon parcours un peu atypique sans jamais me juger. Merci de m'avoir demandé mon numéro de téléphone un soir de garde aux urgences! Pour toutes les épreuves que nous avons déjà vécues ensemble mais aussi aux très bons moments...et je sais qu'il y en aura d'autres car je crois en notre bonheur à trois...

**A mamie**, Joyeux anniversaire...pour ton amour et pour avoir attendu tout ce temps en me disant « mais quand est-ce que tu vas finir tout ça ? »...merci d'être là aujourd'hui, c'est très important pour moi.

**A tonton et marraine**, mes deuxièmes parents, pour tout ce que vous m'avez apporté pendant ces 30 années, pour m'avoir tant de fois emmenée en vacances et pour m'avoir fait découvrir plein de choses dont les fraises aux beaujolais.

**A ma Emilie**, ma sœur, mon amie, ma bouée de sauvetage quand je coule, toujours les bons mots aux bons moments. A toutes nos joies, nos peines, nos tisanes, nos interminables discussions toujours très passionnantes (ou pas !) pendant toutes ces années d'études. N'oublie pas : ne stressez pas pour l'examen !!!

**A ma Aurélie**, pour ton amitié. Merci de tant me donner sans jamais attendre de retour. Merci pour ta simplicité, ta joie de vivre, ta spontanéité et de m'avoir tant fait rire. J'aurai tellement aimé que tu sois à mes côtés pendant toutes ces années mais que de chemin parcouru, que de souvenirs et de moments partagés avec toi.

**A ma Claire**, merci d'être mon amie, merci pour ta gentillesse et pour tous les bons moments passés ensemble : à nos soirées à faire la fête ou...à réviser ! Merci de m'avoir attendue pour passer ta thèse !

**A Noël et Dominique**, pour m'avoir si bien accueillie dans votre famille, merci pour toute l'aide que vous nous avez apportée cette année et pour les bons petit plats de Dominique.

**A Dominique et Jean-Jacques**, pour avoir toujours veillé avec bienveillance sur maman et moi.

**A Patrice et Karima**, mes supers voisins, pour votre disponibilité. Merci Karima pour ton soutien.

**A Adeline**, tout simplement thank you!!!

A toutes les personnes de **la famille et aux amis de la famille** qui m'ont soutenue de près comme de loin et qui ont cru en moi pendant toutes ces années.

**A tous mes amis**, merci à tous d'être nos amis de Limoges, de Lyon ou de La Rochelle et merci de ne pas m'en vouloir d'avoir été très peu disponible tout au long de cette (ces) année (s)...on va se rattraper !

**A tous mes cointernes** avec qui nous avons passé de bons moments Coralie, Laure, Aurélie, Céline, Jennifer, Jasmine, Ana, Dominique, Fabrice, Marc, Isabelle, Alison, Vincent, Adam, David et Raphaëlle.

**A toute l'équipe du service d'AMP** du CHU de Limoges (sages-femmes, secrétaires et médecins) pour votre accueil dans le service. A Jean-Christophe pour le plaisir de travailler avec vous. Un grand merci particulier à Marie-Claire, Malvina et Dimitri pour votre patience et pour m'avoir transmis votre passion pour l'AMP. Merci pour tout ce que vous m'apprenez chaque jour et pour m'avoir beaucoup aidée pour ma thèse.

**A toute l'équipe de parasitologie** du CHU de Limoges, merci de m'avoir initiée avec patience à la biologie médicale, j'ai une pensée émue pour Martine.

**A toute l'équipe d'hématologie et de biochimie** du CHU de Limoges. Merci pour votre disponibilité, vos conseils à tous et à toutes. Je ne prendrai pas le risque de citer les noms au risque d'en oublier mais je garde un très très bon souvenir de mon internat parmi vous.

**A toute l'équipe de bactériologie/virologie** même si mon deuxième passage a été très court, je garde un souvenir ému de mon stage dans le service avec une équipe compétente, pédagogue et humaine (techniciens et chefs) avec qui j'ai beaucoup appris. Merci pour tous les kilos pris en salle de repos!

**A toute l'équipe de cytogénétique** pour votre accueil et votre gentillesse. Je garderai un très bon souvenir de mon passage. Merci à Irène et Marie-Line pour leur immense soutien et leur encouragement quotidien ainsi que pour leurs relectures...

**A Nicolas**, pour ton soutien et ton optimisme.

**A Renaud** pour ton aide précieuse pour la bibliographie et pour avoir toujours répondu à mes S.O.S. même pendant tes vacances, merci infiniment.

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

## PARTIE 1. GENERALITES DE LA FERTILITE ET DE L'INFERTILITE

- I. LA FECONDATION NATURELLE
  1. LA GAMETOGENESE
  2. LE SPERMATOZOIDE
  3. L'EJACULATION
  4. MIGRATION DES SPERMATOZOIDES DANS L'APPAREIL GENITAL FEMININ
  5. FECONDATION
- II. DEFINITIONS ET EPIDEMIOLOGIE DE L'INFERTILITE
  1. QUELQUES DEFINITIONS
  2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES
- III. BILAN DE L'INFERTILITE
  1. GENERALITES
  2. ANALYSE DU SPERME
- IV. MORPHOLOGIE SPERMATIQUE ET REVUE DE LA LITTERATURE
  1. INTRODUCTION
  2. SPERMOCYTOGRAMME : LES DEBUTS
  3. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
  4. CASA ET REVUE DE LA LITTERATURE
  5. VALEUR PREDICTIVE DE LA MORPHOLOGIE SPERMATIQUE DANS L'IIU
  6. VALEUR PREDICTIVE DE LA MORPHOLOGIE SPERMATIQUE DANS LA FIV
  7. VALEUR PREDICTIVE DE LA MORPHOLOGIE SPERMATIQUE DANS L'ICSI

## PARTIE 2. ETUDE

- I. MATERIELS ET METHODES
- II. RESULTATS
- III. DISCUSSION

## CONCLUSION

## INTRODUCTION

L'assistance médicale à la procréation (AMP) anciennement appelée Procréation Médicalement Assistée (PMA), est l'ensemble des moyens et des techniques mis en œuvre pour pallier à l'hypofertilité voire à la stérilité d'un ou des deux membres du couple. Historiquement, c'est en 1978 en Angleterre qu'est née Louise Brown, le « premier bébé éprouvette » après une fécondation in vitro (FIV). Quatre ans plus tard naissait en France Amandine et avait lieu la première naissance suite à un transfert d'embryon congelé. Enfin en 1992, une technique révolutionnaire est mise au point pour le traitement des infertilités masculines : la FIV avec microinjection du spermatozoïde ou ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection).

En France, l'AMP est strictement encadrée par la loi ; En 1994 est votée la loi de bioéthique, révisée en juillet 2004 (art.L.2141) puis en juillet 2011 qui encadre la pratique de l'AMP. Selon l'article L. 152-1 du Code de la santé publique, "l'assistance médicale à la procréation s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception in vitro, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle, ainsi que toute technique d'effet équivalent permettant la procréation en dehors du processus naturel".

l'article L. 152-2 fixe les conditions requises pour l'accès à l'AMP : "l'homme et la femme formant le couple doivent être vivants, en âge de procréer, mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans consentant préalablement au transfert d'embryons ou à l'insémination" et reconnaît deux fonctions à l'AMP : "répondre à la demande parentale d'un couple dont l'infertilité a un caractère pathologique médicalement diagnostiqué ; éviter la transmission à l'enfant d'une maladie d'une particulière gravité". La notion de deux ans de vie commune a été supprimée lors de la dernière révision des lois de bioéthique en 2011.

5 à 10 % des couples éprouveraient des difficultés à avoir des enfants et seraient réellement infertiles. Cependant, le nombre de couples consultant pour ce problème à un moment ou à un autre de leur vie est plus important : aujourd'hui 15 à 20 % en France. Selon la société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE), 350.000 bébés sont désormais conçus par FIV chaque année dans le monde, soit 0,3% des 130 millions d'enfants qui naissent chaque année dans le monde. Depuis la naissance du premier bébé éprouvette, Louise Brown, en 1978, 5 millions d'enfants sont nés par FIV.

L'analyse du sperme fait partie du bilan initial de routine pour les couples consultant pour une infertilité. Les différents paramètres spermatiques sont étudiés lors de cette analyse afin de pouvoir évaluer le pouvoir fécondant du sperme et permettre, entre autre, la prise en charge adaptée des couples infertiles. Parmi les paramètres spermatiques, la morphologie spermatique a longtemps été identifiée dans de nombreuses études comme un des paramètres, sinon le paramètre ayant le plus d'intérêt clinique. Cependant, le réel potentiel de ce paramètre a été remis en cause au cours des dernières années. En effet, les variations entre les différents systèmes de classification et des protocoles de préparation du sperme ainsi que le caractère subjectif de l'analyse morphologique ont conduit à une grande variabilité inter- et intra laboratoire. Des méthodes semi-automatisées d'analyse de la morphologie du sperme ont été développées pour réduire une partie significative de ces biais.

La prise en charge des couples pour lesquels l'origine de l'infertilité est une tératozoospermie isolée est très controversée. La conduite à tenir face à une tératozoospermie isolée n'est pas claire et les différences de prises en charge existent en fonction des centres.

Depuis sa création en 1997 le laboratoire d'AMP de Limoges utilise la classification de David pour la réalisation du spermocytogramme comme la plupart des laboratoires français mais la classification recommandée par la 5<sup>ème</sup> édition de l'OMS en 2010 est la classification selon les critères dits stricts mise au point par Kruger et son équipe en 1986.

Par ailleurs nous avons constaté dans notre laboratoire une augmentation progressive mais nette de la proportion d'ICSI réalisée par rapport aux FIV concernant les tératozoospermies isolées. Dans notre centre, jusqu'en 2012, la morphologie était un critère important dans le choix de la technique : sur une tératozoospermie isolée modérée à sévère lorsque le taux de FT était inférieur à 15% évalué avec la classification de David, une ICSI était réalisée quel que soit les autres paramètres spermatiques (seuil décidé au sein du laboratoire selon la pratique du centre).

En Janvier 2012, nous avons décidé de modifier nos critères de décision pour la prise en charge des couples. A l'instar d'autres laboratoires français une ICSI est maintenant réalisée lorsque le nombre de spermatozoïdes mobiles après capacitation est inférieur à 1 M/ml ou lorsqu'il est entre 1 et 2 M/ml avec un taux de FT  $\leq$  4%. Les couples dont le conjoint avait une tératozoospermie isolée ont bénéficié d'une FIV en première intention.

Au même moment, nous avons changé de classification de la morphologie et nous avons utilisé les critères stricts de Kruger pour cette évaluation (classification la plus utilisée au niveau mondial) avec l'arrivée du Hamilton Thorne Research ou IVOS, système semi-

automatisée d'analyse de la morphologie spermatique. Cette décision était consécutive à la thèse du docteur Béguet qui montrait dans notre laboratoire entre 2003 et 2006 que la morphologie spermatique selon la classification de David ne nous permettait pas de nous affranchir de variations inter observateurs.

L'objet de cette thèse est d'évaluer l'impact de la morphologie du sperme, analysée par la méthode semi-automatisée en critères stricts avec le Hamilton Thorne Research, sur les résultats de FIV classique et d'inséminations intra-utérines (IIU), sur une période donnée dans le laboratoire d'AMP de l'hôpital de la mère et de l'enfant de Limoges.

Dans un premier temps, seront présentés des rappels de physiologie, les causes d'infertilité, et les examens diagnostiques de l'infertilité. La seconde partie correspond à l'analyse statistique de l'étude prospective réalisée dans notre centre d'AMP de Limoges sur l'année 2012.



**GENERALITES DE LA FERTILITE  
ET DE L'INFERTILITE**

## **PARTIE 1 : GENERALITES DE LA FERTILITE ET DE L'INFERTILITE**

### **I. La fécondation naturelle**

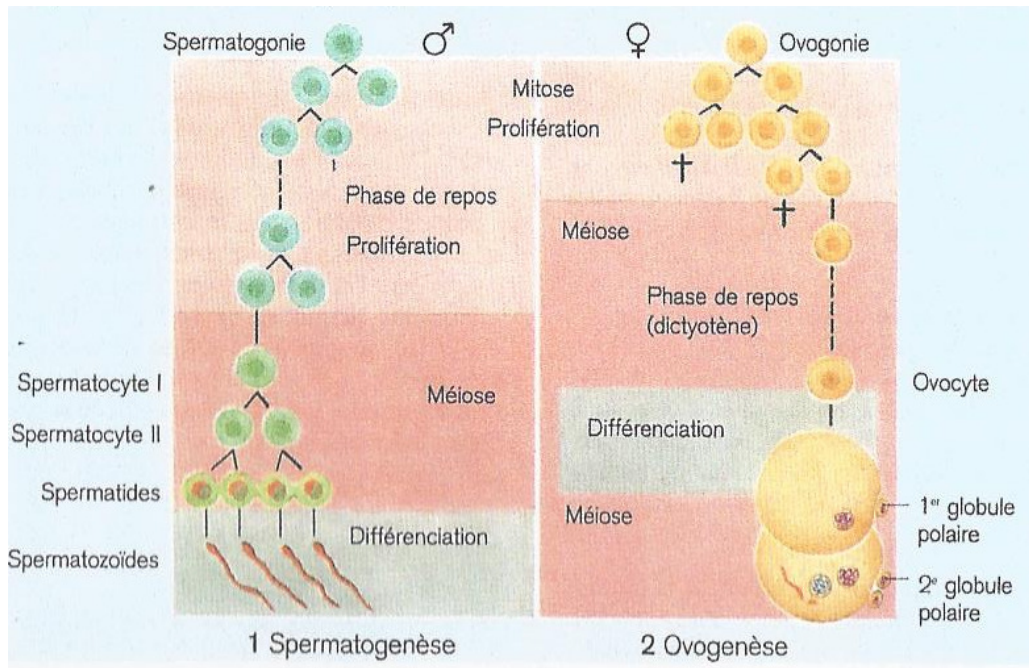
Dans ce chapitre seront rappelés le déroulement normal de la gamétogenèse versant masculin et de la fécondation. L'origine des paramètres spermatiques, en particulier de la morphologie des spermatozoïdes, est importante à connaître afin de comprendre leurs potentielles conséquences sur la fertilité.

#### **1. La gamétogenèse**

La gamétogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir de cellules souches, aboutit à la production de gamètes haploïdes. Il s'agit de la spermatogenèse chez l'homme pour la formation des spermatozoïdes et de l'ovogenèse chez la femme pour la formation des ovocytes.

L'ovogenèse est définie comme l'ensemble des processus formation-croissance-différenciation, qui transforment la cellule germinale initiale ou ovogonie en une cellule apte à être fécondée, l'ovocyte II (bloquée en métaphase de deuxième division méiotique). Son déroulement se fait de façon discontinue, sur plusieurs années, et il est limité dans le temps du fait de l'épuisement de la réserve ovarienne.

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui transforme la cellule germinale en spermatozoïdes (gamète mâle mûre). C'est un processus continu qui se déroule toute la vie à partir de la puberté.

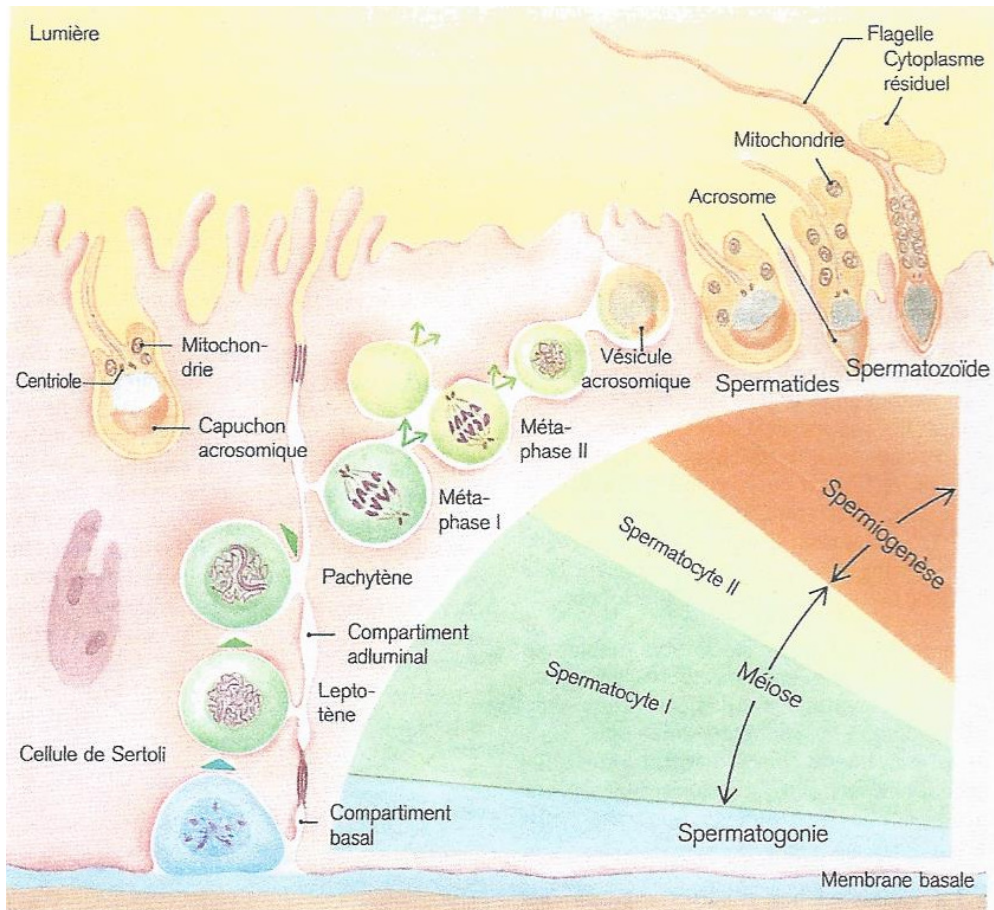


**Figure 1-1. Le développement des gamètes mâles et femelles D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994.**

Dans ce travail, seule la spermatogenèse sera traitée.

## 2. La spermatogenèse

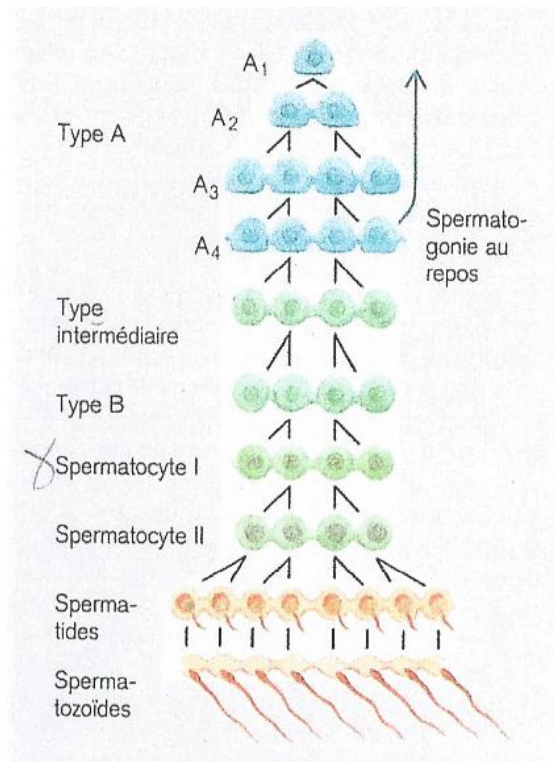
Débutant à la puberté, la spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, aboutit à la production de spermatozoïdes haploïdes. La spermatogenèse se déroule au sein du testicule dans l'épithélium des tubes séminifères en association avec les cellules de Sertoli. Trois familles de cellules germinales disposées en couches superposées entre la membrane basale et la lumière du tube séminifère sont impliquées dans la spermatogenèse : Les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. À chaque type cellulaire correspond une phase du processus spermatogénétique (figure 1-2).



**Figure 1-2. La spermatogenèse**

**D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994.**

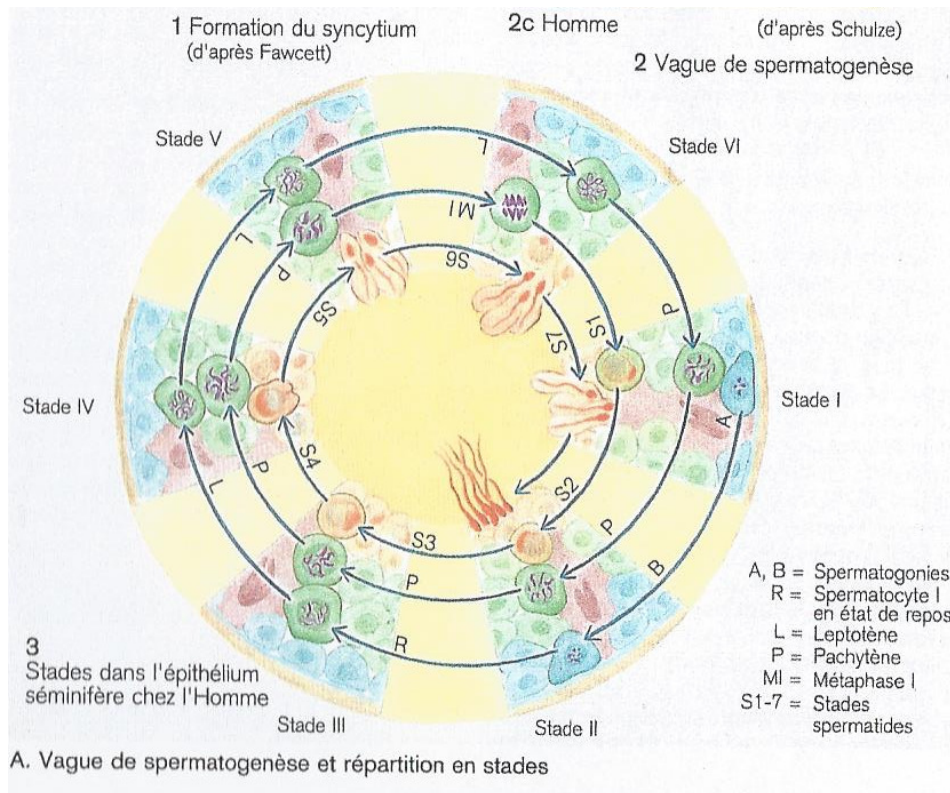
Ainsi, dans la première phase, les spermatogonies se divisent par mitoses, se renouvellent pour maintenir un pool de cellules souches et simultanément donnent naissance à des gonies différenciées puis des spermatocytes (figure 1-3). Lors de la deuxième phase, les spermatocytes se divisent au cours de la méiose. Après deux divisions cellulaires successives avec réduction de moitié du nombre des chromosomes et ségrégation des chromosomes sexuels, les spermatocytes donnent naissance aux spermatides. Enfin, au cours d'une troisième phase qui correspond à la spermiogenèse, les spermatides se différencient progressivement en spermatozoïdes.



**Figure 1-3. Les étapes de la spermatogénèse**

**D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994.**

Le testicule assure également une fonction endocrine par les cellules de Leydig, avec l'élaboration des hormones androgènes testiculaires, en particulier la testostérone. La production de spermatozoïdes et d'androgènes se déroule dans deux compartiments testiculaires séparés et sous la dépendance d'hormones adénohypophysaires. Il existe également un cycle de l'épithélium séminal, où l'ensemble des cellules souches de renouvellement d'une région entière de l'épithélium entre en spermatogénèse périodiquement et à intervalles réguliers, tous les 16 jours. Toutes les spermatogonies issues de ces cellules souches sont reliées par des ponts cytoplasmiques et évoluent en groupe car elles effectuent leur spermatogénèse de manière synchrone. Ainsi, au sein de l'épithélium séminal, les différentes générations de cellules germinales disposées en couches superposées, forment un certain nombre d'association cellulaire de composition constante définissant six stades numérotés de I à VI (figure 1-4).



**Figure 1-4. Les vagues de spermatogenèse et la répartition en stades dans l'épithélium**  
**D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994.**

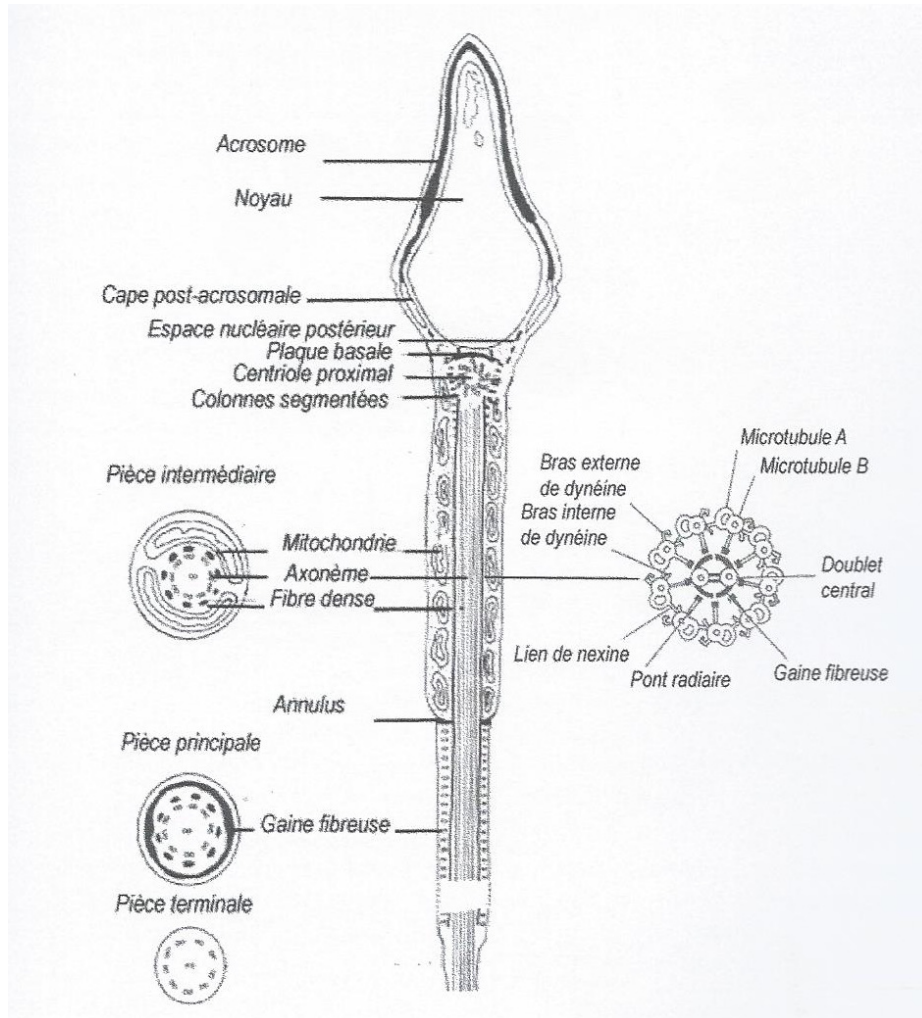
Les spermatozoïdes, une fois sécrétés dans la lumière des tubes séminifères par spermiation, sont transportés passivement dans le rete testis avec le liquide produit par les cellules de Sertoli, puis dans l'épididyme par les canaux efférents. Ils acquièrent dans l'épididyme leur mobilité. Les spermatozoïdes sont mis en réserve dans la queue de l'épididyme et résorbés s'il n'y a pas d'éjaculation. Le transport par l'épididyme dure de 10 à 14 jours.

La durée de la spermatogenèse est constante, de l'ordre de 74 jours chez l'homme. La production journalière de spermatozoïdes qui est de l'ordre de 200 millions en moyenne, diminuera avec l'âge.

Le spermatozoïde est une cellule allongée d'environ 60  $\mu\text{m}$  de long. En microscopie optique, on distingue :

- La **tête**, contenant le noyau coiffé de l'acrosome ;
- Le **flagelle**, séparé de la tête par le col et comprenant une pièce intermédiaire, une pièce principale et une pièce terminale.

L'étude de la structure du spermatozoïde en microscopie électronique montre un noyau qui occupe la plus grande partie de la tête. L'acrosome forme un sac autour de la partie antérieure du noyau et se poursuit par la cape post-acrosomale (figure1-5).



**Figure 1-5. L'ultrastructure du spermatozoïde**  
 D'après biologie de la reproduction humaine éditions Sauramps médical, J-C. Czyba et A. Montella, 1993.

### **3. L'éjaculation**

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes, via le canal déférent, vont se mélanger au plasma séminal (celui-ci est constitué par sécrétion des glandes annexes, des vésicules séminales et de la prostate). Ils sont alors en contact avec les prostasomes (vésicules d'origine plasmique riche en cholestérol). Ce cholestérol va s'inclure dans la membrane plasmique des spermatozoïdes et diminuer sa fluidité et les mouvements moléculaires dans la membrane. L'ensemble de ces mécanismes va entraîner un blocage des aptitudes fécondantes du spermatozoïde nécessaire pour préserver le pouvoir fécondant jusqu'au contact de l'ovocyte.

### **4. Migration des spermatozoïdes dans l'appareil génital féminin**

Après l'éjaculation, les spermatozoïdes subissent dans les voies génitales féminines une étape de maturation appelée capacitation, au cours de laquelle ils acquièrent la capacité de féconder l'ovocyte.

La capacitation commence dès le passage des spermatozoïdes dans la glaire cervicale. Cela permet d'une part l'élimination de protéines de décapacitation qui recouvraient les spermatozoïdes et d'autre part l'élimination du plasma séminal. Le milieu devient pauvre en cholestérol et la membrane plasmique devient alors plus fluide, voire instable et fusogène : des mouvements protéiques membranaires mettent alors à jour des récepteurs. Ainsi les spermatozoïdes capacités :

- o Deviennent hypermobiles, facilitant ainsi la pénétration dans la zone pellucide
- o Ont la possibilité de rompre leur acrosome
- o Et ont des reconnaissances spécifiques aux protéines de la zone pellucide de l'ovocyte.

Après une première sélection des spermatozoïdes dans le mucus cervical où seuls les plus mobiles progressent, la traversée de l'utérus se fait par des contractions utérines. Dans l'isthme de la trompe, où quelques milliers de spermatozoïdes s'accumulent, des contractions tubaires induisent la libération successive de plusieurs dizaines de spermatozoïdes à la fois, qui progressent le long des trompes grâce à leur mobilité et aux contractions tubaires qui permettent également, mais en sens inverse, la migration des ovocytes ovulés, du pavillon à l'isthme. Au moment de la rencontre des deux gamètes, au



niveau du tiers supérieur de la trompe, quelques centaines de spermatozoïdes sont présents autour de l'ovocyte.

## 5. La fécondation

C'est la fusion de deux cellules haploïdes (le spermatozoïde et l'ovocyte), en une cellule unique, l'œuf fécondé ou zygote. Sa division, par de nombreuses mitoses, aboutira à la formation de l'embryon.

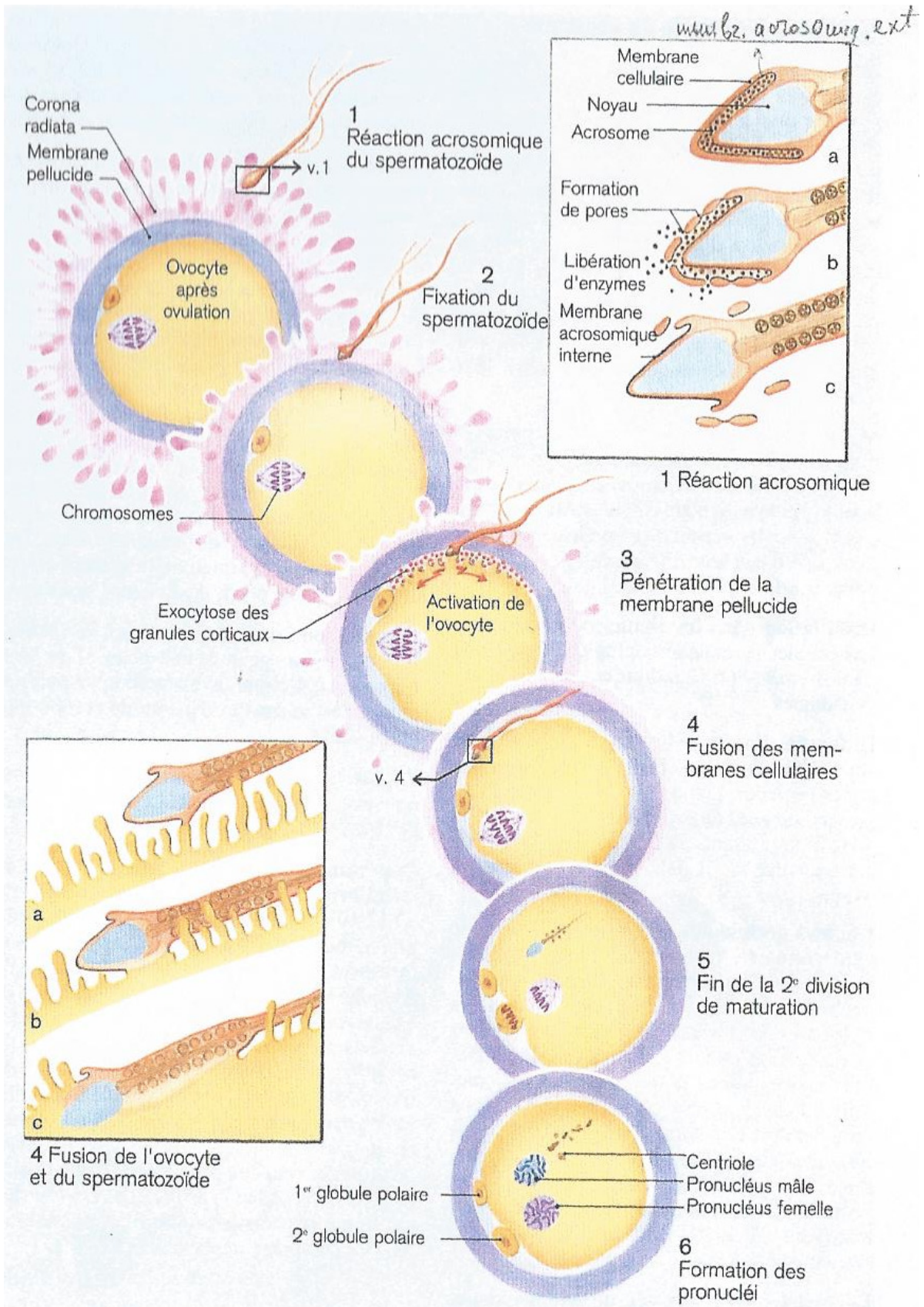
Les deux gamètes se rencontrent dans la trompe. L'ovocyte bloqué en métaphase II est entouré de la zone pellucide et de la corona radiata. Il n'a qu'une survie très courte de 8 à 10 heures pour permettre une fécondation normale. Les spermatozoïdes conservent leur pouvoir fécondant pendant deux à trois jours après l'éjaculation. Capté par le pavillon tubaire, l'ovocyte migre dans l'ampoule où il peut éventuellement rencontrer le spermatozoïde.

Les spermatozoïdes capités et hyperactivés s'accrochent à la zone pellucide (ZP). Cette liaison est spécifique. L'adhésion à la ZP entraîne la réaction acrosomique. C'est un phénomène calcium dépendant qui, par exocytose (fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe), libère les enzymes contenues dans l'acrosome. La hyaluronidase et l'acrosine libérées au moment de la réaction acrosomique facilitent le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide.

Après la réaction acrosomique, la membrane acrosomique interne se retrouve exposée et directement en contact avec la zone pellucide. Grâce au battement de flagelle hyperactivé, le spermatozoïde traverse cette enveloppe en suivant un trajet oblique.

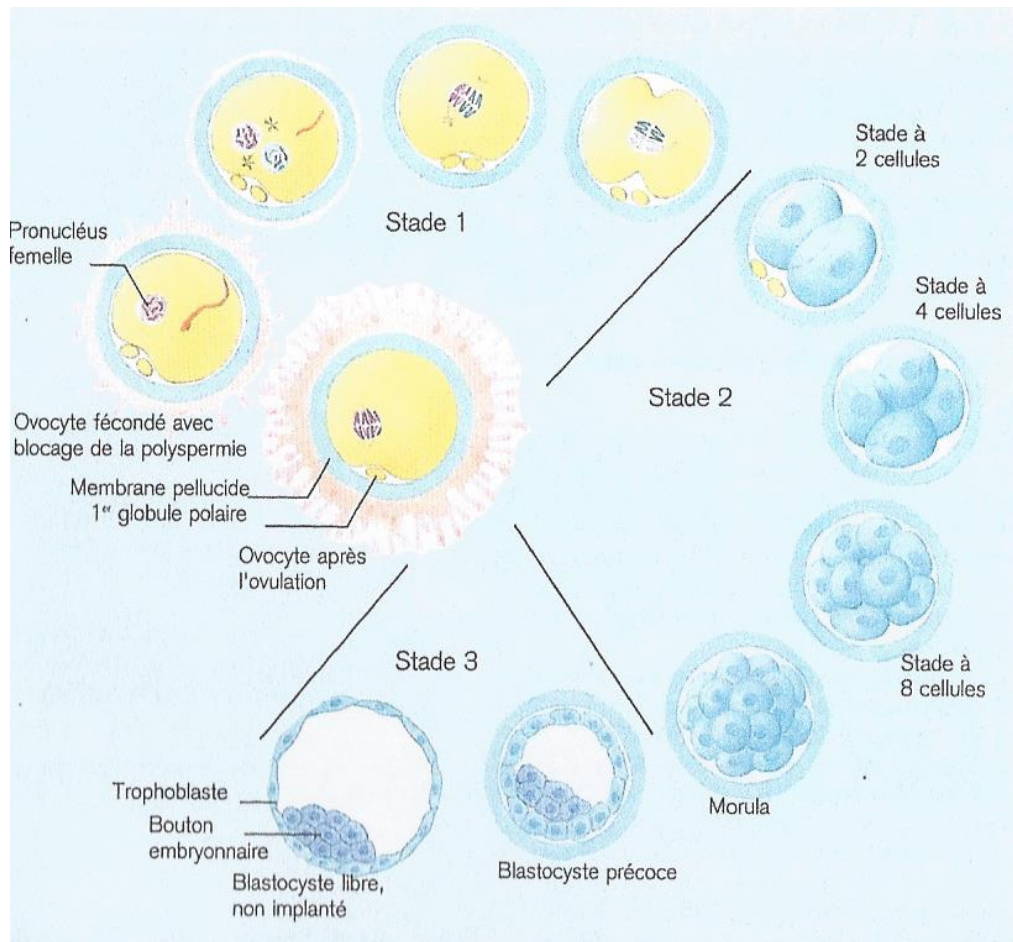
Il pénètre ensuite dans l'espace périvitellin et entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Il s'immobilise et les deux gamètes fusionnent. Cette fusion libère du calcium et active l'ovocyte : c'est la réaction corticale. Il y a une exocytose des granules corticaux, et libération d'enzymes hydrolytiques qui vont modifier la zone pellucide et la rendre imperméable à la pénétration d'autres spermatozoïdes et éviter ainsi la polyspermie.

L'ovocyte activé termine sa deuxième division méiotique avec expulsion du deuxième globule polaire et formation d'un *pronucleus* femelle (PN) haploïde à chromatine condensée. Parallèlement à la formation du *pronucleus* femelle, le spermatozoïde est phagocyté. Son enveloppe nucléaire disparaît et la chromatine est décondensée.. Un *pronucleus* mâle (PN) apparaît presque en même temps que le *pronucleus* femelle, entouré d'une nouvelle enveloppe nucléaire et de taille semblable. Les *pronuclei* se trouvent dans la zone corticale de l'ovocyte 12 heures après le début de l'activation et une réplication d'ADN a lieu dans chaque *pronucleus*. Ensuite, ils migrent l'un vers l'autre au centre de l'œuf, guidés par des microfilaments du cytoplasme (stade à 2 PN). À ce stade, l'ovocyte fécondé est nommé zygote (figure 1-6). Les deux noyaux se placent l'un au contact de l'autre. Chaque noyau entre en prophase : les chromosomes apparaissent et le fuseau de division s'organise. Après destruction des enveloppes nucléaires, les chromosomes se placent sur le fuseau et forment la plaque équatoriale. Cette présence simultanée sur le fuseau des chromosomes maternels et paternels marque la fin de la fécondation (stade à 0 PN) et le début du développement embryonnaire (figure 1-7).



**Figure 1-6. La fécondation**

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994.



**Figure 1-7. Le développement de l'ovocyte en blastocyste**  
 D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

## II. Définitions et épidémiologie de l'infertilité

### 1. Quelques définitions

#### 1-1. Fertilité et infertilité

- La fertilité est l'aptitude à procréer. L'infertilité est l'incapacité à procréer et peut être :
  - **Primaire**, c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui n'a jamais eu de grossesse.
  - **Secondaire**, c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui a déjà eu une grossesse.
- Tous les degrés de fertilité sont possibles. Certains couples sont :
  - Très fertiles : ils pourront procréer très facilement ;
  - Moyennement fertiles : ils pourront procréer facilement ;
  - Peu fertiles (hypofertilité modérée) : ils peuvent procréer difficilement ;
  - Très peu fertiles (hypofertilité sévère) : ils ne peuvent procréer que difficilement
  - Infertiles ou stériles : ils ne peuvent pas procréer sans traitement.

#### 1-2. Fécondité et infécondité

La fécondité est le fait d'avoir procréé. L'infécondité est le fait de ne pas avoir procréé de façon volontaire ou involontaire.

Le concept est celui d'un état : avoir été impliqué (ou non) à un moment donné dans l'obtention d'une grossesse ou la naissance d'un enfant.

Selon l'OMS, l'infécondité est définie comme l'absence de survenue d'une grossesse après un an au moins de rapports sexuels réguliers non protégés. Cette définition demeure controversée pour ce qui est de la durée. La notion d'obtention de grossesse lors d'unions antérieures pour chacun des deux membres du couple est importante à savoir.

### 1-3. Fécondabilité

La fécondabilité exprime le degré de fertilité, c'est-à-dire le pourcentage de chance de procréer par cycle ; elle varie d'un couple à l'autre (figure 2-2) et se base sur la durée d'infertilité. L'âge de la femme est un facteur important puisque la fécondabilité passe de 25% par cycle à 20 ans, à une fécondabilité presque nulle après 45 ans.

### 1-4. Le délai nécessaire à concevoir

Le délai nécessaire à concevoir (DNC) est le temps qui s'écoule entre l'arrêt de toute contraception et l'obtention d'une grossesse. Le DNC dépend du taux de fécondabilité :

$$\text{DNC} = 1 / \text{fécondabilité} = 1/P$$

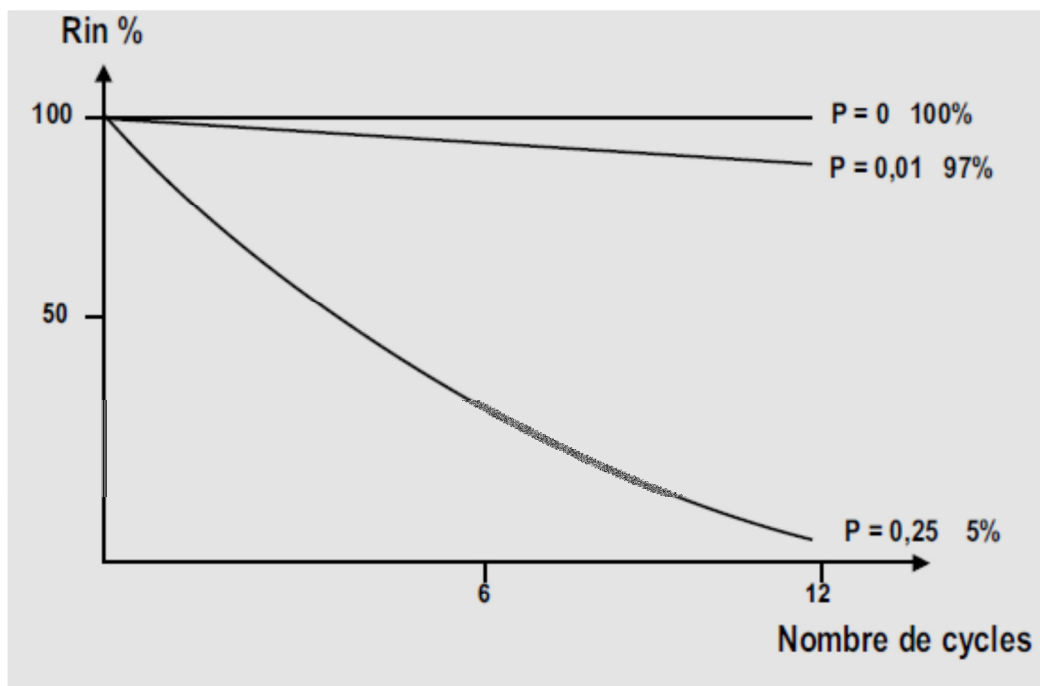


Figure 2-1. Risque de ne pas avoir conçu après n cycles pour les couples d'infertilité à 25%, 1% et 0%. Rin=risque d'être infécond. D'après Reproduction et développement édition Sauramps médical, C. Humeau, 2005.

- Pour  $P=0,25$  : 5% des couples n'ont pas procréé après un an.
- Pour  $P=0,01$  : 97% des couples n'ont pas procréé après un an.
- Pour  $P=0$  : 0% des couples ont procréé au bout d'un an.

Ainsi pour un taux moyen de fécondabilité de 25%, le DNC est alors de 4 cycles.

A titre d'exemple, avec un taux de fécondabilité de 1%, le DNC passe à 100 cycles, c'est à dire 8 ans. Classiquement, le DNC est considéré comme pathologique pour un délai supérieur à 2 ans, ce qui implique une prise en charge médicale. Cependant, la conduite à tenir est fonction de l'âge de la femme. Notons aussi que la fécondabilité est variable en fonction de la date des rapports ; elle est optimale à l'ovulation.

## **1-5. Stérilité**

Ce terme souvent employé à tort définit les rares situations où l'obtention d'une grossesse naturelle est impossible, par exemple dans les cas d'azoospermie (vérifiée sur au moins deux examens) et d'obstruction bilatérale des trompes.

## **2. Données épidémiologiques**

### **2-1. L'importance de l'infertilité**

L'infertilité n'est pas un problème de couple rare. Selon de récentes études, 10–15% des couples en Europe ont des difficultés à réaliser leur rêve d'être parent [1]. Un couple sur sept consulte en France pour infertilité, soit 60 000 nouveaux couples par an.

Le nombre absolu de couples infertiles augmente avec l'accroissement de la population. En 2010, d'après une étude mondiale de *Maya N. Mascarenhas et al. (2012)*[2], le nombre de couples infertiles dans le monde a été évalué à environ 48,5 millions.

L'observatoire épidémiologique de la fertilité en France s'est basé sur un échantillon de 867 femmes de 18 à 44 ans, sans contraception, avec des rapports sexuels réguliers, interrogées en 2007-2008 :

- 46% des couples n'ont pas obtenu de grossesse après 6 mois ;
- 24% après 12 mois ;
- 11% après 24 mois

Le pourcentage de couples sans grossesse après 1 an sans contraception est probablement de l'ordre de 15 à 25 % ce qui constitue un problème de santé non négligeable [3].

## 2-2. Les causes d'infertilité

### 2-2-A. Généralités

Parmi les causes d'infertilité :

- **33%** sont d'origine féminine ;
- **20%** sont d'origine masculine ;
- **Dans 39% des cas**, les deux membres du couple sont hypofertiles ;
- **Dans 8% des cas**, aucune cause n'est retrouvée et l'infertilité sera dite « inexpliquée » [4].

Il faut souligner que la fécondité baisse avec l'âge passant pour la femme de 25% par cycle à l'âge de 20 ans à un taux pratiquement nul à l'âge de 45 ans [5]. Il en est de même pour les hommes : s'ils ont plus de 45 ans, ils mettent cinq fois plus de temps à concevoir qu'à 25 ans [6]. On assiste à un recul de l'âge de la première grossesse en France, l'âge moyen à la maternité en 1977 était de 26,5 ans. Il atteint 28 ans en 2010 (figure 2-2). Les raisons principales sont notamment : la poursuite des études, la volonté de réussir professionnellement, d'atteindre un confort matériel suffisant, et les tentatives d'unions infructueuses. La proportion de couples réellement infertiles augmente avec la durée de l'infécondité. L'âge du désir du 1<sup>er</sup> enfant continue à augmenter.

Cela explique une part non négligeable des demandes d'assistance médicale pour infertilités dites « inexpliquées », liée à la baisse de la fertilité due à l'âge de l'homme et de la femme [7]. Ainsi, au moment de la première consultation, l'âge moyen des femmes est de 30 ans pour les infécondités primaires et de 32 ans pour les infécondités secondaires alors qu'il est pour les hommes respectivement de 32 ans et de 34 ans.



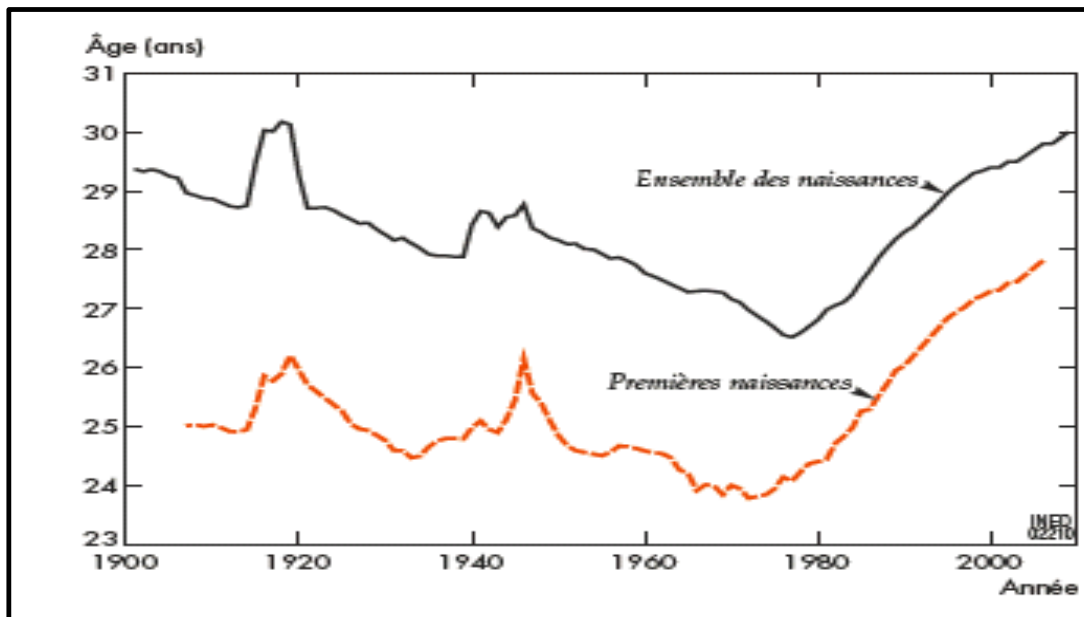


Figure 2-2 : âge moyen à la maternité (toutes naissances et premières naissances) (G. Pison, *Population & Sociétés*, n° 465, Ined, mars 2010)[8].

### 2-2-B. Causes d'infertilité chez la femme

D'après l'étude multicentrique menée en 1989 en France par l'INSERM (Institut national de la santé et de la recherche en France) [4], les causes principales d'infertilité sont répertoriées sur la figure ci-dessous :

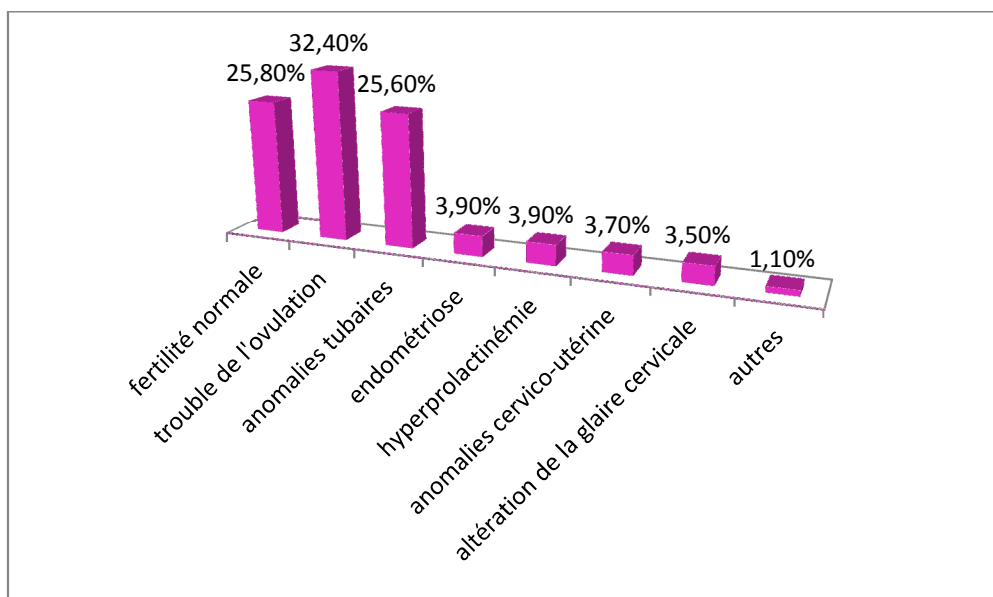


Figure 2-3. Diagnostics médicaux chez 1551 femmes de couples infertiles (Thonneau et al., 1991[4]).

Les étiologies de l'infertilité chez la femme sont répertoriées dans le tableau 2-1.

**Tableau 2-1. Les principales causes d'hypofertilité chez la femme**

Niveau de l'anomalie	Causes
Production des gamètes	Insuffisance ovarienne primitive
	Insuffisance ovarienne secondaire à une insuffisance gonadotrope (atteinte hypothalamique et/ou hypophysaire)
	Dysovulation : syndrome des ovaires polykystiques
Transit des gamètes	Malformations utéro-vaginales (syndrome distilbène)
	Niveau tubaire : anomalies séquellaires Salpingite (chlamydiae) Grossesse extra-utérine (GEU)
Glaire cervicale	Infection de la glaire
	Insuffisance de production
	Présence d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS)
Nidation	Anomalies chromosomiques de l'œuf
	Insuffisance du corps jaune
	Endomètre inapte, endométriose

❖ Facteurs de risque d'infertilité [9] :

- **L'âge maternel**

La fertilité est maximum vers 25 ans, diminue avec l'âge et devient quasiment nulle après 45 ans, avec une proportion anormalement élevée d'anomalies génétiques à partir de 38 ans. En FIV, la baisse de la production ovocytaire après 35 ans est d'environ 50 %. Il existe un vieillissement ovarien mais aussi de la muqueuse utérine qui devient moins propice à l'implantation. De plus, lorsque la réserve ovarienne est diminuée quel que soit l'âge de la patiente, la fertilité devient très faible : l'élévation du dosage de la FSH en début de cycle et un test de réserve ovarienne défavorable traduisent une mauvaise qualité ovarienne.

- **Les infections génitales**

Les risques d'obstruction tubaire sont particulièrement liés aux infections génitales à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (risque d'infertilité multiplié par 32).

- **Le tabac** : allonge le délai de conception et diminue la réserve ovarienne.
- **Les antécédents chirurgicaux** : appendicectomie et chirurgie pelvienne avec un risque d'infertilité multiplié par 5.

### 2-2-C. Causes d'infertilité chez l'homme

D'après cette étude multicentrique française [4], les principales anomalies du sperme en cause dans l'infertilité sont répertoriées sur la figure 2-4.

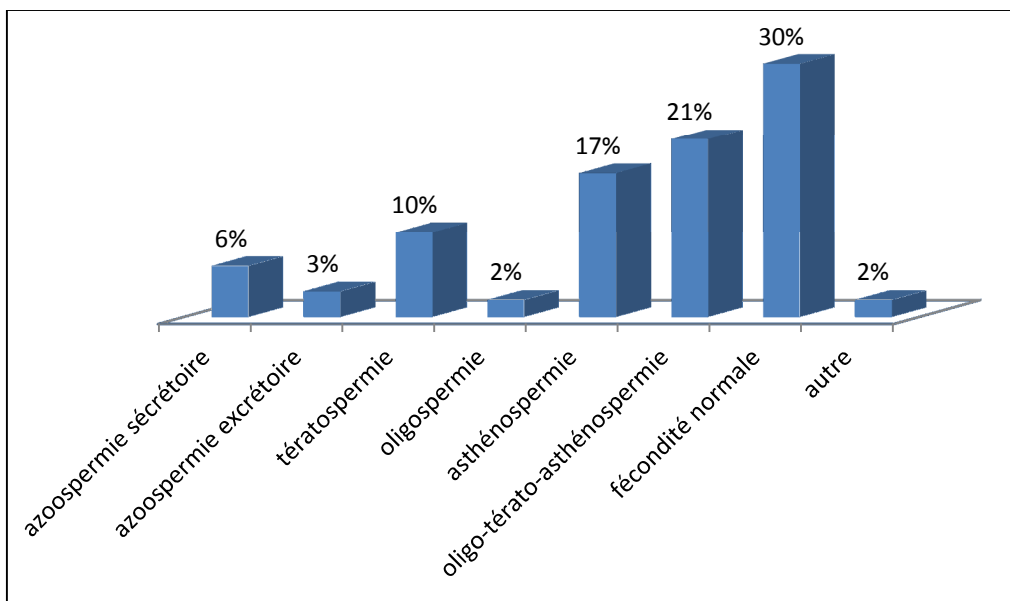


Figure 2-4. Anomalies du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité[4].

Les étiologies de l'infertilité chez l'homme sont répertoriées dans le tableau 2-2.

**Tableau 2-2. Les principales causes d'hypofertilité chez l'homme.**

Niveau de l'anomalie	Causes	
Production des gamètes	Nulle	<b>Azoospermie non obstructive :</b> -Cryptorchidie bilatérales -Orchite virale (oreillons) -Causes génétiques (Klinefelter)  <b>Azoospermie obstructive :</b> -Agénésie bilatérale vésico-déférentielle -Séquelles d'infection
	insuffisante	<b>Oligozoospermie :</b> -Cryptorchidie unilatérale -Causes hormonales -Prise de toxiques, de médicaments -Autoimmunisations (ACAS)
	anormales	Tératozoospermie
Transit des gamètes	<b>Azoospermie obstructive congénitale :</b> Agénésie bilatérale vésico-déférentielle	
	<b>Azoospermie obstructive acquise :</b> Séquelles d'infection	
Troubles de l'éjaculation :  Anéjaculation, éjaculation rétrograde	<b>Lésions neurologiques</b> (diabète, séquelles de chirurgie de la prostate, accident de la voie publique)	
	<b>Médicaments</b> (psychogènes par exemple)	

On distingue aussi des facteurs de risque d'infertilité chez l'homme [9]:

- **Des facteurs urologiques**

Les antécédents traumatiques, de torsion testiculaire uni- ou bilatérale, une cryptorchidie opérée ou non constituent un facteur de risque d'azoospermie (X5). La présence d'une varicocèle multiplie le risque d'oligoasthénozoospermie par 4. Les antécédents d'infection sexuellement transmissible (IST) multiplient le risque d'infertilité par 2.

- **Des facteurs liés au mode de vie**

L'absorption habituelle de toxiques (alcool, tabac, drogue) et la malnutrition (vitamines A, C, E, AA) entraînent d'une diminution de la numération spermatique. La spermatogenèse est aussi altérée par l'exposition prolongée à la chaleur et par la prise de certains médicaments et aux perturbateurs endocriniens (pesticides, bisphénol A, phtalates).

- **L'âge**

Ce facteur intervient mais de façon moins prépondérante que chez la femme : il existe une diminution du nombre de spermatozoïdes produits du fait de l'augmentation du tissu de soutien du testicule (albuginée principalement). Ces altérations spermatiques ne s'observent significativement qu'après 55 ans.

### III. Bilan de l'infertilité

#### 1. Généralités

Le bilan d'infertilité est une étape importante dans la prise en charge d'un couple infertile en vue d'une prise en charge en AMP. Aussi la question qui se pose est : quelle est la part respective des facteurs féminins et masculins contribuant à cette infécondité ? Les deux partenaires doivent être explorés de manière rationnelle et progressive. L'examen féminin est brièvement rappelé. Le bilan masculin sera ensuite détaillé, en particulier l'examen de la morphologie du sperme qui fait l'objet de ce travail.

La première consultation est recommandée après un an de rapports sexuels réguliers mais est à adapter en fonction de l'âge de la femme. Les délais peuvent être plus longs en fonction des régions (où l'accès à un gynécologue peut être plus difficile, FIVNAT 2010) et des temps d'explorations.

#### 1-1. Rappel du bilan féminin d'infertilité

Le bilan féminin d'infertilité est rappelé dans les tableaux 3-1 et 3-2 :

**Tableau 3-1. : Résumé du bilan féminin d'infertilité Interrogatoire et Examen clinique.**

<b>Interrogatoire</b>	Conduites addictives troubles du cycle algies pelviennes
	la fréquence des rapports sexuels,
	antécédents médicaux généraux antécédents obstétricaux -grossesses, IVG, IMG -DES (distilbène) syndrome -infections
	<b>Antécédents chirurgicaux abdominopelviens</b>
	<b>Traitements</b>
<b>Examen clinique</b>	Indice Masse corporel (IMC) Examen des seins Hirsutisme Examen au spéculum + toucher vaginal

**Tableau 3-2 : bilan féminins examens complémentaires**

<b>Des examens complémentaires</b>	<b>De 1<sup>ère</sup> intention</b> -courbe ménothermique -test post-coïtal -échographie pelvienne -bilan hormonal
	<b>De 2<sup>nde</sup> intention :</b> -hystérosalpingographie (HSG) -hystéroscopie -coélioscopie
	Cas très précis : -Caryotype -dosages immunologiques

## **1-2. Le bilan masculin d'infertilité**

Le bilan doit toujours débiter par un interrogatoire complet ce qui va permettre d'avoir une orientation vers une potentielle cause de l'infertilité. L'interrogatoire sera suivi d'un examen clinique et d'un examen du sperme en première intention (tableau 3-3). Des examens complémentaires seront demandés en fonction du contexte et des examens de première intention.

**Tableau 3-3 : bilan masculin d'infertilité : interrogatoire.**

<b>INTERROGATOIRE</b>	<b>Profession exposition :</b> -Toxiques -Chaleur -Herbicides -Pesticides -Perturbateurs endocriniens <b>Risques liés au style de vie</b> (conduites addictives, tabagisme, sédentarité, sommeil, stress...)
	<b>Antécédents médicaux :</b> -Pathologie générale (diabète, HTA, syndrome dépressif) -Oreillons <b>Géno-urinaires :</b> -Cure d'ectopie testiculaire, hernie inguinale, ablation de kyste -Cryptorchidie -Torsion testiculaire -Infection génitale -Varicocèle -Hydrocèle -Malformation uro-génitale (hypospadias)
	<b>Traitements</b> -En cours -Antécédents (dates, doses, durée) : chimiothérapie, radiothérapie
	<b>Evaluation de la fertilité :</b> -Personnelle -Familiare
	<b>Fréquence des rapports sexuels</b>



**Tableau 3-3 suite : bilan masculin d'infertilité : Examen clinique et examens complémentaires.**

<b>Examen clinique</b>	<b>Examen général :</b> -IMC -Evaluation de l'imprégnation androgénique (pilosité, gynécomastie) -cicatrices chirurgicales (orchidopexie, cure de hernie ...)
	<b>Examen urologique :</b> -Verge : taille, hypospade -Scrotum et testicules -Volume testiculaire -Palpation canaux déférents, épидидymes
<b>Examens biologiques et autres explorations</b>	<b>Spermogramme :</b> -Examen macroscopique : viscosité, volume, pH -Examen microscopique : numération, cellules rondes, agglutinats, vitalité, mobilité, spermocytogramme <b>Autres examens du sperme :</b> -Test de migration survie (TMS) ou test de capacitation des spermatozoïdes -Recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS) -Analyse bactériologique du sperme <b>Autres explorations (en fonction du contexte et de l'examen clinique) :</b> -Biochimie du plasma séminal -Dosages hormonaux -Echographie scrotale et endorectale -Examens génétiques (caryotype, biologie moléculaire, microdélétions du chromosome Y, mutation du gène CFTR) -Biopsie testiculaire avec analyse anatomo-pathologique -Recherche d'une éjaculation rétrograde, test de pénétration croisée in vitro, microscopie électronique

## 2. Analyse du sperme

### 2-1. Réalisation du spermogramme

Il s'agit de l'examen complémentaire de première intention. Différents paramètres peuvent interagir lors du cycle spermatogénétique (fièvre, prise médicamenteuse) et compte tenu de la durée de la production dans le testicule (74 jours) et du transit dans l'épididyme (14 jours), un délai de trois mois doit être respecté entre la réalisation de deux spermogrammes. Les méthodes de réalisation sont détaillées dans le manuel de l'OMS 2010 qui est la référence.

- Le recueil

Lors de la prise de rendez-vous le patient doit recevoir des informations claires sur les modalités du recueil. Il est impératif de recommander un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 5 jours avec un maximum de 8 jours sans éjaculation car les paramètres du sperme varient en fonction de l'abstinence sexuelle. Le recueil s'effectue au laboratoire.

- L'examen macroscopique

- La viscosité : le sperme est normalement liquéfié au bout d'une demi-heure.

- Le volume normal est supérieur à 1,5 ml (OMS 2010)[10]. L'OMS recommande la pesée de l'éjaculat dans son réceptacle. Il peut être directement mesuré à la pipette graduée.

- Le pH est compris entre 7,2 et 8. Inférieur à 7, il évoque une atteinte des vésicules séminales (sécrétions basiques). Supérieur à 8, il oriente vers une pathologie prostatique.

- L'examen microscopique

- La numération des spermatozoïdes (normale supérieure à 15 M/ml)

- Oligozoospermie si concentration inférieure à 15 M/ml
- Azoospermie si aucun spermatozoïde n'est retrouvé sur au moins deux spermogrammes à trois mois d'intervalle.

- la numération des cellules rondes (cellules urétrales, cellules de la lignée germinale et leucocytes).

En cas de cellules de la lignée germinale supérieure à 10% de la numération des spermatozoïdes, il peut exister un trouble de la spermatogenèse. Un taux de leucocytes supérieur à 5% est une leucospermie et évoque une infection.

- Les agglutinats incitent à rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS).

- La vitalité : La nécrospermie (moins de 58% de spermatozoïdes vivants) évoque une infection.

- La mobilité : selon la classification de la dernière édition 2010 de l'OMS, le pourcentage normal de spermatozoïdes mobiles progressifs rapides et lents (a+b) est

supérieur à 32% et supérieur à 40% de spermatozoïdes mobiles (a+b+c). En dessous c'est une asthénozoospermie.

Les valeurs normales des paramètres spermatiques sont récapitulées dans le tableau 3-4.

**Tableau 3-4 : Normes des paramètres spermatiques (OMS 2010)[10].**

Paramètres spermatiques	Normes OMS 2010
Volume	$\geq 1,5$ ml
Numération des spermatozoïdes (par ml)	$\geq 15$ millions/ml (M/ml)
Numération des spermatozoïdes (par éjaculat)	$> 39$ millions
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation.	Mobilité progressive a+b : $\geq 32$ % Mobilité a+b+c : $\geq 40$ %
Morphologie normale des spermatozoïdes	$\geq 4$ % (critères stricts)
Leucocytes	$< 1$ million/ml
pH	entre 7,2 et 8
Vitalité des spermatozoïdes	$\geq 58$ %

## 2-2. Le spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'appellation usuelle pour définir l'analyse morphologique des spermatozoïdes humains qui évalue les anomalies morphologiques et notamment le pourcentage de formes typiques (FT). Plusieurs classifications sont utilisées dans le monde. Nous détaillons dans ce chapitre la classification de David qui est encore utilisée en France et la classification de Kruger, classification internationale recommandée par l'OMS.

## 2-2.A. Classification de David (*David et al., 1975*)[11].

La méthode de David a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité masculine et a été publiée en 1975.

Cette classification comportait au départ treize anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. L'originalité de la méthode repose sur la prise en compte de toutes les anomalies observées grâce à un système de classification à entrées multiples : un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est défini par l'ensemble de ses anomalies c'est-à-dire qu'il figure plusieurs fois dans la grille de classement à chacune des anomalies concernées.

Depuis les années 1970, de nombreux laboratoires français, publics et privés, ont adopté cette classification, et à l'initiative de plusieurs biologistes, elle a été modifiée et améliorée au début des années 1990 par l'équipe de *Jouannet*[12] qui a introduit l'IAM (Indice d'Anomalies Multiples) puis par *Auger & Eustache, 2000*[13]. L'IAM est systématiquement calculé et représente le nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal (normal <1,6).

La classification de David a été largement utilisée et l'est encore en France. Le pourcentage de FT normal est supérieur à 30% dans cette classification. En dessous de ce seuil on parle de tératozoospermie.

La classification de David recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

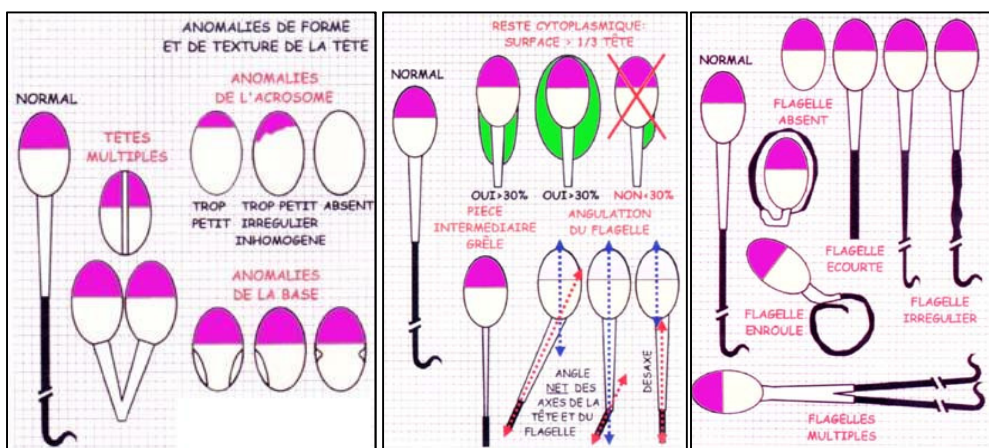
- **sept anomalies de la tête** : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, acrosome anormal ou absent et base (région postacrosomique) anormale.
- **Trois anomalies de la pièce intermédiaire (PI)** : reste cytoplasmique, PI grêle et PI angulée.
- **cinq anomalies de la pièce principale** : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulé et multiple.

-La **tête** a un contour très régulier ovalaire avec un grand axe mesurant 5µm et un petit axe mesurant 3µm. (rapport grand axe/petit axe=1,66). L'acrosome doit couvrir 40 à 70% de la surface de la tête, avoir un contour régulier et une texture homogène.

-La **pièce intermédiaire** normale peu visible en microscopie conventionnelle. Elle mesure 1,5 fois la longueur de la tête, a un diamètre de 0,6 à 0,8 µm. Son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête. Elle présente un contour régulier et une texture homogène.

-La **pièce principale**, c'est-à-dire le reste du flagelle mesure environ 45 µm (soit environ 10 fois la longueur de la tête), a un diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,5 µm et doit avoir un contour régulier et un aspect homogène.

**Figure 3-1 : Anomalies des spermatozoïdes : classification de David.**



## 2-2.B. Classification de Kruger (critères stricts)

### 2-2.B.1. Analyse manuelle

Une équipe de l'hôpital de Tygerberg (Afrique du Sud) a travaillé sur la morphologie des spermatozoïdes et a établi des critères stricts très précis pour l'évaluation de la morphologie du sperme.

La **classification de Kruger** (du nom de son inventeur) apporte des critères très stricts pour définir un spermatozoïde normal. Par ordre d'importance, l'anomalie est recensée d'abord sur la tête, puis viennent dans l'ordre les anomalies de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle. C'est la classification recommandée par l'OMS.

**La tête** doit être lisse, avec un contour régulier, ovalaire et symétrique. Elle mesure de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de grand axe et de 2,5 à 3,5  $\mu\text{m}$  de petit axe. La région acrosomique doit représenter entre 40 et 70% de la tête [14]. La région acrosomiale ne doit contenir aucune grande vacuole et pas plus de deux petites vacuoles qui ne doivent pas occuper plus de 20% de la tête du spermatozoïde. La région post acrosomique ne doit contenir aucune vacuole.

**La pièce intermédiaire** doit être mince, régulière et implantée dans l'axe médian de la tête du spermatozoïde. Elle mesure de 5 à 8  $\mu\text{m}$  et a une épaisseur de 0,5  $\mu\text{m}$ . Le résidu cytoplasmique est considéré comme anormal lorsqu'il est supérieur au tiers de la taille de la tête du spermatozoïde [15].

**La pièce principale** doit avoir un calibre uniforme sur toute sa longueur, plus mince que la pièce intermédiaire et mesure environ 45  $\mu\text{m}$  de long.

L'index de tératozoospermie (TZI) peut être calculé. Il correspond au nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde anormal. Une valeur supérieur à 1,46 va dans le sens d'une hypofertilité [14].

Trois groupes ont ainsi été individualisés en fonction du pourcentage de spermatozoïdes typiques et la valeur pronostic sur leur pouvoir fécondant [16-18]:

- FT > 14 % : sperme normal
- 4 % < FT < 14 % : groupe G-pattern (groupe de bon pronostic)
- FT < 4 % : groupe P-pattern (groupe de mauvais pronostic).

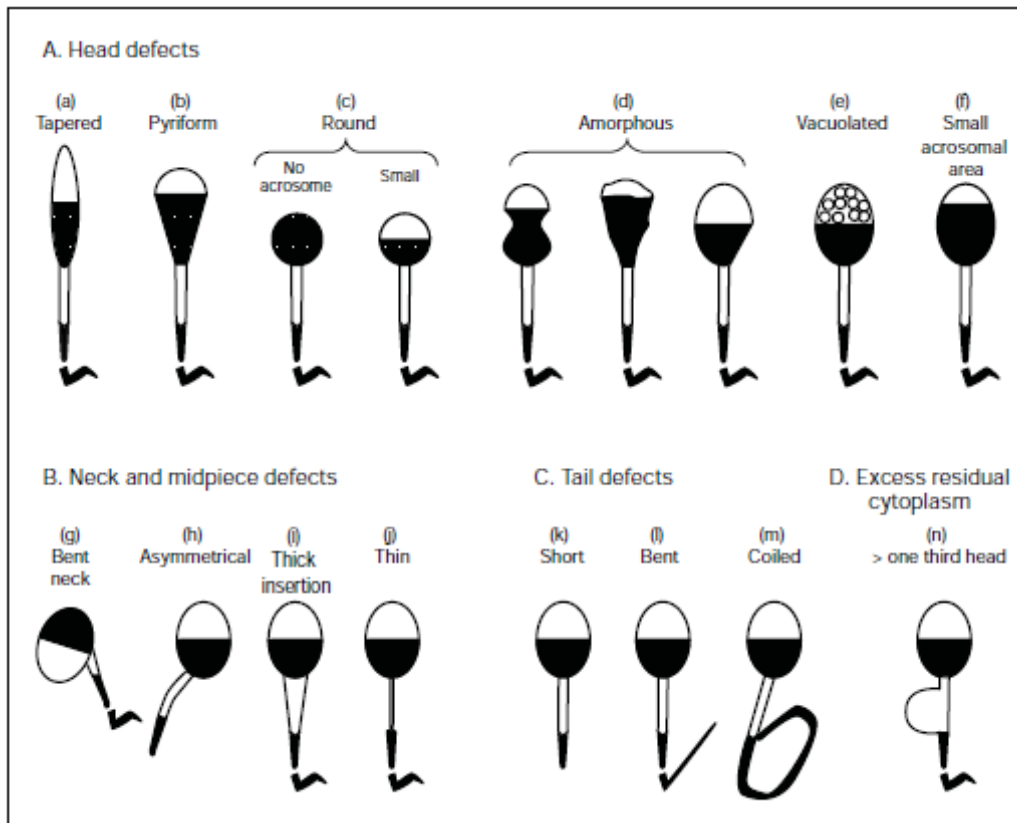


Figure 3.2 : Schémas de quelques anomalies des spermatozoïdes. (Extrait du manuel de l’OMS 2010).

### 2-2.B.2. Analyse semi-automatisée ou CASA (Computer-aided sperm analysis)

Le principe d’analyse d’images a le potentiel d’apporter des avancées majeures en terme de quantification, d’objectivité et de reproductibilité pour l’analyse de la morphologie spermatique. Plusieurs systèmes sont actuellement commercialisés. Ils réalisent l’analyse de la morphologie de la tête et de la pièce intermédiaire du spermatozoïde et parfois de la pièce principale. Le système CASA (Computer-assisted sperm analysis) classe généralement la tête et la pièce intermédiaire du spermatozoïde comme normale ou anormale. Le résultat donne aussi la moyenne des dimensions de la tête et de la pièce intermédiaire, l’ellipticité et la régularité de la tête ainsi que la mesure de l’aire de l’acrosome, cette dernière étant très dépendante de la qualité de la coloration (seules les colorations Diff-Quick ou de

Papanicolaou sont recommandées)[18]. Dans notre centre, nous utilisons le système commercialisé par Hamilton Thorne Research.

#### ❖ **Hamilton Thorne Research IVOS**

Parmi les systèmes qui existent, Le Hamilton Thorne Research IVOS (Système Optique Visuel Intégré) est l'un de ces automates qui ont été développés aux Etats-Unis. C'est le premier système à utiliser la méthode d'authentification électronique. Dans cette méthode, en plus de réaliser des mesures axiales, la forme du spermatozoïde est aussi mathématiquement mesurée pour déterminer la normalité du spermatozoïde (manuel d'utilisation Hamilton Thorne HTM-IVOS). Les paramètres utilisés par le logiciel sont les critères stricts validés par le Dr. Kruger lui-même.

- **HTM-DIMENSIONS** est le programme de morphologie de Windows. Il classe automatiquement les spermatozoïdes humains par analyse stricte.
- **L'IVOS** (Système Optique Visuel Intégré) est une combinaison optique/ordinateur avec le système optique et l'ordinateur dans la même unité.

La lame à analyser est insérée sur la platine du microscope, électroniquement placée au-dessus de la source lumineuse. L'illumination se fait à une longueur d'onde de 662 nm. L'observateur sélectionne une image contenant un spermatozoïde et fait la netteté sur le flagelle du spermatozoïde ainsi que le réglage de la luminosité. Au moins 200 spermatozoïdes par lame examinée sont étudiés à l'objectif 100 à immersion sous huile. Une cellule est classée par le logiciel selon trois catégories, normale, subnormale ou anormale. Le spermatozoïde anormal va être sous classifié en un certain nombre d'anomalies spécifiques (forme et taille de la tête, acrosome et flagelle). L'examineur sélectionne un certain nombre de champs afin d'obtenir le nombre nécessaire de spermatozoïdes. A la fin de l'analyse, l'examineur élimine les images non conformes (contours du spermatozoïde mal pris, tâches de colorant ou cellule autre qu'un spermatozoïde) (annexe 1).





Figure 3-3 : Hamilton Thorne Research

Patient: Baker		Date: 03/19/1998	
	No.	%	No.
Normal	21	24	Abnormal 53
Morph Index		40	Slight Amorph 14
Cells	88		Total Abnorm 67
Tapered	20		Too Long 3
Round	7		Too Short 0
Thin	11		Too Wide 0
Elongated	0		Too Narrow 1
Sev Amorph	3		Tail: Bent 3
Midpiece	1		Tail: Abaxial 3
Acro: Small	8		Tail: Coiled 15
Acro: Large	0		
Stain	Diff Quik		No. of frames 73

Figure 3-4 : Exemple de résultats (Hamilton Thorne Research).

## **IV. Morphologie spermatique et revue de la littérature**

### **1. Introduction**

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration de la qualité du sperme d'un homme infertile. Cependant son évaluation est dépendante de la méthodologie utilisée et de l'entraînement de l'observateur. Le spermatozoïde est l'aboutissement d'un long processus de différenciation survenant au cours de la spermiogenèse et de la maturation durant le transit épидидymaire. Chacune de ces étapes peut être altérée avec pour conséquence une production excessive de spermatozoïdes anormaux appelée tératozoospermie. Le seuil pathologique pour définir la tératozoospermie dépend des classifications utilisées. On parle de tératozoospermie isolée, lorsque les autres paramètres spermatiques sont normaux.

L'analyse de la morphologie spermatique est soumise à un nombre important de difficultés comme le manque d'objectivité avec des variations d'interprétation entre les différents laboratoires mais aussi dans un même laboratoire imputable à la subjectivité de la lecture humaine [10, 19]. Les variations observées sont également liées au manque de standardisation des méthodes d'examen [20] et au choix de la classification [21]. Il existe de nombreuses classifications dans le monde ce qui rend la standardisation de cet examen difficile. En 2010, l'OMS a publié un nouvel ouvrage qui a essayé de standardiser les pratiques et ainsi rendre à cet examen son intérêt diagnostique qui a baissé au fil des modifications des classifications.

### **2. Spermocytogramme : les débuts**

Les premières études concrètes de la morphologie des spermatozoïdes ont débuté dans les années 1960-1970 avec les travaux de *MacLeod* (1970) et de plusieurs autres équipes comme *Eliasson* et *Van Duijn* (1972)[22]. Les études morphométriques menées par *Van Duijn* et son équipe ainsi que par les travaux d'*Eliasson* ont fourni dès 1972 des dimensions précises pour définir la tête normale du spermatozoïde. Le seuil normal de FT était fixé à 60% à cette époque.

**En 1975**, en France, le docteur *Georges David* [11] propose une classification qui sera largement et exclusivement utilisée en France. La classification de David définit le

spermatozoïde normal à partir de spermatozoïdes récupérés dans le mucus cervical en postcoïtal. Un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est identifié par l'ensemble de ses anomalies.

**Au début des années 1990** puis en 2000 (*Auger & Eustache*)[13], cette classification a subi des modifications avec une redéfinition des catégories d'anomalies et l'apparition de l'IAM. L'IAM est considéré comme un indicateur prédictif significatif du pouvoir fécondant des spermatozoïdes aussi bien in vivo qu'in vitro. La valeur du pourcentage de spermatozoïdes typiques a été baissée à 50 %.

Au même moment, *David Mortimer* et *Roelof Menkveld* (2001)[15] travaillent avec *Thinus Kruger* à l'hôpital de Tygerberg en Afrique du Sud. Ils s'intéressent à la morphologie des spermatozoïdes et à son intérêt dans l'évaluation de la fertilité masculine. Ils créent une classification qui deviendra une référence mondiale.

La classification de Kruger est décrite comme étant plus sévère et plus discriminante que les autres classifications [18] avec une meilleure valeur prédictive positive sur les résultats de FIV que la classification de David [23, 24].

Il est recommandé d'analyser au moins 100 spermatozoïdes pour fournir une évaluation acceptable du pourcentage de spermatozoïdes typiques, la référence étant 200 spermatozoïdes ([21] ; [25] ; [10] et cahier de Bioforma 2009).

### **3. Organisation Mondiale de la Santé**

#### **3.1. Evolution de 1987 à 2010**

La classification des spermatozoïdes a évolué au fil des différentes éditions de l'OMS avec une baisse importante du seuil normal de FT.

- **La première édition de l'OMS en 1980** définit un seuil de FT à 60% d'après les travaux de *MacLeod* et *Eliasson*. Elle ne détaille pas la manière de classer les spermatozoïdes.
- **La deuxième édition de 1987** de l'OMS n'apporte qu'une modification du seuil normal de FT qui est abaissé à 50%.

- **La troisième édition de 1992** adopte une classification multiparamétrique dite « approche libérale » de la morphologie des spermatozoïdes avec l'IAM décrit par *Jouannet et al.* en 1988 [12]. Quatre catégories sont définies : la tête, la PI, le flagelle et la gouttelette cytoplasmique. En 1997, l'OMS apporte quelques modifications. Le seuil normal de FT est fixé à 30%. L'IAM est remplacé par « un indice de tératozoospermie » ou TZI. Le TZI correspond au nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde anormal. Cet indice donnerait une indication sur le pouvoir fécondant du sperme et est un élément supplémentaire pour l'interprétation de l'analyse du sperme [26].
- **L'OMS 1999 (4<sup>ème</sup> édition)** adopte de nouveaux critères : les critères stricts de Kruger. La valeur seuil de normalité n'est pas officiellement changée mais un seuil à 14% est notifié dans cette version. L'OMS 1999 peut donc être considérée comme une intégration de la classification de l'OMS 1992 et de la classification des critères stricts de Tygerberg. Avec l'arrivée des critères stricts, le rôle de l'acrosome devient très important dans la définition du spermatozoïde idéal.
- **Enfin, la cinquième édition de l'OMS en 2010** a entièrement adopté les critères stricts de Kruger pour l'évaluation de la morphologie spermatique avec un seuil de FT à 4 %.

**Tableau 4-1 : différentes classifications de la morphologie des spermatozoïdes.**

Classifications	Seuils FT	Références
MacLeod	60 %	<i>MacLeod</i> , 1964, 1970
David (France)	30 %	<i>David et al.</i> , 1975
Dusseldorf		<i>Hoffman et al.</i> , 1985
Critères Stricts de <i>Kruger</i>	FT > 14 % : normal 4 % < FT < 14 % : subfertile FT < 4 % : hypofertilité	<i>Kruger et al.</i> , 1986, <i>Menkveld</i> , 1987, <i>Menkveld et al.</i> , 1990
Approche libérale de <i>MacLeod</i> et <i>Eliasson</i>	60 % (1980) 50 % (1987)	Organisation mondiale de la santé (OMS), 1980-1987
Approche libérale <i>MacLeod</i> et <i>Eliasson</i> +IAM ( <i>Jouannet</i> )	30 %	OMS, 1992 (3 <sup>ème</sup> édition)
Critères Stricts de <i>Kruger</i>	14 %	OMS, 1999 (4 <sup>ème</sup> édition)
Critères Stricts de <i>Kruger</i>	4 %	OMS, 2010 (5 <sup>ème</sup> édition)

### 3.2. OMS 2010 : vers la standardisation

Le manuel récemment révisé de l'OMS 2010 fournit un atlas détaillé des critères stricts pour essayer de standardiser les pratiques [27]. Les planches ont été validées par un seul expert : Thinus Kruger. L'étude publiée dans l'OMS 2010 par l'équipe de *Cooper* a permis la détermination d'un seuil normal à 4%. Cette équipe a regardé la morphologie des spermatozoïdes de 4500 hommes issus de 14 pays de quatre continents différents qui ont fait preuve de leur fécondité en moins d'un an [28]. La valeur très basse de 4% correspond au 5<sup>ème</sup> percentile.

## 4. CASA et revue de la littérature

Les variations intra laboratoire et inter laboratoires pour l'analyse de la morphologie spermatique sont un phénomène bien connu pour toutes les classifications y compris pour les critères stricts [18]. Les études réalisées sur le sujet montrent que le personnel réalisant quotidiennement des spermocytogrammes a une nette tendance à être de plus en plus strict dans sa lecture au fil du temps [15, 23, 24, 29].

La comparaison entre les méthodes conventionnelles manuelles et l'analyse assistée par ordinateur a été effectuée pour l'examen morphologique des spermatozoïdes [23, 24]. La variation intra-opérateur est beaucoup plus élevée pour les méthodes conventionnelles que pour le CASA (coefficient de variation = 0,43 pour les méthodes conventionnelles contre 0,08 pour le CASA dans l'étude réalisée par *Marnet B.*). Cette étude a conclu que l'analyse par le CASA a une valeur prédictive légèrement supérieure aux techniques manuelles (critères stricts).

Quelques études ont montré que l'utilisation des systèmes automatisés (CASA) pour la morphologie spermatique permet une meilleure corrélation entre celle-ci et les résultats en FIV par rapport aux méthodes manuelles [30, 31] sans avoir les biais de reproductibilité et de répétabilité de ces dernières [19, 25]. Ces équipes ont montré de bons taux de fécondation pour un seuil de FT supérieur ou égal à 5%. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces travaux [30].

La reproductibilité et la précision des méthodes automatisées peuvent cependant être compromises par des défaillances méthodologiques comme la mise au point, l'illumination, la préparation de l'échantillon et la coloration [32] ainsi que par des difficultés techniques qui peuvent altérer la distinction entre la tête d'un spermatozoïde et un débris cellulaire, en particulier lorsque la concentration en spermatozoïdes est basse [25, 32]. Il semble que l'automate ne puisse pas compenser les défauts de préparation des lames d'échantillons de sperme ni les artefacts. De petites différences de niveau de gris de l'arrière-plan par rapport à la coloration des cellules peuvent aboutir à une classification incorrecte ou une incapacité à identifier les cellules comme des spermatozoïdes, ce qui aura pour conséquence l'altération de la fiabilité des résultats.

De plus l'analyse du flagelle par ces méthodes est incomplète. L'argument de la société de commercialisation de l'appareil est que le flagelle est mieux analysé par l'étude de la mobilité [23]. Enfin le système ne peut pas réaliser l'analyse lorsque les numérations en spermatozoïdes sont trop basses.

La préparation du sperme pour l'analyse sur CASA doit être réalisée selon un protocole bien précis (détaillé dans l'OMS 2010, 5<sup>ème</sup> édition et dans l'étude de *Coetzee et al.*, 1997) [33] et il est recommandé d'analyser au moins 200 spermatozoïdes [25] pour pallier à ces biais.

## 5. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans l'insémination intra-utérine (IIU)

C'est la plus ancienne des techniques d'AMP. En effet, les premiers résultats ont été publiés en 1789 par Hunter.

### 5.1. Principe et indications

Cette technique a pour objectif de faciliter la rencontre des gamètes mâles et femelles à l'intérieur de l'appareil génital de la femme. Elle consiste à introduire instrumentalement les spermatozoïdes dans la cavité utérine. Les techniques de préparation du sperme vont sélectionner une fraction de spermatozoïdes mobiles, capités, permettant de déposer un grand nombre de spermatozoïdes mobiles dans la cavité utérine. Cependant l'IIU, excluant le passage dans le mucus cervical, prive les spermatozoïdes d'un milieu favorable à leur maintien et à leur survie pendant plusieurs jours (plutôt de l'ordre de quelques heures). Ainsi une synchronisation précise entre l'IIU et l'ovulation est nécessaire (stimulation paucifolliculaire et déclenchement de l'ovulation).

Les indications se sont considérablement élargies au fil des ans. Plusieurs causes d'infertilité sont parfois associées (*The ESHRE Capri Workshop Group, 2009*).

- **Trouble de l'éjaculation**
- **Facteur cervical** : trouble de la glaire cervicale en quantité et qualité ; la dysmucorrhée est diagnostiquée devant un test post-coïtal négatif
- **Facteur masculin** : oligoasthénospermie modérée, hypospermie
- **Facteur immunologique** : anticorps antispermatozoïdes
- **Facteur inexplicé** : spermogramme normal, test post-coïtal normal, cycle normal, intégrité tubaire et cervicale. L'intérêt théorique de ces inséminations est d'optimiser la fécondité du couple en agissant sur les facteurs masculins (insémination) et féminins (stimulation de l'ovulation). La durée de l'infertilité prend ici toute son importance.
- Utilisation de gonadotrophines dans les traitements des **dysovulations**.

## 5.2. Rôle de la morphologie spermatique en IIU

L'IIU est une méthode simple, non invasive et moins coûteuse que la FIV/ICSI [34, 35]. En conséquence, la connaissance des facteurs qui peuvent négativement influencer l'efficacité de l'IIU est d'une grande importance, en particulier pour faire le choix de réaliser une IIU plutôt que d'avoir systématiquement recours en première intention à des techniques plus invasives.

Les indications les plus fréquentes de l'IIU sont l'hypofertilité masculine légère à modérée et inexpliquée [36, 37]. L'IIU peut augmenter de façon significative les chances de grossesse dans ces infertilités masculines modérées ou inexpliquées, par rapport aux taux de grossesses spontanées [38].

La réalisation de trois cycles d'IIU offrent autant de chance de grossesses cumulées qu'en FIV, technique plus coûteuse, dans les infertilités masculines modérées et inexpliquées [39].

La tératozoospermie associée à des anomalies des autres paramètres spermatiques telles que la mobilité et/ou la numération est reconnue comme étant un facteur négatif sur les taux de grossesse en IIU [40-42].

Lorsqu'il s'agit de l'impact de la tératozoospermie isolée sur les résultats en IIU, les études sont jusqu'à ce jour encore confuses [43]. Certains auteurs retrouvent une valeur prédictive de la morphologie spermatique sur les taux de grossesse en IIU, significativement inférieurs dans les tératozoospermies [43-46].

D'autres auteurs montrent une baisse du taux de grossesse ainsi que du taux cumulé de naissance vivante chez les couples pour lesquels était observée une tératozoospermie isolée par rapport aux couples pour lesquels l'homme avait une morphologie spermatique normale [42] [47].

Certains auteurs montrent en revanche que la morphologie des spermatozoïdes seule n'a pas de valeur prédictive sur les résultats en IIU quel que soit l'importance de la tératozoospermie [48-50].

La prise en charge des patients avec une tératozoospermie isolée est controversée et dépendante de chaque centre. Alors que certains vont réaliser en première intention une ICSI, d'autres débiteront leur prise en charge par des IIU. Ils se basent sur leur recul par rapport à leur pratique quotidienne et sur les études réalisées en sachant qu'elles utilisent des méthodologies et des classifications différentes, ce qui rend les comparaisons difficiles.



## 6. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans la fécondation *in vitro* (FIV) dite «classique»

### 6.1. Principe et indications

Cette technique d'AMP cherche à reproduire au laboratoire, la fécondation et les étapes précoces du développement de l'œuf fécondé. À l'intérieur d'une boîte de culture, la rencontre des gamètes est organisée dans un milieu de culture spécifique. Quelques jours après la fécondation, un ou plusieurs embryons obtenus *in vitro* sont transférés dans l'utérus de la patiente.

À l'origine, cette technique a été proposée comme réponse à la **stérilité tubaire définitive** (trompes obstruées, absentes ou non fonctionnelles). Depuis, les indications (parfois associées) se sont étendues :

- **À l'endométriose**
- **Aux échecs d'insémination**
- **Aux infertilités inexplicables**
- **Aux anomalies modérées de sperme** (oligo-, astheno-, ou tératozoospermie modérée).

Malgré les succès enregistrés dans cette dernière indication, les altérations importantes des paramètres du sperme constituaient il y a quelques années, des causes fréquentes d'échec de FIV. En 1992, l'introduction de la technique de micro-injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (ou ICSI pour intracytoplasmic sperm injection) a révolutionné la prise en charge des infertilités d'origine masculine.

### 6.2. Rôle de la morphologie spermatique en FIV.

Différentes études ont montré que les éjaculats ayant des valeurs très basses de numération et de mobilité sont de bonnes valeurs prédictives d'obtention de taux faibles de fécondation. Si on s'intéresse uniquement à la morphologie spermatique, les études sont plus controversées [51].

La morphologie spermatique est l'un des meilleurs paramètres prédictifs des résultats en FIV pour de nombreux auteurs [16, 17, 25, 30, 52-54].

Cependant, le vrai potentiel de ce paramètre a été sous-estimé à cause de plusieurs facteurs comme les variations inter et intra laboratoires [19]. Les facteurs responsables de ces variations ont été évoqués précédemment.

L'utilisation des critères stricts de Kruger semble avoir une meilleure valeur prédictive que les autres classifications [16, 17, 23, 24, 30]. La définition d'un seuil de FT au-delà duquel il y aurait une amélioration significative des taux de fécondation et/ou de grossesse est variable d'une équipe à une autre. Ce seuil a été défini à 14% dans plusieurs études [16, 17] mais on retrouve dans la littérature des seuils à 10% [55], 12% [54], 13% [24] ou 16% [23].

Ainsi l'arrivée de l'ICSI a permis de proposer d'emblée cette technique aux patients avec une tératozoospermie isolée afin d'améliorer les taux de fécondation et/ou les taux de grossesse mais surtout d'éviter les échecs de fécondation [55]. Mais l'impact de la tératozoospermie isolée sur les résultats de FIV est de plus en plus controversé.

En effet certains auteurs montrent que la tératozoospermie isolée n'a pas d'impact sur les résultats en FIV et n'est pas une indication à la réalisation d'une ICSI [56-58]. L'équipe de *Figueireido et al. (1996)*[59] a montré une absence de différence significative des taux de fécondation en fonction du taux de FT. Mais cette étude est malheureusement biaisée par le fait que plus le taux de FT était bas plus ils ont augmenté de façon significative le nombre de spermatozoïdes inséminés.

La tératozoospermie semble être devenu un facteur insuffisant, lorsqu'elle est isolée, pour prédire les résultats de FIV [51, 60, 61] car il est possible d'observer de bons taux de fécondation pour des tératozoospermies sévères [62]. Ainsi certains prétendent qu'une tératozoospermie isolée ne devrait pas conduire à la réalisation d'ICSI en première intention [63]. *Lundin et al. (2007)*[55] ont ainsi réduit significativement leur nombre d'ICSI réalisé en ne proposant plus d'ICSI sur des tératozoospermies isolées quel que soit le taux de FT.

## **7. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans la fécondation in vitro avec micro-injection ou ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection).**

La première ICSI a été réalisée par le Dr G. Palermo en 1992 alors que jusque-là n'était réalisée que la SUZI (subzonal insemination) avec des taux de fécondation plus élevés que celui des ovocytes soumis à la SUZI. La supériorité de l'ICSI sur la SUZI en termes de résultats fut ensuite confirmée par la même équipe belge sur des séries plus importantes [64]. Depuis 1992, des dizaines de milliers d'enfants sont nés après l'ICSI.

### **7.1. Principe et indications**

L'ICSI est une FIV avec fécondation assistée. On parle de FIV avec ICSI (opposé à la technique de FIV « classique »). Il n'y a que l'étape de fécondation qui varie par rapport à la FIV classique. Elle consiste à injecter, à l'aide de micromanipulateurs, un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte en métaphase de deuxième division (métaphase II). Il pourrait apparaître confortable, en court-circuitant grâce à l'ICSI les étapes initiales de l'interaction gamétique, de se prémunir contre un certain nombre d'échecs de fécondation. Cependant il ne faut pas oublier que le recul historique de l'ICSI remonte seulement à 1992 (contre 1978 pour la FIV classique) et que cette technique est plus invasive.

Selon le registre FIVNAT, la majorité des indications de recours à l'ICSI est masculine (environ 70% en 2004) associée ou non à un problème féminin. Dans 30% des indications, le recours à l'ICSI est motivé par un échec de fécondation ou paucifécondation lors d'une FIV classique précédente.

#### **o Oligoasthénospermie**

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur un seuil critique de spermatozoïdes mobiles et normaux en dessous duquel le recours à l'ICSI serait indispensable, ni de test fiable et non invasif pour prévoir la fécondance des spermatozoïdes in vitro. En l'absence de données consensuelles, l'indication de FIV classique ou d'ICSI est basée sur des seuils empiriques propres à chaque laboratoire (nombre de spermatozoïdes mobiles et normaux obtenus après capacitation).

#### o Asthénozoospermie totale isolée

Dans cette situation, le test hyposmotique permet de distinguer les spermatozoïdes vivants à flagelles incurvés des spermatozoïdes morts.

#### o Anticorps anti-spermatozoïdes

Dans ce cas, il n'y a pas de reconnaissance et de fusion entre l'ovocyte et le spermatozoïde et donc pas de fécondation. Il est préconisé d'avoir recours en première intention à l'ICSI lorsqu'il y a plus de 80% de spermatozoïdes avec des anticorps fixés sur la tête et/ou le flagelle.

#### o Échec ou paucifécondation en FIV classique

L'ICSI est proposée en seconde intention lors d'échec de fécondation en FIV classique ou lorsque le taux de fécondation est inférieur à 30%.

## **7.2. Rôle de la morphologie dans l'ICSI**

Ce chapitre ne sera pas développé car il ne fait pas l'objet de notre travail.

Il a été observé que pour les indications tubaires avec sperme normal [65] ou les infertilités inexplicables après échec d'insémination [66], le recours à l'ICSI n'améliorait pas significativement le taux de fécondation. L'ICSI a été utilisée pendant plusieurs années lorsqu'était diagnostiquée une tératozoospermie isolée. L'objectif était d'améliorer les taux de fécondation ce qui est comme nous l'avons évoqué au paragraphe précédent de plus en plus controversé dans la littérature. Alors que certains auteurs ont montré en leur temps une amélioration des taux de fécondation en ICSI versus FIV [67, 68], plusieurs études avancent le contraire en ne trouvant pas d'amélioration significative sur les résultats en terme de taux de fécondation et/ou de grossesse [24, 56, 57, 61, 69].

Il est bien sur clair que nous ne sommes pas dans le cas d'anomalies morphologiques monomorphes comme une globozoospermie où les chances de fécondation sont nulles.

Il est cependant très difficile de comparer les différentes études car beaucoup sont des études rétrospectives, non randomisées avec des paramètres étudiés différents rendant les comparaisons difficiles. Certaines ont un faible nombre de patients inclus et des méthodologies différentes sont utilisées d'une étude à une autre. D'autres n'ont évalués que le taux de grossesse [60, 61], avec des définitions différentes de la grossesse selon les auteurs.

## **PARTIE 2 : ETUDE**

## **PARTIE 2 : ETUDE**

Le but de notre étude prospective a consisté à évaluer l'impact de la morphologie spermatique analysée en critères stricts par l'IVOS sur nos tentatives de FIV et d'IU sur l'année 2012. Nous avons essayé de déterminer un seuil au-dessus duquel la morphologie spermatique a une bonne valeur prédictive positive sur les taux de fécondation (TF) et les taux de grossesse dans ces deux techniques.

### **I. MATERIELS ET METHODES**

#### **1. Population étudiée**

Il s'agit d'une étude prospective. Elle rassemble l'ensemble des tentatives réalisées en FIV classique et en IUU avec sperme de conjoint frais sur une partie de l'année 2012 au laboratoire d'AMP du CHU de Limoges.

L'ensemble des tentatives comprend les FIV classiques consécutives (n=133) avec le sperme du conjoint frais quel que soit l'indication de la FIV ainsi que les IUU consécutives (n=103) avec le sperme du conjoint frais.

L'analyse s'est faite de façon bien distincte : l'analyse des données de FIV d'une part, et l'analyse des données en IUU d'autre part. Les données ont été recueillies en respectant l'anonymat des couples.

Les critères de non inclusion dans notre étude étaient les tentatives avec sperme de donneur, avec spermatozoïdes préalablement congelés, recueillis dans les urines ou prélevés chirurgicalement et enfin avec des auto-anticorps anti-spermatozoïdes.

#### **2. Préparation du sperme pour les tentatives de FIV et d'IUU**

Le sperme a été recueilli par masturbation le jour de la tentative, après 2 à 4 jours d'abstinence. Après 30 à 40 minutes de liquéfaction à l'étuve à 37°C, l'échantillon de sperme a été analysé.

La concentration et la mobilité spermatiques ont été évaluées selon les méthodes et les normes de la version 2010 de l'OMS avant et après capacitation.

Les spermatozoïdes ont été capités grâce à la méthode de sélection sur gradient de densité (PureSperm® ; Nidacon International). Après succession d'une centrifugation et d'un lavage, une fraction de spermatozoïdes mobiles a été sélectionnée pour la fécondation. Il a été parfois nécessaire de demander un deuxième recueil.

### **3. Analyse de la morphologie spermatique**

#### **3.1. Comparaison David/Kruger**

Pour analyser la corrélation entre les deux classifications, 30 lames ont été sélectionnées au hasard et analysées selon les deux classifications (David et Kruger) par la même personne. Les lames pour l'évaluation en David ont été réalisées avec 10 µl de sperme et colorées avec une coloration de Schorr. Les 200 spermatozoïdes examinés ont été classés en formes typiques ou atypiques. Les mêmes échantillons ont été analysés en critères stricts de Kruger selon la méthodologie adaptée au CASA (voir ci-dessous).

#### **3.2. Analyse avec le CASA**

Pour chaque lame de cytologie ont été déposés 10 µl de sperme préalablement dilué en fonction de la concentration en spermatozoïdes selon un protocole précis décrit pour obtenir un nombre relativement constant de spermatozoïdes [25]. Les lames ont ensuite été colorées selon la méthode équivalente Diff-quick (kit RAL 555, CNL®) en accord avec les recommandations de l'OMS et de *Kruger et al.* (1987, 1996)[70, 71].

Le séchage des lames s'est fait à l'air libre. Avec ce protocole la coloration de l'arrière-plan est minimale, nous obtenons ainsi un bon contraste et une bonne qualité de coloration. Les lames ont ensuite été analysées sur l'automate Hamilton Thorne Research [70] : dans un premier temps, plus de 200 images de spermatozoïdes ont été sélectionnées. Dans un deuxième temps, les images non conformes ont été éliminées par l'auteur. Toutes les lames ont été analysées par l'auteur pour éliminer un biais de lecture inter opérateur. Cette personne a reçu la formation de bonne utilisation de l'automate par le représentant européen du Hamilton Thorne Research.

La morphologie a été évaluée pour les IUI sur les spermatozoïdes avant capacitation et pour les FIV sur les spermatozoïdes avant et après capacitation.

#### 4. Tentatives de FIV : déroulement de la tentative

**La stimulation ovarienne** a été réalisée soit avec un protocole long avec des agonistes de la GnRH (*Décapeptyl 3<sup>®</sup>*, *Beaufour-Ipsen*, Boulogne, France) et de la FSH recombinante (*Gonal F<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France ou *Puregon<sup>®</sup>*, *Shering Organon*, Puteaux, France), soit avec un protocole court avec des agonistes de la GnRH (*Décapeptyl 0,1*, *Beaufour-Ipsen*, Boulogne, France) et la FSH recombinante (*Gonal F<sup>®</sup>* ou *Puregon<sup>®</sup>*), soit avec un protocole antagoniste de la GnRH (*Cétrotide*, *Merck Serono*, Lyon, France) et FSH.

Les patientes ont été déclenchées par une injection en sous-cutanée de 0,5 mg d'HCG recombinante (*Ovitrelle*, *Merck*, Lyon, France). Le déclenchement se fait en fonction du nombre et de la taille des follicules ainsi que du bilan hormonal par décision du gynécologue.

**La ponction folliculaire** a été réalisée 35 heures après le déclenchement par le gynécologue au bloc opératoire sous sédation puis transmise au biologiste. Chaque tube prélevé a été examiné sous loupe binoculaire et les complexes cumulo-ovocytaires ont été triés et nettoyés dans un milieu de rinçage. Après récupération, les ovocytes ont été comptés et mis dans l'IVF Medium<sup>®</sup> (*Origio*) puis placés à l'étuve à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> en attendant l'insémination.

**Au moment de l'insémination**, les ovocytes ont été distribués par 5 avec environ 50 000 spermatozoïdes capacités dans les puits contenant 0,5 ml d'IVF médium<sup>®</sup>. Un changement de milieu a été réalisé 3 heures après la FIV pour la majorité des tentatives. Le lendemain, au moment de l'évaluation de la fécondation, les ovocytes ont été distribués dans des microgouttes de 30 µl d'ISM1<sup>®</sup> (*Origio*) le nombre d'ovocytes mûres (MII) a été noté. A J2, après le transfert embryonnaire, les embryons surnuméraires sont mis dans des microgouttes de CCM 30<sup>®</sup> (*Vitrolife*, Göteborg, Suède) jusqu'à J5. Pendant toute cette période, les boîtes de culture sont placées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les boîtes sont sorties le minimum possible pour l'observation des embryons.

#### **La culture *in vitro* des embryons et l'observation des embryons**

La culture *in vitro* s'est déroulée sur deux ou trois jours pour les délais classiques ou sur six jours pour les cultures prolongées en milieu séquentiel jusqu'au stade de blastocyste (CCM30<sup>®</sup>, *Vitrolife*, Göteborg, Suède). L'ovocyte est fécondé lorsque l'on observe deux pronuclei 15 à 20 heures après la mise en fécondation. La qualité du zygote a été évaluée selon la classification des « Z » ([72], annexe 2) puis une nouvelle évaluation a eu lieu à la 26<sup>ème</sup> heure pour noter les clivages précoces. Au deuxième et troisième jour, les embryons



ont été typés en fonction de la régularité des blastomères, de leur nombre, de la présence de blastomères multinucléés, de la présence de fragments cytoplasmiques et de leur importance par rapport au volume embryonnaire (annexe 3). Les embryons non transférés et non congelés précédemment ont été conservés jusqu'au cinquième jour.

Les embryons surnuméraires ont été congelés lorsqu'ils répondaient aux critères de congélation.

**Le transfert** est réalisé au centre d'AMP par le gynécologue agréé avec des cathéters de différents types : cathéter simple (*Frydman classique catheter 4,5<sup>®</sup>*, CCD, Paris, France), cathéter double lumière (*Frydman soft 4,5 with guide*, CCD, Paris, France) ou cathéter difficile (*Frydman memory catheter 4,5<sup>®</sup>*, CCD, Paris, France). La supplémentation de la phase lutéale est faite avec de la progestérone naturelle administrée par voie vaginale (*Estima<sup>®</sup>*, Effick, Bièvres, France).

Nous avons évalué le taux de fécondation (TF) qui correspond dans notre étude au nombre de zygotes normaux obtenus sur le nombre d'ovocytes en MII à J1. Un taux de fécondation <30% est considéré comme une paucifécondation et un taux de fécondation  $\geq 30\%$  est considéré comme un succès de fécondation.

Nous avons aussi évalué le taux de grossesse. Une grossesse biologique correspond à un taux de  $\beta$ HCG > 100 UI/ml 14 jours après le transfert embryonnaire. Une grossesse échographique correspond à la présence d'un ou plusieurs sacs avec une activité cardiaque à l'échographie précoce réalisée trois à quatre semaines après le transfert embryonnaire. Une grossesse est dite évolutive lorsqu'elle dépasse les douze semaines d'aménorrhée.

## 5. Tentatives d'IU

Les stimulations ovariennes ont été réalisées avec de la FSH recombinante (*Puregon ou Gonal F*). La surveillance pendant la stimulation s'est faite par des échographies et des dosages hormonaux sanguins (œstradiol, progestérone). De l'HCG recombinante (*Ovitrelle*, 250  $\mu$ g SC) a été utilisée pour le déclenchement de l'ovulation. L'IU est réalisée le lendemain lorsqu'il y a un ou deux follicules mûres (maximum trois de façon exceptionnelle).

L'insémination a été réalisée par le gynécologue avec un cathéter souple après capacitation des spermatozoïdes.

Nous avons évalué le taux de grossesse.

## 6. Méthodologie statistique

Les moyennes et les déviations standards ont été utilisées pour analyser les variables continues. Les corrélations ont été évaluées par le calcul du coefficient de corrélation linéaire  $r$ . Les comparaisons statistiques ont été évaluées par les tests non paramétriques de Mann-Whitney. Une différence significative a été considérée au seuil de 5% ( $p < 0,05$ ).

Les concordances entre deux méthodes ont été analysées par la méthode de *Bland et Altman* (1986)[73].

Les courbes Receiver-Operating Characteristic (ROC) (Metz, 1978 ; *Zweig & Campbell*, 1993) ont été utilisées pour évaluer les valeurs prédictives des différents paramètres sur les taux de fécondation et les taux de grossesse, ainsi que dans la tentative de détermination d'un seuil de FT prédictif de bons taux de fécondation. Sur les courbes ROC, la sensibilité est tracée en fonction de (1-spécificité) pour différents points. Chaque point représente une paire « sensibilité/spécificité » correspondante chacune à un seuil. Un test avec une discrimination parfaite a une courbe ROC qui passe par le coin gauche le plus haut et a une aire sous la courbe (AUC) de 1,0. Une AUC de 0,5 indique un test sans aucune valeur discriminante.

## II. RESULTATS

### 1. Comparaison des deux classifications d'évaluation de la morphologie spermatique.

Pour évaluer la concordance entre les classifications de David et les critères stricts de Kruger, des lames d'échantillons de sperme (n=30, échantillon considéré comme suffisant statistiquement) ont été analysées par le même observateur. Chaque lame a été analysée à la fois par les deux classifications (David et Kruger). Pour évaluer cette concordance nous avons utilisé un graphique de Bland et Altman.

La méthode de Bland et Altman est souvent utilisée comme méthode de référence pour étudier la concordance entre deux séries de données quantitatives produites par des méthodes de mesures différentes mais de la même grandeur. Cette méthode consiste à réaliser un graphe comportant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques, en particulier dans notre cas entre la classification en critères stricts de Kruger et la classification de David (soit FT Kruger - FT David), et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques (soit  $[FT\ Kruger + FT\ David]/2$ ).

Dans l'hypothèse d'une concordance parfaite des deux séries de valeurs étudiées, la somme des différences arithmétiques entre les valeurs ( $\sum [FT\ Kruger - FT\ David]$ ) devrait être nulle. On définit ainsi le « biais » comme la moyenne des différences entre les mesures. Il représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeurs par rapport à l'autre.

Il est ensuite possible de déterminer deux seuils de limites de concordance (correspondant au biais  $\pm 1,96$  déviations standards) et de les tracer comme deux droites horizontales sur le graphique. Elles correspondent approximativement à deux écarts types par rapport à la moyenne donc à un intervalle de confiance à 95%. Une mauvaise concordance est définie lorsque l'on a plus de 5% des points situés en dehors de ces deux limites.

Dans notre évaluation, le graphique de Bland et Altman (figure 1) montre que 2 points sur 30 sont situés en dehors des deux limites de concordance, ce qui représente 6,6% des points (acceptable quand <5%). Cela signifie qu'il existe dans notre étude une mauvaise concordance entre les deux classifications (critères stricts et David).

Nous constatons une moyenne des différences à 4,6% avec des limites de concordance très larges allant de -13,7% à 22,9% qui ne sont pas acceptables en pratique.

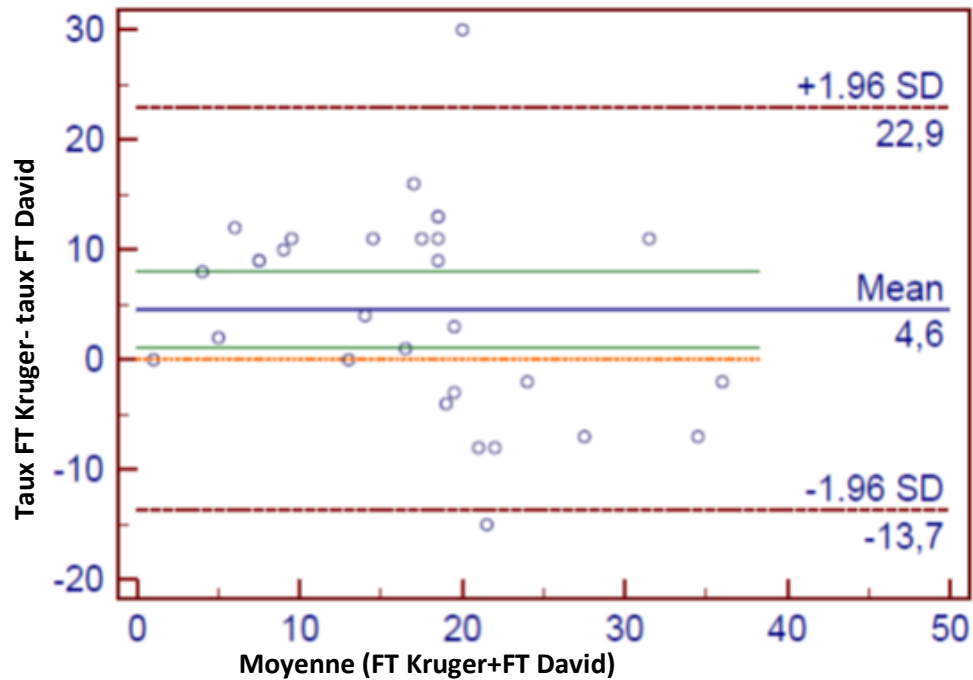


Figure 1 : Concordance entre la classification de David et la classification de Kruger (graphique de Bland et Altman).

Le taux de concordance calculé est à 0,49 ce qui confirme la mauvaise concordance (concordance parfaite à 1).

La moyenne des FT est de 17% pour la classification de David ce qui est plus bas que la moyenne des FT en Kruger qui est de 19%. Nous observons que les valeurs de FT en David ont tendance à être plus basses que celles en critères stricts.

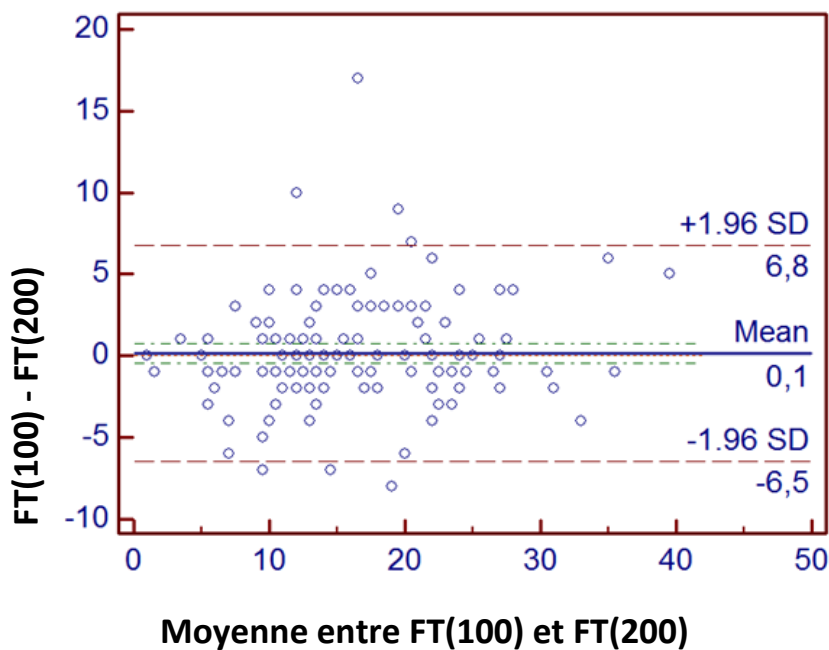
Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir la concordance entre les résultats de FT de la lecture de 100 et 200 spermatozoïdes selon les critères stricts de Kruger. Nous avons réalisé cette analyse sur les échantillons de sperme de toutes les tentatives de FIV et d'IIU de notre étude.

Nous avons aussi utilisé un graphique de Bland et Altman pour comparer le taux de FT après analyse de 100 spermatozoïdes puis de 200 spermatozoïdes.

Dans notre évaluation, le graphique de Bland et Altman (figure 2) montre que seulement 7 points sur 368 sont situés en dehors des deux limites de concordance, ce qui représente 1,9% des points (acceptable quand <5%). Cela signifie qu'il existe dans notre étude une très

bonne concordance entre le taux de FT après analyse de 100 spermatozoïdes et celui après analyse de 200 spermatozoïdes.

Nous constatons une moyenne des différences à 0,1% ce qui correspond quasiment à une concordance parfaite (une concordance est dite parfaite quand la moyenne des différences FT(100) – FT (200) est nulle) avec des limites de concordances acceptables et une majorité des points situés autour de la moyenne.



**Figure 2 : Corrélation entre le taux de FT après lecture de 100 spermatozoïdes (FT(100)) et le taux de FT après lecture de 200 spermatozoïdes (FT(200)). (Graphique de Bland et Altman).**

Le coefficient de concordance à 0,96 (idéalement à 1) confirme la bonne concordance entre les taux de FT après lecture de 100 et 200 spermatozoïdes.

Cette bonne concordance entre les deux mesures permet d'accepter le fait qu'il n'y a pas de bénéfice à analyser 200 spermatozoïdes plutôt que 100.

## 2. Résultats pour les tentatives de FIV

Les caractéristiques générales de la population étudiée en FIV sont regroupées dans le tableau 1 :

**Tableau 1 : FIV paramètres descriptifs de la population de l'étude (CCO : complexes cumulo-ovocytaires).**

Paramètres descriptifs		Moyenne des paramètres des tentatives de FIV (n=133)
Age moyen de la femme		33.8 ± 4,7
Age moyen de l'homme		35.9 ± 5
Rang		1,6 ± 0,9
Concentration en spermatozoïdes (millions/ml)		65.4 ± 55
Mobilité (a+b+c) %		68.4 ± 11
Mobilité (a+b) %		60,2 ± 11
Numération (millions/ml) après capacitation		36.9 ± 20
FT (CASA) avant capacitation (%)		17 ± 7,8
FT (CASA) après capacitation (%)		21 ± 11,2
Nombre de CCO recueillis		8.4 ± 6
Nombre d'ovocytes en métaphase II (MII)		7 ± 5
Taux de fécondation (%) (2PN/MI2)		49.8 ± 32,3
Nombre d'embryons transférés		1.5 ± 3
Nombre de transfert		104
grossesses biochimiques	% par ponction	25,6% (n=34)
	% par transfert	32.7%
grossesses échographiques	% par ponction	21.8% (n=29)
	% par transfert	27.9%
grossesses évolutives	% par ponction	20.3% (n=27)
	% par transfert	26%

## 2.1. Impact sur le taux de fécondation (TF)

Nous avons analysé la corrélation entre le taux de FT (critères stricts de Kruger) des spermatozoïdes et le TF.

Pour évaluer cette corrélation, nous avons utilisé le principe de régression linéaire qui consiste en présence de deux variables quantitatives, à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre elles.

Dans notre étude, la droite de régression linéaire a mis en évidence une corrélation entre le taux de FT et le TF avec un taux de corrélation  $r$  à 0,230. Cette corrélation est faible mais significative ( $p < 0.05$ ) et a été mise en évidence pour les morphologies avant et après capacitation (figures 3 et 4).

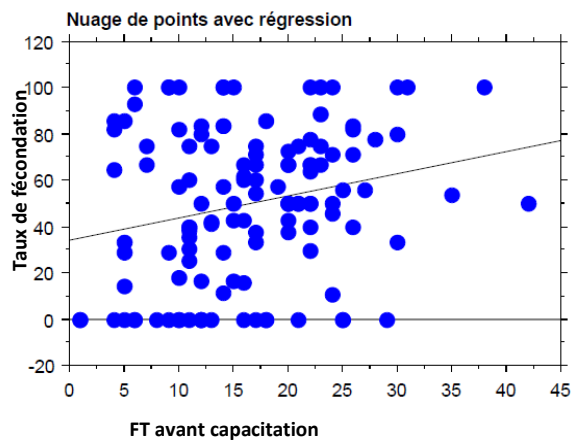
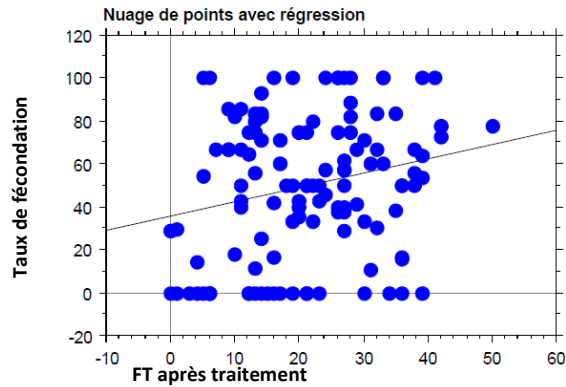


Figure 3 : répartitions des valeurs de FT des spermatozoïdes avant capacitation en fonction du taux de fécondation.



**Figure 4 : répartitions des valeurs de FT des spermatozoïdes après capacitation en fonction du taux de fécondation.**

La régression linéaire permet la détermination d'un coefficient de détermination  $R^2$  qui représente le pourcentage de variabilité expliqué par le modèle linéaire.

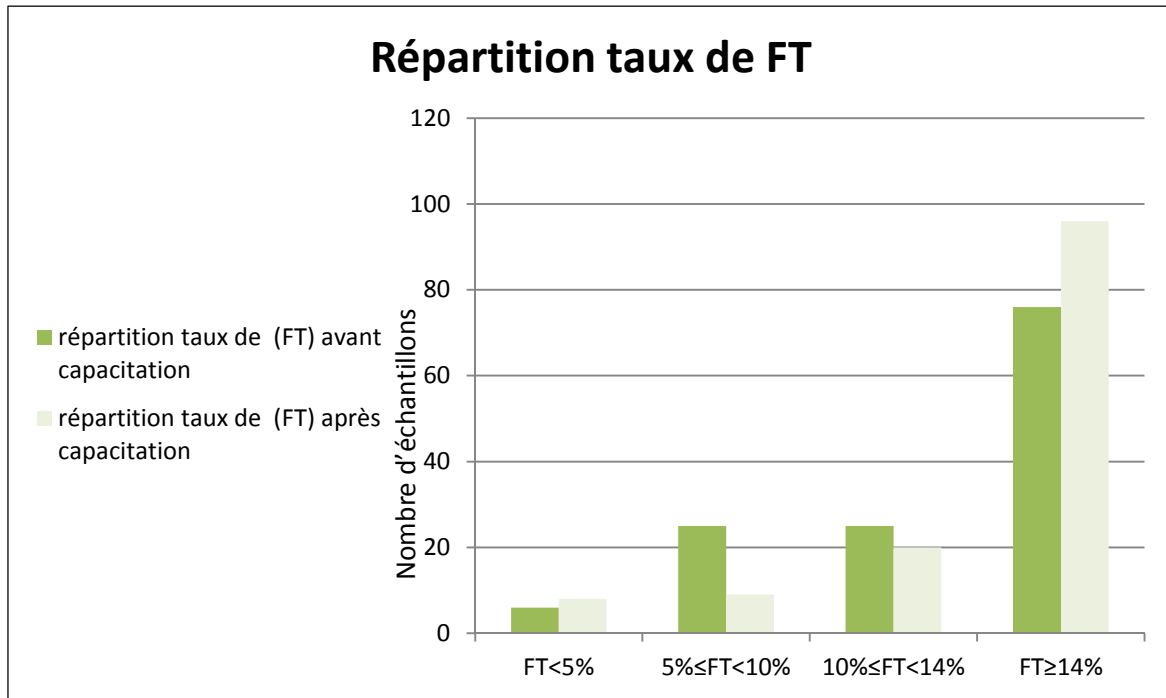
Nous obtenons dans cette étude un  $R^2$  à 0,053, ce qui signifie que seulement 5,3% de la variabilité (ou variance) de la variable « TF » est expliquée par la liaison avec la variable « taux de FT ».

Enfin nous observons que seulement 6 valeurs de FT sont inférieures à 5% avant capacitation (8 valeurs après capacitation) ce qui ne représente que 5% de la population étudiée (8% après capacitation) (figure 5).

Il sera donc difficile de conclure pour des valeurs de FT basses (inférieures à 5%). Au-delà de 5% de FT, la répartition est beaucoup plus homogène.

Cette observation est valable pour les FT avant et après capacitation.





**Figure 5 : Répartition du taux de FT avant et après capacitation dans l'échantillon de population en FIV de notre étude (n=133).**

Nous avons évalué l'impact de la morphologie spermatique sur les paucifécondations et les succès de fécondation.

Un TF inférieur à 30% est considéré comme une paucifécondation, une nullifécondation lorsque le TF=0% et un TF supérieur ou égal à 30% comme un succès de fécondation.

Nous avons séparés les couples en deux groupes en fonction du TF. Les tentatives pour lesquelles le TF est inférieur à 30% (groupe I) représentent 27.3% des tentatives (n=36) et celles pour lesquelles le TF est  $\geq$  30% (groupe II) représentent 72.7% (n=96).

Lorsque l'on compare les groupes I et II (tableau 2), nous constatons une différence significative pour : les FT avant capacitation (13% vs 18% respectivement), les FT après capacitation (15% vs 23%), le nombre d'embryons obtenus (0,8 vs 4,2) et les taux de grossesse par ponction (2,3% vs 23,3%).

Il est important de noter une fréquence élevée d' « échec de fécondation » n=23 (64%) dans le groupe I ce qui explique que le nombre d'embryon transférés ainsi que le taux de grossesse par ponction soit significativement plus bas dans le groupe I par rapport au groupe II.

**Tableau 2 : différences entre les groupes I : « taux de fécondation <30% » et II : « taux de fécondation ≥ 30% ».**

	<b>groupe I</b>	<b>groupe II</b>	
<b>Nombre de tentatives</b>	36	97	
<b>% des tentatives</b>	27.3%	72.7%	
<b>Taux de FT avant capacitation</b>	13% ±7	18% ±8	P=0,004
<b>Taux de FT après capacitation</b>	15% ±12	23% ±10	P=0,001
<b>Nombre d'embryons obtenus à J2</b>	0.8 ±1.4	4.2 ±3	P=0,001
<b>Taux de grossesse /ponction</b>	2.3%	23.3%	P=0,007

Nous avons utilisé les courbes ROC pour analyser la valeur prédictive (VP) de la morphologie spermatique avant capacitation en critères stricts, sur le TF dans nos deux groupes.

Les courbes ROC sont généralement utilisées pour montrer les progrès réalisés grâce à un classificateur binaire lorsque le seuil de discrimination varie. Elles permettent de déterminer une sensibilité et une spécificité pour le test évalué ainsi qu'une valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN) en fonction du seuil de discrimination déterminé par la courbe.

Dans notre étude, nous cherchons à savoir s'il existe un impact de la morphologie spermatique avant capacitation en critères stricts, sur le TF dans nos deux groupes et ainsi déterminer un seuil de FT qui nous permettrait d'éviter les pauci ou nullifécondation.

La valeur de l'aire sous la courbe (AUC) est de 0.688 ( $p < 0,05$ ) pour les FT (figure 6). Ce résultat est en faveur de l'existence d'une valeur prédictive positive de la morphologie spermatique sur les TF.

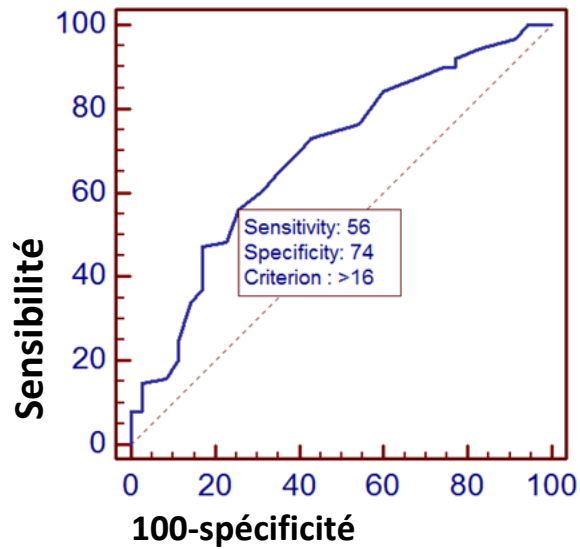


Figure 6 : Courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation sur les taux de fécondation (seuil de taux de fécondation à 30%).

Sur nos courbes ROC, un seuil de FT ressort de façon significative entre les deux groupes de notre population. Ce seuil est de 16% pour les FT avant capacitation ( $p < 0,001$ ). La sensibilité de ce seuil est de 56% et la spécificité est de 74% (tableau 3).

Tableau 3 : Valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation.

	Groupe I	Groupe II
taux de FT <16%	20	25
Taux de FT ≥16%	16	72
Sensibilité	56%	
Spécificité	74%	
Valeur Prédictive Positive (VPP)	44%	
Valeur Prédictive négative (VPN)	82%	

Cela signifie que lorsque le taux de FT avant capacitation est supérieur ou égal à 16%, dans 82% des cas, le taux de fécondation sera supérieur ou égal à 30% et que lorsque le taux de FT est inférieur à 16%, dans 44% des cas le taux de fécondation sera inférieur à 30%.

La même étude a été réalisée sur la morphologie après capacitation et l'AUC de la courbe ROC est de 0,691 ( $p < 0,05$ ) (figure7).

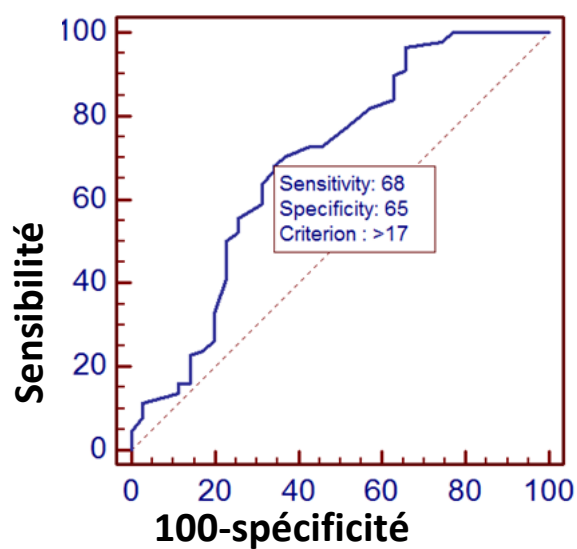


Figure7 : courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique après capacitation sur les taux de fécondation (seuil de 30%).

Ce résultat est en faveur de l'existence d'une valeur prédictive positive significative de la morphologie spermatique après capacitation.

La courbe ROC permet aussi de définir un seuil à 17% de FT après capacitation. La sensibilité de ce seuil est de 68 % et la spécificité est de 66%.

Il en résulte une valeur prédictive négative de 82% et une valeur prédictive positive de 48% (tableau 4).

**Tableau 4 : valeur prédictive de la morphologie spermatique après capacitation.**

	<b>Groupe I</b>	<b>Groupe II</b>
<b>taux de FT &lt;17%</b>	<b>26</b>	<b>28</b>
<b>Taux de FT ≥17%</b>	<b>12</b>	<b>54</b>
<b>Sensibilité</b>	<b>68%</b>	
<b>Spécificité</b>	<b>66%</b>	
<b>Valeur Prédictive Positive (VPP)</b>	<b>48%</b>	
<b>Valeur Prédictive négative (VPN)</b>	<b>82%</b>	

**Cela signifie que lorsque le taux de FT après capacitation est supérieur ou égal à 17%, dans 82% des cas, le taux de fécondation sera supérieur ou égal à 30% et que lorsque le taux de FT est inférieur à 17%, dans 48% des cas le taux de fécondation sera inférieur à 30%.**

Si l'on prend maintenant en compte ce seuil fixé à 16% de FT avant capacitation, les couples de notre étude se répartissent dans deux catégories : FT < 16% et FT ≥ 16%. Le tableau 5 détaille les différents paramètres dans ces deux groupes.

Nous observons que les deux populations sont statistiquement identiques pour : l'âge des deux membres du couple, la concentration en spermatozoïdes avant et après capacitation, le taux de spermatozoïdes mobiles, le nombre de CCO récupérés, le nombre d'ovocytes mûres, le nombre d'embryons obtenus, le nombre d'embryons transférés, le taux d'échec total de fécondation, le taux de grossesse biologique par ponction et enfin le taux de grossesse clinique par ponction.

Par contre, nous observons que le TF est réduit dans le groupe FT < 16% (avec un p à 0,06 proche de la significativité) alors que le taux d'échec total de fécondation même s'il est élevé n'est pas significativement différent entre les deux groupes.

Tableau 5 : récapitulatif des différences des paramètres entre les groupes « <16% » et le groupe « ≥16% ».

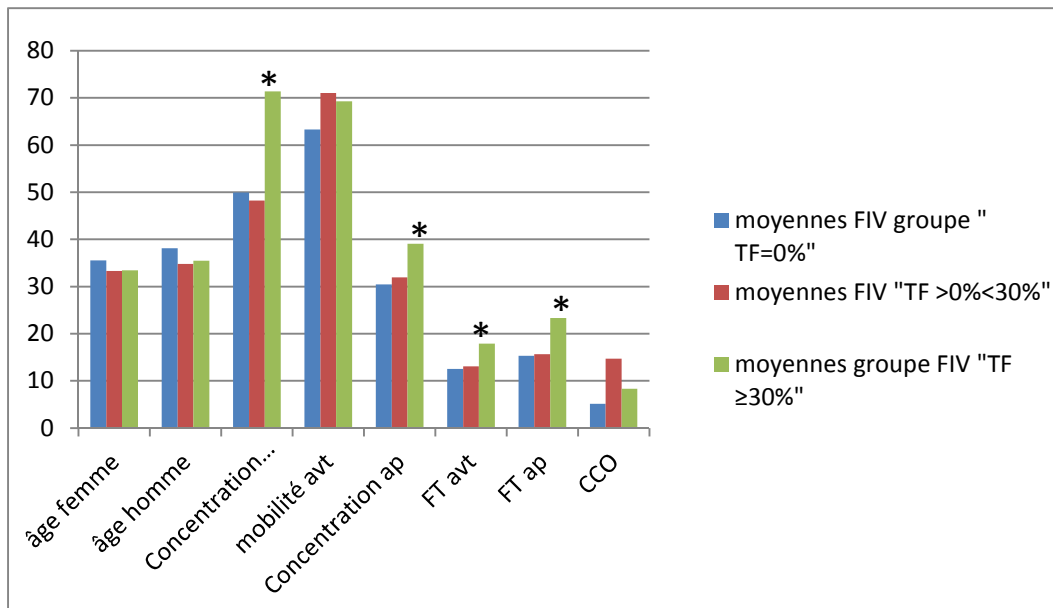
	Critères stricts CASA <16% (n=68)	Critères stricts CASA ≥16% (n=65)	P
Ages des femmes	33,1 ± 4,9	34,6 ± 4,3	NS
Ages des hommes	35,2 ± 4,9	36,7 ± 5	NS
Concentration spermatozoïdes (millions/ml)	57,5 ± 52,7	73 ± 56	NS
Taux de spermatozoïdes mobiles	67,6 ± 12,4	69,2 ± 9,8	NS
Concentration spermatozoïdes après capacitation	36,2 ± 18,5	37,6 ± 21,7	NS
Taux de FT CASA critères stricts	<b>10,4 ± 4</b>	<b>23,1 ± 5,1</b>	<b>&lt;0,001</b>
Nombre de complexes cumulo- ovocytaires récupérés	9 ± 6,7	7,8 ± 5,2	NS
Nombre d'ovocytes mûres (MII)	7,6 ± 5,5	6,4 ± 4,4	NS
Taux de fécondation	<b>44 ± 35.3%</b>	<b>55.± 28.4%</b>	<b>P=0.06</b>
Fréquence Taux de Fécondation <30%	<b>40%</b>	<b>15,3%</b>	<b>0,043</b>
Fréquence échec total de fécondation	12%	5%	NS
Nombre d'embryons J2	3,2 ± 3,1	3,4 ± 2.8	NS
Nombre d'embryons transférés	0,8 ± 1,4	1,6 ± 0,9	NS
Taux de grossesse biologique par ponction	23,1%	26,7%	NS
Taux de grossesse clinique par ponction	18,5%	25%	NS

Nous avons aussi analysé le groupe avec un échec de fécondation (groupe TF=0%). Les caractéristiques de ce groupe sont décrites dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Description des couples avec 0% de taux de fécondation.**

<b>Paramètres</b>	<b>Moyenne des variables</b>
<b>Nombre de tentatives</b>	23 (17,3%)
Age de la femme	36.1 ± 4.2
Age de l'homme	38.1 ± 5.4
Concentration spermatique (millions/ml) avant capacitation	50 ± 51
Mobilité (a+b+c)	63% ± 14
FT avant capacitation	13% ± 8
Concentration spermatique (millions/ml) après capacitation	30,4 ± 20,3
FT après capacitation	15% ± 11
CCO	5 ± 4

Nous avons comparé dans la figure 8 les groupes : « TF=0% », TF «0%<TF<30%» et « TF ≥ 30% ».



**Figure 8 : Moyenne des TF dans les groupes : « TF=0% », «0%<TF<30% » et « TF ≥30% »** (avt : avant capacitation ; ap : après capacitation) ; \* : différence significative par rapport aux deux autres groupes.

Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes pour : l'âge du couple, la mobilité progressive ainsi que pour les CCO récupérés.

Par contre, nous observons une différence significative dans le groupe « TF ≥ 30% » par rapport aux deux autres groupes pour la concentration en spermatozoïdes ainsi que les taux de FT avant et après capacitation.

Notre étude s'est ensuite intéressée à l'impact de la concentration en spermatozoïdes sur les TF en FIV classique.

La moyenne de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat dans la population étudiée est de 65,4 millions/ml ( $\pm 55$ ) et de 36,9 millions/ml ( $\pm 20$ ) respectivement avant et après capacitation.

Dans cette étude, il existe une corrélation entre la concentration en spermatozoïdes et le TF ( $r=0,242$ ) ( $p<0,05$ ) mais cette corrélation est faible.

Le coefficient de détermination  $R^2$  est à 0,058, ce qui signifie que seulement 5,8% de la variable taux de fécondation est expliquée par la liaison avec la variable concentration.



L'AUC de la courbe à 0,620 n'est pas significativement différente de 0,5. Dans notre population la concentration n'a pas eu une influence significative sur les taux de fécondation (figure 9).

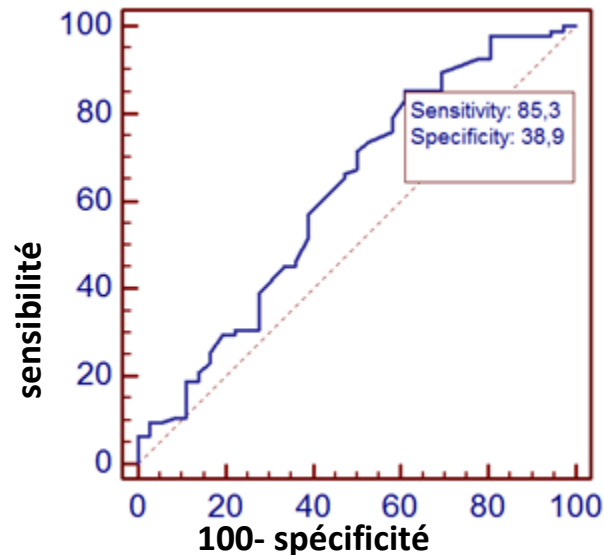


Figure 9 : Courbe ROC, valeur prédictive de la concentration spermatozoïdique avant capacitation sur les taux de fécondation.

Selon les taux de fécondation, la moyenne de la concentration en spermatozoïdes est de 49,3 millions/ml ( $\pm 50$ ) dans le groupe I (TF < 30%) et de 71 ( $\pm 50,6$ ) millions/ml dans le groupe II (TF < 30%) ( $p < 0,05$ ).

Cette différence significative est retrouvée pour la numération après capacitation avec des taux de fécondation plus élevés lorsque la concentration est plus élevée.

Nous pouvons observer que la concentration en spermatozoïdes est normale (selon l'OMS 2010) pour 129 sur 133 de nos patients. Nous ne pourrions donc pas conclure sur l'impact positif ou non de la numération sur les TF dans notre étude quand cette concentration est inférieure aux normes.

Enfin nous avons regardé si la mobilité progressive avait une influence sur les TF dans notre étude.

La moyenne de la mobilité progressive des spermatozoïdes de l'éjaculat dans la population étudiée est de 60,2%  $\pm$  11% avant capacitation.

La moyenne de la mobilité progressive des spermatozoïdes est de  $57\% \pm 12$  dans le groupe I et de  $61 \pm 11$  dans le groupe II, la différence n'est pas significative ( $p=0,21$ ).

Il est important de noter que la mobilité progressive de nos 133 patients était normale le jour de la tentative (selon les normes de l'OMS 2010) sauf pour un patient qui avait une asthénozoospermie à 10% (normale a+b >32%).

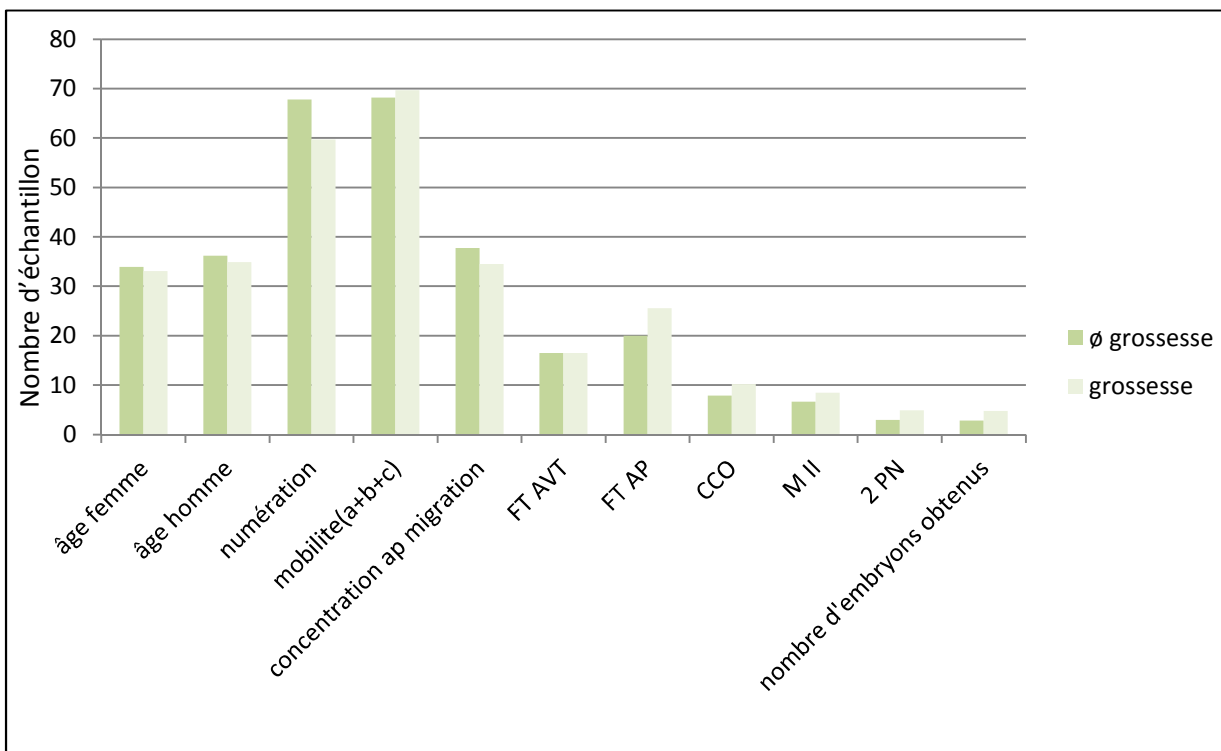
## 2.2. Impact sur le taux de grossesse

Nous avons cherché à savoir si la morphologie spermatique avait un impact sur la survenue d'une grossesse.

Dans notre population, une grossesse biologique est survenue dans 25,6% des cas ( $n=34$  sur 133) et une grossesse clinique dans 21,8% des cas.

La figure 10 reprend les paramètres des tentatives en fonction de la survenue ou non d'une grossesse.

**Figure 10 : Fréquence des différents paramètres chez les couples avec grossesse et sans grossesse (FTAVT : FT avant capacitation ; FTAP : FT après capacitation ; CCO complexes cumulo-ovocytaires).**



L'étude des FT avant et après capacitation (respectivement 16% et 17%) ne montre pas de différence significative entre les groupes avec ou sans grossesse.

L'analyse des courbes ROC (figure 11-12) montrent par l'absence d'AUC qu'il n'y a pas d'impact de la morphologie spermatique avant et après capacitation sur les chances d'obtention d'une grossesse.

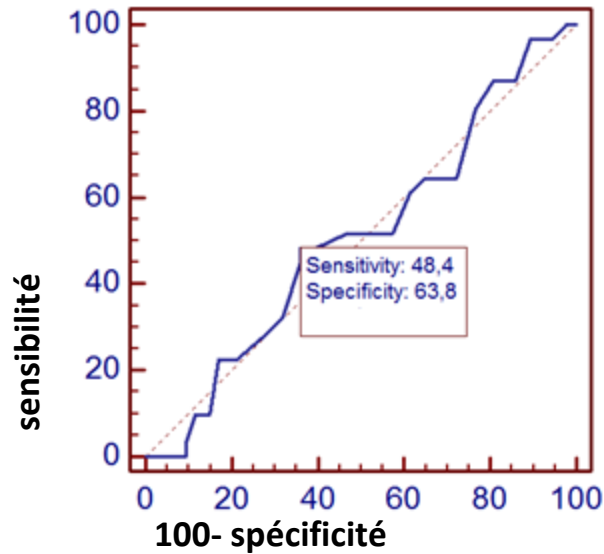


Figure 11 : courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation sur les taux de grossesses biologiques.

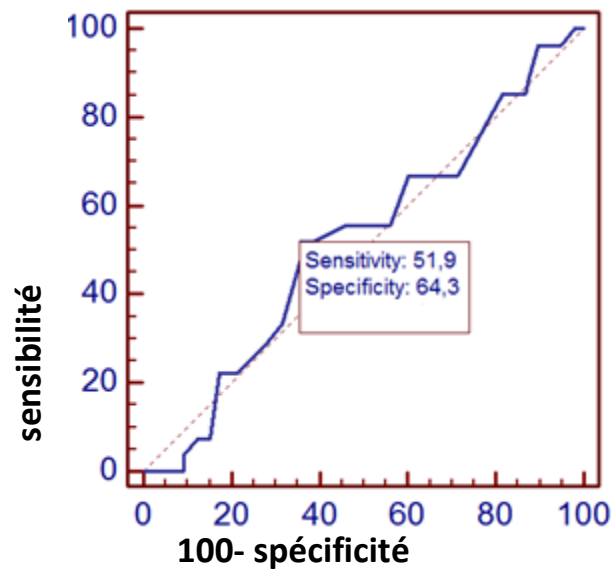


Figure 12 : courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation sur les taux de grossesses cliniques.

Nous avons enfin regardé le rôle de la concentration spermatique sur les taux de grossesse. Là encore, dans notre population étudiée, nous n'observons pas de différence significative de la concentration en spermatozoïdes entre les groupes avec et sans grossesse.

Une absence d'AUC sur la courbe ROC est observé (figure 13).

Nous pouvons donc conclure que dans notre étude, la numération en spermatozoïdes avant et après capacitation n'a pas d'impact de façon significative sur les chances de survenue d'une grossesse.

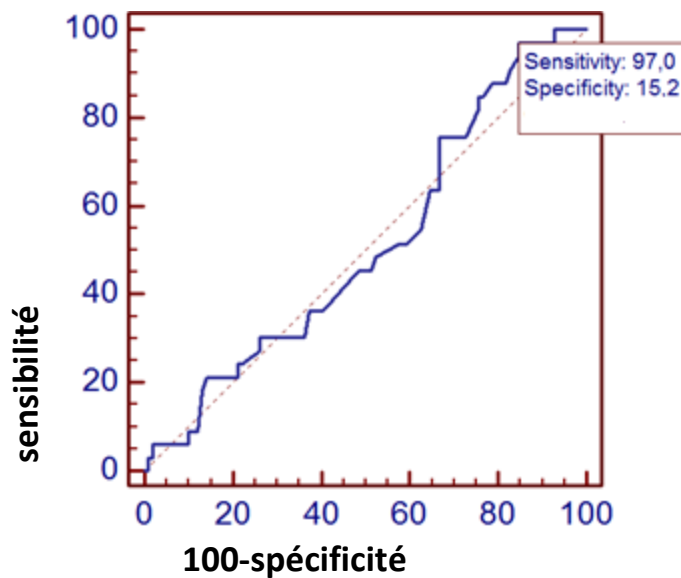


Figure 13 : courbe ROC, valeur prédictive de la concentration spermatique avant capacitation sur les taux de grossesses cliniques.

### 3. Résultats pour les tentatives d'IU

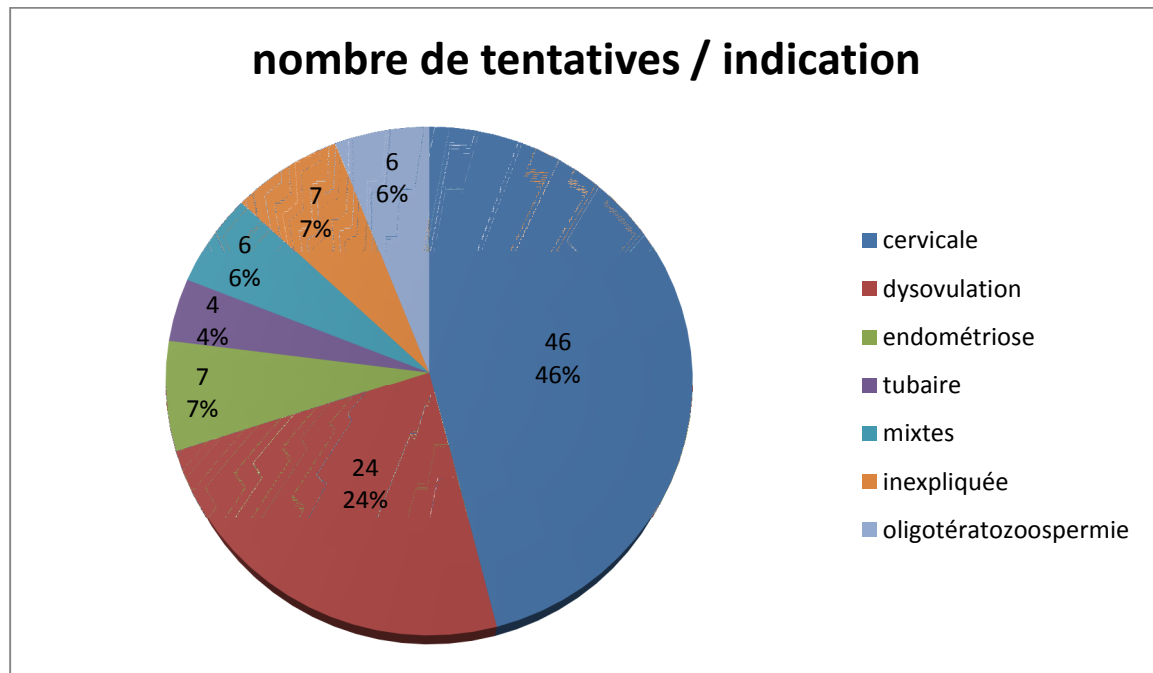
Les caractéristiques générales de la population étudiées (n=102) sont données dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Caractéristiques générales des tentatives en IU**

<b>Paramètres descriptifs</b>	<b>Moyenne des paramètres des tentatives en IU (n=102 cycles/49 couples)</b>
<b>Age de la femme</b>	31 ± 3,5
<b>Age de l'homme</b>	32,7 ± 5,2
<b>Numéro de cycle</b>	2,3 ± 1,7
<b>Concentration en spermatozoïdes avant capacitation (millions/ml)</b>	88,6 ± 61,2
<b>Mobilité (a+b+c) %</b>	69,8 ± 10,3
<b>Mobilité (a+b) %</b>	59,3 ± 12,4
<b>Concentration en spermatozoïdes après capacitation (millions/ml)</b>	49,8 ± 25,5
<b>FT avant capacitation</b>	15,7 ± 8,4
<b>Nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (millions)</b>	9,2 ± 4,5
<b>Taux de grossesse biologique/cycle</b>	19.6%
<b>Taux de grossesse clinique/cycle</b>	17,6%

Dans notre population, l'indication majoritaire est le facteur cervical dans 46,5% des cas (n=48) avec une glaire de mauvaise qualité et/ou une insuffisance de spermatozoïdes mobiles observés dans la glaire lors du test de Hünher (TPC), puis viennent les dysovulations dans 23,5% (n=24) et enfin de façon minoritaire, on retrouve les pathologies tubaires et liées

à l'endométriase dans 12,5% des cas (n=13), les indications masculines dans 5,5% des cas (n=6), mixtes dans 5,5% des cas (n=6) et enfin les causes inexpliquées dans 6,5% des cas (n=7)(figure 14).



**Figure 14 : indications des IIU dans notre population.**

Nous avons analysés l'impact éventuel de la morphologie établie avant capacitation sur les chances de grossesse (tableau 8).

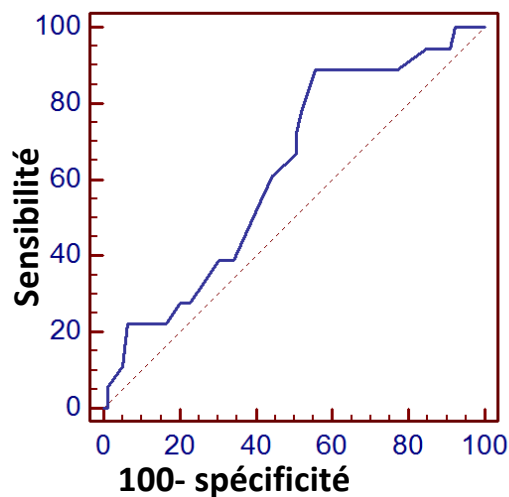
**Tableau 8 : taux de FT en critères stricts avec le CASA et taux de grossesse.**

	Evènement grossesse	Taux de FT (critères stricts) avant capacitation	
<b>Grossesse biologique</b>	<b>Grossesse (BHCG ≥ 100 UI/ml)</b>	13,1% ± 7,5	<b>P=0,15</b>
	<b>Absence de grossesse</b>	16,4% ± 8,5	
<b>Grossesse clinique</b>	<b>Grossesse (activité cardiaque à l'échographie)</b>	13,4% ± 7,5	<b>P=0,24</b>
	<b>Absence de grossesse</b>	16,24% ± 8,5	

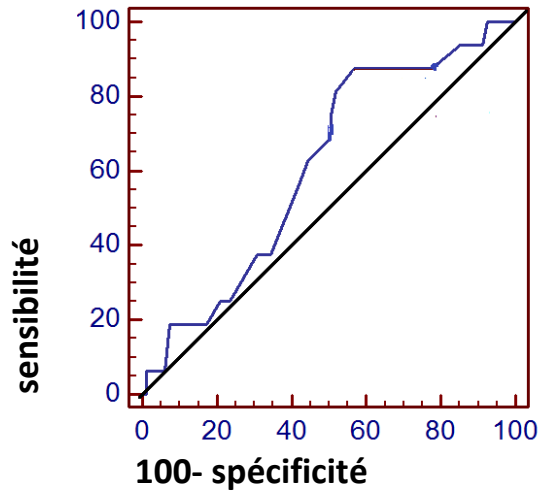
Les taux de FT ne sont pas statistiquement différents dans les deux groupes.

Les courbes ROC ont été utilisées pour analyser l'impact de la morphologie spermatique en critères stricts avec le CASA sur les taux de grossesse et une éventuelle VP. Elles montrent que l'AUC est de 0,626 pour les grossesses biologiques et de 0,610 pour les grossesses cliniques (figures 15 et 16). Ces AUC ne sont pas significativement différentes de 0,5 qui représentent une absence de valeur prédictive pour les FT avant capacitation.

Nous pouvons conclure que la morphologie spermatique évaluée en critères stricts avec le CASA n'a pas de valeur prédictive sur les taux de grossesse biologique et clinique en IIU dans la population étudiée.

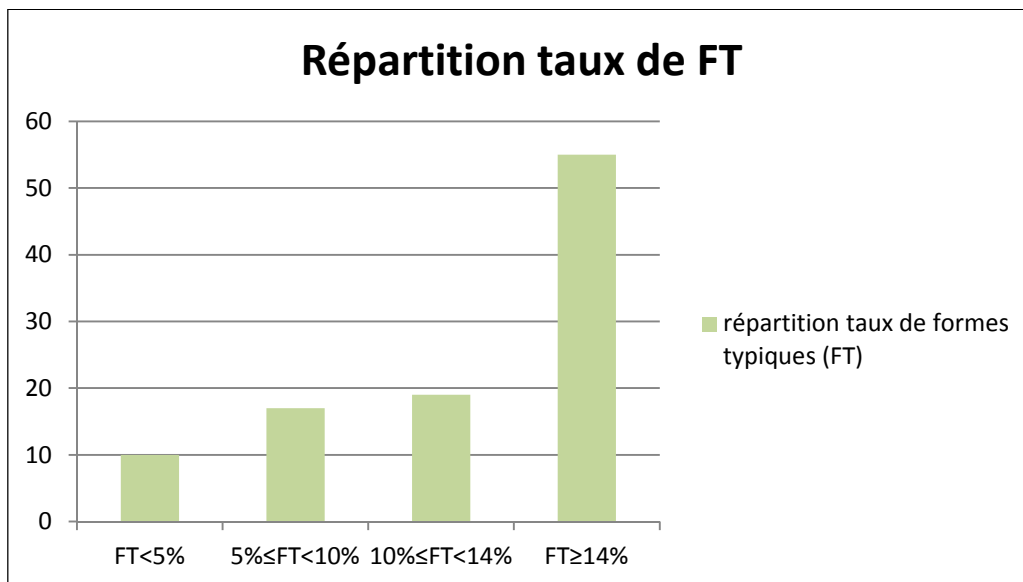


**Figure 15 : Courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation sur les taux de grossesse biologique.**



**Figure 16 : Courbe ROC, valeur prédictive de la morphologie spermatique avant capacitation sur les taux de grossesse clinique.**

La figure 17 représente la répartition des taux de FT parmi les 102 tentatives d'IIU. Nous observons que plus de la moitié des patients avaient un taux de FT  $\geq 14\%$  et pour seulement 10% d'entre eux le taux de FT est  $<5\%$ .



**Figure 17 : répartition du taux de FT avant capacitation dans l'échantillon de population en IIU de notre étude (n=102).**



Nous avons analysé ensuite le rôle éventuel du nombre de spermatozoïdes mobiles dans notre population sur les chances de grossesse.

Le tableau 9 représente les taux de grossesse en fonction du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (NSMI).

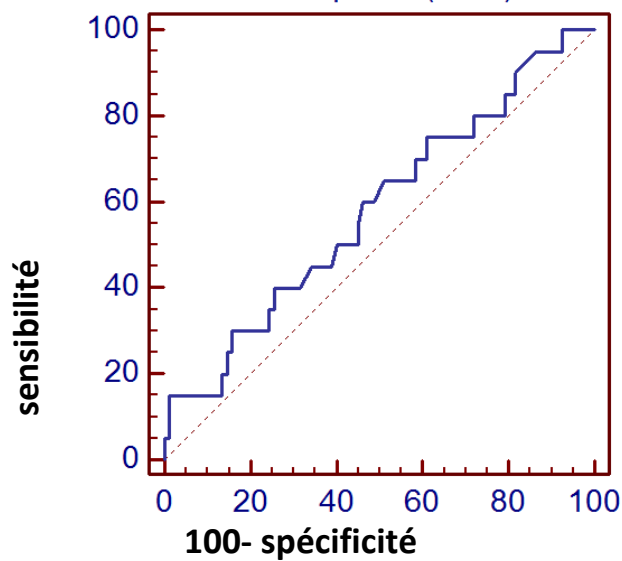
**Tableau 9 : Nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés et taux de grossesse.**

		Nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés	p
<b>Grossesse biologique</b>	Groupe sans grossesse	9,5 ± 4,7	<b>0,27</b>
	Groupe avec grossesse	8 ± 3,9	
<b>Grossesse clinique</b>	Groupe sans grossesse	9,4 ± 4,6	<b>0,21</b>
	Groupe avec grossesse	7,9 ± 4,1	

Nous observons que le NSMI n'est pas significativement différent dans les deux groupes.

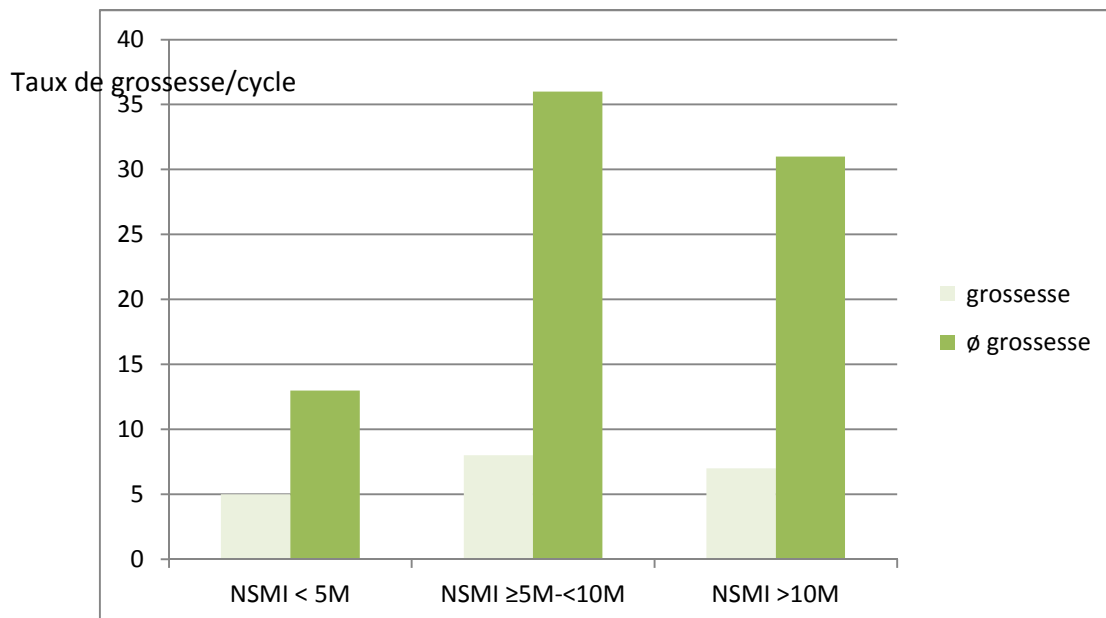
Les courbes ROC sont utilisées pour évaluer l'impact du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (NSMI) sur les taux de grossesse et une éventuelle VP.

Dans notre population, le NMSI était supérieur à 5 millions/ml dans 82,3% des cas (n=84) et inférieur à 5 millions/ml dans 17,7% des cas (n=18). Les AUC à 0,580 et à 0,595 respectivement pour les grossesses biologiques et les grossesses cliniques montrent que le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés n'impacte pas sur la survenue d'une grossesse (figure 18).



**Figure 18 : Courbe ROC, valeur prédictive du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés sur les taux de grossesse biologique et clinique.**

Nous avons analysé aussi les taux de grossesse selon le NSMI en fonction des seuils retrouvés majoritairement dans la littérature : groupe I : tentatives avec un NSMI < 5 millions (M), groupe II :  $5M \leq \text{NSMI} < 10M$  et groupe III avec un NSMI  $\geq 10M$  (figure 19).



**Figure 19 : taux de grossesse en fonction du nombre de spermatozoïdes mobiles (a+b) inséminés. (NSMI : nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés).**

Dans le groupe où le NSMI était  $< 5M$ , nous avons observé 5 grossesses sur 18 tentatives (soit 5% de toutes les tentatives). Dans le groupe «  $5M \leq \text{NSMI} < 10M$  », le taux de grossesse était de 8 % et de 7% dans le groupe où le NSMI était  $> 10M$ . La figure 6 montre que le taux de grossesse est comparable dans les trois groupes (pas de différence significative dans les trois groupes).

### III. DISCUSSION

Le but principal de notre étude prospective était d'évaluer l'impact de la morphologie spermatique selon les critères stricts utilisés dans notre centre depuis janvier 2012, sur les résultats de FIV et d'IU du centre d'AMP de Limoges. La morphologie spermatique a été analysée par le logiciel IVOS (Hamilton Thorne Research), une méthode assistée par ordinateur basée sur les critères stricts de Kruger (CASA).

Nous nous sommes aussi intéressés au nombre de spermatozoïdes à analyser pour rendre un taux de FT fiable et à la concordance possible entre les deux classifications (David et critères stricts de Kruger en CASA).

Enfin, nous avons essayé d'analyser l'impact de la concentration spermatique sur les résultats de FIV et l'impact du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés sur les taux de grossesse en IU.

La première partie de ce travail a consisté à valider la méthode d'analyse de la cytologie par les critères stricts pour l'analyse de 100 spermatozoïdes. Le nombre de spermatozoïdes examinés est un élément important dans la standardisation de l'analyse du sperme. En 1994, *Davis et Gravance*[21] montrent qu'entre différents observateurs, le taux de FT atteint une stabilité avec l'analyse d'au moins 200 spermatozoïdes. *Kruger et al.* (1996)[31] indiquent que l'analyse d'au moins 100 spermatozoïdes est nécessaire. L'OMS 2010 et le manuel Bioforma (structure nationale qui organise la formation continue des biologistes) recommandent l'analyse d'au moins 100 spermatozoïdes et de préférence jusqu'à 200 spermatozoïdes afin d'améliorer la fiabilité du résultat. Nos résultats montrent qu'il existe une très bonne concordance entre les analyses de 100 et de 200 spermatozoïdes (coefficient de concordance à 0,96) avec des limites de concordances acceptables. La lecture de 200 spermatozoïdes est chronophage pour l'observateur, car même si l'IVOS est une méthode semi-automatisée, elle nécessite une confirmation humaine de la validité de chaque image capturée par l'automate. A l'heure de l'accréditation des laboratoires, obligatoire en France pour 2016, cette étude nous permettra de valider la méthode d'analyse de seulement 100 spermatozoïdes au lieu de 200 spermatozoïdes recommandés.

Nous avons vu que la morphologie des spermatozoïdes analysée avec la classification en critères stricts de Kruger peut être réalisée manuellement ou avec une méthode assistée par ordinateur ou CASA [74]. Des études précédentes ont montré une bonne corrélation entre la morphologie spermatique réalisée avec la méthode manuelle et celle réalisée avec le CASA.

L'équipe de *Kruger (1995)[75]* a montré un très bon coefficient de corrélation (0,83) entre la méthode manuelle et la méthode automatisée mais avec une meilleure répétabilité (proche de 0,85) pour le CASA. Dans notre laboratoire, nous utilisons actuellement uniquement le CASA mais la formation du personnel de notre laboratoire pour l'analyse manuelle des critères stricts est en cours (abandon de la classification de David). En effet, pour les éjaculats ayant une faible numération, il est nécessaire d'avoir recours à la méthode manuelle car l'utilisation de l'IVOS dans ces situations n'est pas possible (limites techniques).

En ce qui concerne les variations inter et intra opérateurs, nous avons confirmé dans notre laboratoire une bonne répétabilité ainsi qu'une bonne reproductibilité des résultats obtenus avec le CASA (CV<10% : données de notre laboratoire hors résultats) ce qui répond au besoin de standardiser l'analyse des paramètres spermatiques. Plusieurs études ont auparavant montré une faible variation inter et intra laboratoires du CASA par rapport à la méthode manuelle [19] avec des CV plus bas pour le CASA (< 10% pour *Menkveld et al., 1990[18]* ; *Coetzee et al., 1999 [25]* et pour *Marnet et al., 2000[24]* que pour la méthode manuelle (CV=43% pour *Marnet et al., 2000[24]*). Dans notre étude, les variations inter opérateurs ont été réduites au maximum car toutes les lames ont été analysées sur l'IVOS par une même personne formée (l'auteur).

Alors que l'équipe de *Marnet (2000)[24]* montre une bonne corrélation entre la classification de David et la classification en critères stricts de Kruger (coefficient de corrélation  $r=0,788$ ), dans notre étude nous retrouvons un faible coefficient de corrélation ( $r=0,5$ ) entre les deux systèmes de classification ce qui confirme plutôt les travaux de l'équipe de *Blanchard (2011)[23]* ( $r=0,49$ ).

Une particularité de la classification de David est qu'elle inclut l'analyse du flagelle. Cette analyse du flagelle n'est pas complète avec le CASA. Par exemple l'IVOS reconnaît les spermatozoïdes avec un flagelle enroulé à son extrémité mais ne reconnaît pas ceux avec le flagelle complètement enroulé autour de la tête du spermatozoïde. On peut se demander si l'absence d'analyse du flagelle peut avoir une conséquence sur la qualité de nos résultats. Les anomalies du flagelle sont étroitement liées à la mobilité des spermatozoïdes. *Blanchard et al. (2010)[23]* considèrent que l'évaluation de la mobilité réalisée systématiquement lors du spermogramme suffit à détecter des anomalies flagellaires. *Marnet et al. (2000)[24]* trouvent une bonne corrélation entre le pourcentage d'anomalies du flagelle et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ( $r=-0,613$ ). Ce manque d'analyse du flagelle des spermatozoïdes par le CASA n'est donc pas considéré comme un facteur altérant la qualité des résultats par tous les auteurs.

Dans notre laboratoire, une anomalie récurrente présente sur la lame d'un échantillon de sperme va être repérée par l'observateur qui analyse la lame sur l'IVOS et la notera sur le résultat du spermogramme en commentaire. Par exemple, une fréquence importante de spermatozoïdes enroulés sera signalée en commentaire indépendamment des résultats du CASA.

La deuxième partie de notre étude a voulu apprécier la force de la corrélation entre la morphologie spermatique et les taux de fécondation. Cette morphologie spermatique en critères stricts est reconnue comme étant le facteur le plus prédictif sur les résultats de FIV pour un nombre important d'auteurs [17, 36, 52, 54].

*Kruger et al. (1996)[31]*, *Coetzee et al. (1999)[25]* et *Blanchard et al. (2010)[23]* mettent en évidence un impact significatif de la morphologie spermatique (critères stricts manuels et CASA pour *Kruger* et CASA pour les deux autres) sur les taux de fécondation et de grossesse en FIV.

*Blanchard et al. (2010)[23]* ont montré dans leur étude une meilleure valeur prédictive sur les résultats en FIV de la morphologie en critères stricts (CASA) qu'avec la classification de David.

Dans notre étude, nous avons évalué l'impact de la morphologie spermatique en critères stricts uniquement et nous montrons une corrélation modeste ( $r=0,230$ ) mais significative entre la morphologie spermatique et les taux de fécondation. Nous avons ensuite essayé de définir un seuil prédictif de taux de FT propre à notre pratique car il est difficile de se référer à la littérature.

En effet, de nombreux auteurs ont décrit des seuils de FT prédictifs des résultats en FIV. Ces seuils sont différents d'une étude à une autre (tableau 1). Certains auteurs ont précédemment déterminé un seuil normal de FT à 14% [17, 70], d'autres à 12% [54]. L'équipe de Kruger a fait une distinction entre plusieurs groupes : le groupe avec un taux de FT supérieur à 14% est le groupe normal, le groupe G-pattern (bon pronostic) correspond à un taux de FT compris entre 4% et 14% et le groupe P-pattern (faible pronostic) à un taux de FT inférieur à 4%. Dans cette étude des taux de fécondation significativement plus élevés sont retrouvés dans le groupe « normal » par rapport aux deux autres groupes mais pas de différence significative entre les groupes « bon » et « faible pronostic ». Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de *Robinson et al. (1994)[62]*.

Dans leur étude prospective en 2010, *Blanchard et al.*[23] définissent un seuil de FT à 16% (CASA) avec une augmentation significative des taux de fécondation au-dessus de ce seuil.

Dans notre étude, nous avons fait le choix d'analyser les 133 tentatives de FIV consécutives car nous voulions observer l'impact général de la morphologie sur nos résultats de FIV. Dans l'étude de *Blanchard et al.* (2010)[23], ont été incluses les tentatives avec un sperme normal en termes de concentration et de mobilité afin d'observer uniquement l'impact de la tératozoospermie isolée.

Dans la population de notre étude, les éjaculats avaient des concentrations en spermatozoïdes et des mobilités normales sauf deux patients qui avaient une concentration en spermatozoïdes légèrement inférieure au seuil défini par l'OMS et un patient qui avait une mobilité en dessous de la norme fixé par l'OMS. Ceci s'explique par les indications de choix d'une FIV. En effet, dans notre centre depuis janvier 2012 une FIV est décidée lorsque le nombre de spermatozoïdes mobiles (NSM) après capacitation est compris entre 1 et 5 millions et que le taux de FT est supérieur à 4% avant capacitation.

Deux groupes ont été définis en fonction du taux de fécondation (groupe I : <30% et groupe II :  $\geq 30\%$ ) car dans notre pratique courante, un taux de fécondation < 30% est considéré comme une paucifécondation.

Les résultats des courbes ROC de notre étude obtenus avec le CASA en critères stricts permettent certaines interprétations : pour des valeurs de  $FT \geq 16\%$  avant capacitation le taux de fécondation moyen est à 55,7% alors qu'en dessous de ce seuil il est à 44%. Cette différence de taux de fécondation est proche de la significativité dans notre étude ( $p=0,06$ ) alors qu'elle est significative dans l'étude de l'équipe de *Blanchard*. Pour les patients ayant un taux de  $FT \geq 16\%$  avant capacitation, la VPN de ce seuil est de 82% ce qui correspond à un bon pronostic de succès de fécondation. Nos résultats viennent confirmer ceux de *Blanchard et al.* qui retrouvent une VPN de leur seuil à 75% avant capacitation. Nous retrouvons dans notre étude une VPP du seuil de FT à 44% (54% dans l'étude de *Blanchard*) c'est-à-dire une probabilité de 44% d'avoir une paucifécondation en dessous du seuil de 16% de FT. Nous pourrions donc envisager, en accord avec ces résultats, de réaliser une ICSI lorsque le taux de FT est inférieur à 16% car notre but est d'éviter les pauci ou les échecs de fécondation.

Cependant certains auteurs contestent l'importance de la morphologie spermatique comme paramètre prédictif des résultats en FIV que ce soit sur les taux de fécondation et/ou les taux de grossesse [56, 76]. L'évaluation seule de la morphologie spermatique est insuffisante pour prédire les résultats en FIV[63].

Plusieurs équipes ont tenté de montrer que l'ICSI améliore les taux de fécondation dans les tératozoospermies isolées [67, 68] alors que d'autres ne montrent aucune amélioration par l'ICSI des taux de fécondation et/ou taux de grossesse [56, 61, 62].

*Lundin et al.* (2007)[57] ont réalisé une étude prospective d'un an, sans analyse de la morphologie avant traitement. Si les paramètres spermatiques semblaient normaux dans l'ensemble, avec plus d'un million de spermatozoïdes mobiles, une FIV conventionnelle était réalisée. Ils ont réalisé 400 cycles au total. Le taux global d'échec de fécondation était de 4%. Le taux d'ICSI est passé de 61% à 48% après ce travail dans leur laboratoire en Suède. A ce jour ils n'étudient plus la morphologie spermatique et pratiquent une FIV systématique en première intention quand les valeurs spermatiques de base sont normales et qu'il y a plus d'un million de spermatozoïdes mobiles. Ils réalisent 150 ICSI en moins par an. Cette même équipe avait précédemment montré en 1997 et en 2006 des taux de fécondation élevés (>50%) chez 36% des patients avec un taux de FT < 5% (taux de fécondation évalués à 59,3% quand le taux de FT < 5% pour *Coetzee et al.*, 1998)[25].

La difficulté de trancher entre une FIV ou une ICSI dans les cas de tératozoospermies isolées (hors certaines anomalies monomorphes comme la globozoospermie) paraît bien réelle. L'utilisation seule d'un seuil de FT dans le choix d'une technique est difficile, même lors de tératozoospermies sévères. Il faut souligner le fait que l'évaluation de la morphologie spermatique, comme les autres paramètres spermatiques, n'évalue qu'une infime partie de toutes les étapes de la fécondation [23].

Nous retrouvons dans notre étude un coefficient de détermination ( $R^2$ ) à 5,3%, ce qui signifie que le taux de FT explique seulement 5,3% des taux de fécondation. Ce coefficient  $R^2$  est rarement mentionné dans les différentes études de la littérature bien que ce soit un élément important pour valider l'importance d'un paramètre étudié. Malgré cela, nous envisageons de préconiser le choix de l'ICSI (technique plus invasive) en première intention lorsque le taux de FT est inférieur à 16% avant capacitation. Sur ces seuls résultats cela conduirait à la réalisation d'un certain nombre d'ICSI inutiles. Cependant, nous envisageons d'inclure ce seuil dans nos critères de décisions afin d'éviter les échecs de fécondation. Une prochaine étude vérifiera l'impact de ce changement.

L'évaluation de la morphologie spermatique n'est donc pas absolue dans ses prédictions sur la fécondation. Les différentes études de la littérature sont difficiles à comparer car la plupart sont des études rétrospectives, avec pour certaines un nombre de patients inclus insuffisant et des méthodologies différentes d'une étude à une autre (en particulier des



classifications de la morphologie différentes). D'autres n'ont évalué que le taux de grossesse [51, 60, 61], avec des définitions différentes de la grossesse selon les auteurs.

Il serait intéressant de réaliser d'autres études sur des échantillons plus importants pour augmenter la puissance statistique. En effet il paraît toujours difficile à l'heure actuelle de conclure sur des térazoospermies isolées. Dans sa thèse[77], le Docteur Béguet a montré dans notre service en 2009 sur un échantillon de 785 tentatives de FIV que le changement de bain à 3 heures et les taux de FT (classification de David) étaient des variables indépendantes et significativement liées aux taux de fécondation. Il n'avait pas été possible de déterminer un seuil de FT en partie à cause de la subjectivité liée à l'analyse de la morphologie spermatique avec la classification de David. A cette époque, il avait été conclu une nécessité de poursuivre le travail avec un possible changement de classification afin d'obtenir un seuil prédictif.

Dans la troisième partie de notre étude nous avons évalué l'impact de la morphologie spermatique sur les taux de grossesse. Ils ne sont pas retrouvés significativement différents entre les deux groupes selon le seuil de FT à 16%. Cependant, on peut s'attendre à une augmentation du nombre d'embryons congelables avec l'augmentation des taux de fécondation, il sera donc intéressant d'évaluer l'augmentation éventuelle des taux de grossesses cumulées après décongélation et transfert de ces embryons supplémentaires. Les taux de grossesse étaient aussi similaires entre les groupes selon le seuil de 16% dans l'étude de *Blanchard et al. (2010)[23]*.

*Hotaling et al. (2010) [61]* dans une revue de la littérature ne trouvaient pas d'impact significatif de la morphologie spermatique sur les taux de grossesse. Mais d'autres auteurs ont retrouvé une diminution des taux de grossesse dans les térazoospermies isolées [17, 70, 78, 79].

Une autre partie de notre travail s'est intéressé à l'impact de la concentration en spermatozoïdes avant et après capacitation sur les taux de fécondation et les taux de grossesse. A l'encontre de ce qui est retrouvé chez beaucoup [36, 80], nous ne retrouvons pas de valeur prédictive de la numération ni sur les taux de fécondation ni sur les taux de grossesse. Nous rappelons que dans notre population tous nos patients ont une numération normale (sauf deux patients qui ont une légère oligospermie) ce qui explique probablement le fait que nous ne retrouvons pas de valeur prédictive significative.

Nous ne pouvons donc pas conclure en ce qui concerne l'impact de la numération sur les taux de fécondation et de grossesse car il n'a pas été possible de l'évaluer dans les cas de numérations basses en spermatozoïdes.

Tableau 1 : Différents seuils de FT en critères stricts prédictifs des résultats de FIV selon les auteurs (DS : différence significative ; DNS : différence non significative).

Études	Influence des FT sur les Taux de fécondation	Influence sur les Taux de grossesse/transfert	Seuil
<i>F. KRUGER et al. 1986 (n=190), 1987 (n=96)</i>	Diminution (DS)	Diminution (DS)	≤14%
<i>Vawda et al.(1996) (n=120)</i>	Augmentation (DS) Diminution (DS)	Non évalué	≥12% <4%
<i>Ombelet et al., (1994) (n=68)</i>	Diminution DNS I vs II DS I vs III	Diminution (DS) (I vs II et III)	I : ≥9% II : 5-8% III : <5%
<i>B. Marnet et al. (2000) CASA (n=102)</i>	Diminution (DS)	Non évalué	13% (<25 <sup>ème</sup> percentile)
<i>Lundin et al.(1997) (n=622)</i>	Augmentation (DS)	NS	>10%
<i>M Blanchard et al. CASA (2010)(n=120)</i>	Augmentation (DS)	NS	>16%
<i>Etude du centre d'AMP CHU Limoges (n=133) CASA</i>	Augmentation (DS)	NS	≥16%

La dernière partie de notre travail a consisté à évaluer l'impact de la morphologie spermatique puis du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés sur les taux de grossesse dans les IUI.

Dans notre étude, il ressort que la morphologie spermatique évaluée avec le CASA n'a pas de valeur prédictive sur les taux de grossesse après IUI.

Jusqu'à présent les différentes études sur la corrélation entre la morphologie spermatique et les résultats en IUI sont encore confuses en particulier lorsque l'on regarde l'impact de la tératozoospermie isolée.

Alors que certains auteurs ne retrouvent pas de corrélation significative entre la morphologie spermatique et les taux de grossesse [48-50]. D'autres auteurs avancent un seuil à 4% au-dessous duquel le taux de grossesse baisse significativement (les autres paramètres spermatiques étant normaux). *Van Waart et al.* (2001)[46] et *Lee et al.* (2002)[81] ont montré une augmentation significative des taux de grossesse quand le taux de FT était supérieur à 4%.

*Spießens et al.* (2003)[42] ont rapporté des taux de grossesse et de naissance vivante comparables entre le groupe « tératozoospermie » et le groupe « normozoospermie » mais un taux cumulé de naissance abaissé après quatre cycles d'IUI chez les patients avec une tératozoospermie <4%. Ce résultat est retrouvé pour les taux de grossesse par cycle par l'équipe de *Grigoriou et al.* en 2005 [47].

*Sun et al.* (2012)[43] retrouvent des taux de grossesse plus bas lorsque le taux de FT est inférieur à 5%.

Dans leur étude en 2004, *Shibahara et al.*[82] trouvent en utilisant les courbes ROC une valeur prédictive de la morphologie spermatique sur les taux de grossesse en IUI avec un seuil à 15,5% en critères stricts.

Les études sont très controversées, dans beaucoup d'études la tératozoospermie est rarement isolée et associée à des anomalies des autres paramètres spermatiques. Il faut aussi préciser que les seuils de normalité des différents paramètres spermatiques ont évolué au fil des différentes versions de l'OMS, ainsi en fonction de l'année de l'étude, les seuils des paramètres spermatiques utilisés sont différents. Les méthodologies diffèrent également d'une étude à une autre et nous trouvons dans la littérature que très peu d'études

prospectives. Enfin les taux de grossesse dépendent d'autres facteurs comme la durée de l'infertilité mais aussi surtout de l'âge de la femme [43].

Dans notre étude, le nombre de couple avec un taux de FT inférieur à 5% est très faible (10%). Il n'est donc pas possible de conclure pour des FT inférieures à 5%, ce qui aurait pourtant été intéressant. Notre étude manque de puissance mais à ce jour, nous poursuivons l'analyse de la morphologie spermatique le jour de la tentative d'IIU, ce qui pourra permettre d'avoir un échantillon suffisant pour espérer conclure sur ce sujet.

L'autre paramètre à évaluer dans les chances de grossesse après IIU est le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (NSMI). Il a été étudié dans de nombreuses études [44, 45, 50, 83, 84] avec des seuils différents en fonction des équipes qui sont corrélés à un taux optimal de succès en IIU. Le NSMI après capacitation varie de 0,8 à 10 millions selon les auteurs (tableau 2).

Dans l'étude de *Wainer et al.* (2004)[50], le taux de grossesse par cycle était significativement inférieur dans le groupe avec un NSMI à moins de 1 million (M) par rapport au groupe « NSMI >2M ». Plusieurs auteurs avaient évoqué ce seuil auparavant et recommandaient la réalisation d'une FIV lorsque le NSMI était inférieur à 1 M [85-87, 89].

D'autres auteurs ont suggérés l'utilisation du NSMI pour le choix entre la réalisation d'IIU ou de FIV et ont évoqué des seuils allant de 5 à 10 M [44, 45, 84, 88] avec des taux de grossesse augmentés lorsque le NSMI était au-dessus de ce seuil. A défaut l'indication de l'IIU doit être rediscutée [50].

Enfin certains auteurs ont analysés le taux de grossesse en fonction du NSMI et de la morphologie spermatique. *Ombelet et al.* (1997)[41] suggèrent que le NSMI peut compenser des taux de FT basses (<4%) et *Wainer et al.* (2004)[50] recommandent un NSMI à 5M lorsqu'il y a une tétrazoospermie.

Dans notre étude, le NSMI n'est pas prédictif des taux de grossesse contrairement à d'autres. Cela peut s'expliquer par le fait que dans notre centre et en fonction des paramètres féminins compatibles avec une IIU, nous programmons les IIU lorsque le NSMI est supérieur à 5 M. La majorité des tentatives ont donc été réalisées avec plus de 5 M de spermatozoïdes mobiles inséminés (SMI) (88/102 tentatives soit 82,6%) et aucune n'a été réalisé avec moins de 1 M. Notre étude montre que notre seuil à 5 millions de SMI est vraisemblablement encore trop élevé en accord avec la littérature. Nous envisageons à la

suite de ce travail de baisser notre NSMI nécessaire pour les IIU à 2 M comme l'équipe d'AMP du CHU de Toulouse, tout en surveillant l'évolution du taux de grossesse.

**Tableau 2 : Influence du nombre de spermatozoïdes inséminés (NMSI) sur les taux de grossesse en fonction des différents seuils (DS : différence significative ; NS : non significatif ; M : millions).**

Etudes	Influence sur les taux de grossesse/cycle	NMSI seuil
<i>Wainer et al., 2004</i> (n=2564)	Diminution (DS)	<1 M si FT normales vs 2M <5M si FT < 30% (OMS 1992)
<i>Berg et al, 1997</i>	Augmentation (NS)	>0,8M
<i>Demir et al., 2011 (n=253) ;</i> <i>Dorjpurev et al., 2011 (n=1177)</i>	Augmentation (DS)	>10 M
<i>Ombelet et al., 1997 (n=792)</i>	Augmentation (DS)	1 M si FT>4%
<i>Merviel et al., 2010 (n=353)</i>	Augmentation (DS)	>5 M
<i>Badawy et al., 2009 (n=714)</i>	Augmentation (DS)	>5M

## CONCLUSION

Le but de notre étude prospective était d'évaluer la morphologie spermatique en critères stricts avec une méthode assistée par ordinateur l'IVOS (Integrated Visual Optical System) et son éventuelle valeur prédictive (VP) sur les résultats de FIV et d'IU du centre d'AMP de Limoges.

Nous avons d'abord prouvé l'absence de bénéfice à analyser 200 spermatozoïdes plutôt que 100 avec le CASA en mettant en évidence une très bonne corrélation entre les deux taux de FT (100 versus 200 spermatozoïdes). Nous avons aussi vérifié la mauvaise corrélation entre la classification de David et les critères stricts de Kruger, ce qui conforte la nécessité de l'abandon de la classification de David dans notre centre.

Dans ce travail, nous n'avons pas retrouvé d'impact de la morphologie spermatique comme facteur indépendant sur les taux de grossesse en IU. Le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés en IU n'a pas été retrouvé comme ayant un impact sur les taux de grossesse avec un seuil à 5 millions. Cette dernière constatation va permettre dans notre centre de baisser le seuil de spermatozoïdes mobiles inséminés et ainsi permettre une augmentation du nombre de couples pris en charge en IU.

Notre travail a permis de mettre en évidence une influence significative de la morphologie spermatique évaluée en critères stricts avec le CASA sur les taux de fécondation en FIV. Il a aussi été possible de déterminer un seuil (16 % de FT avant capacitation) ayant une bonne valeur prédictive de succès de fécondation. Les taux de grossesse en fonction de ce seuil ne sont pas significativement différents. Les taux de grossesse ne sont pas retrouvés significativement différents entre les deux groupes selon le seuil de FT à 16 % mais il sera intéressant d'évaluer l'augmentation éventuelle des taux de grossesses cumulées après décongélation et transfert des embryons supplémentaires préalablement congelés. Il est probable que nous adoptions ce seuil en concertation avec les gynécologues afin d'orienter nos couples vers une ICSI de première intention lorsque le taux de FT est inférieur ou égal à 16%. Cette mesure pourrait nous permettre d'éviter les échecs de fécondation ainsi que les paucifécondations qui pénalisent les couples.

Tous ces changements devront être évalués pour en vérifier l'efficacité ou non avec une préoccupation constante d'améliorer la prise en charge des couples en AMP.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOIVIN J., BUNTING L., COLLINS J.A., et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007, 22(6): p. 1506-12.
2. MASCARENHAS MN F.S., BOERMA T, VANDERPOEL S, STEVENS GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* , 2012, 9(12).
3. SLAMA R., DUCOT B., KEIDING N., et al. La fertilité des couples en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 2012: p. 87-91.
4. THONNEAU P., MARCHAND S., TALLEC A., et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod*, 1991, 6(6): p. 811-6.
5. SPIRA A. Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod*, 1986, 1(2): p. 111-5.
6. HASSAN M.A. and KILLICK S.R. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril*, 2003, 79 Suppl 3: p. 1520-7.
7. DUNSON D.B., BAIRD D.D. and COLOMBO B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*, 2004, 103(1): p. 51-6.
8. PISON G. France 2009 : l'âge moyen à la maternité atteint 30 ans. *Population & Sociétés*, *Bulletin mensuel d'information de l'Institut national d'études démographiques*, 2010, 465.
9. THONNEAU P., QUESNOT S., DUCOT B., et al. Risk factors for female and male infertility: results of a case-control study. *Hum Reprod*, 1992, 7(1): p. 55-8.
10. WHO. (2010) *World Health Organisation laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 5<sup>th</sup>ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
11. DAVID G B.J., CZYGLIK F, JOUANNET P, et al. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1) Propositions pour un système de classification. *J Gyn Obstet Biol Reprod.*, 1975, 4 (suppl.1) : p. 17–36.
12. JOUANNET P., DUCOT B., FENEUX D., et al. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*, 1988, 11(5): p. 379-94.
13. AUGER J. and EUSTACHE F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 2000, 10: p. p.358-25.
14. 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(6): p. 1165-71.
15. MORTIMER D M.R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl.* , 2001, 22(2): p. 192-205.
16. KRUGER T.F., ACOSTA A.A., SIMMONS K.F., et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1988, 49(1): p. 112-7.
17. KRUGER T.F., MENKVELD R., STANDER F.S., et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986, 46(6): p. 1118-23.
18. MENKVELD R., STANDER F.S., KOTZE T.J., et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, 1990, 5(5): p. 586-92.
19. BARROSO G., MERCAN R., OZGUR K., et al. Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. *Hum Reprod*, 1999, 14(8): p. 2036-40.
20. OMBELET W., POLLET H., BOSMANS E., et al. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum Reprod*, 1997, 12(5): p. 1015-20.

21. DAVIS RO G.C. Consistency of sperm morphology classification methods. *J Androl.*, 1994, 15: p. 83-91.
22. ELIASSON R. Standards for investigation of human semen. . *Andrologie*, 1971, 3: p. 49–64.
23. BLANCHARD M., HAGUENOER K., APERT A., et al. Sperm morphology assessment using David's classification: time to switch to strict criteria? Prospective comparative analysis in a selected IVF population. *Int J Androl*, 2011, 34(2): p. 145-52.
24. MARNET B., VIEITEZ G., MILHET P., et al. Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *Int J Androl*, 2000, 23(1): p. 22-8.
25. COETZEE K., KRUGER T.F., LOMBARD C.J., et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril*, 1999, 71(1): p. 80-4.
26. WHO. 1992 World Health Organisation laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 3<sup>rd</sup>ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
27. MORBECK D.E., LEONARD P.H., WEAVER A.L., et al. Sperm morphology: classification drift over time and clinical implications. *Fertil Steril*, 96(6): p. 1350-4.
28. COOPER T.G., NOONAN E., VON ECKARDSTEIN S., et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(3): p. 231-45.
29. FRANKEN D.R., MENKVELD R., KRUGER T.F., et al. Monitoring technologist reading skills in a sperm morphology quality control program. *Fertil Steril*, 2003, 79 Suppl 3: p. 1637-43.
30. COETZEE K., KRUGE T.F. and LOMBARD C.J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(1): p. 73-82.
31. KRUGER L. The functional morphology of thin sensory axons: some principles and problems. *Prog Brain Res*, 1996, 113: p. 255-72.
32. MENKVELD R., LACQUET F.A., KRUGER T.F., et al. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*, 1997, 29(1): p. 1-7.
33. COETZEE K., KRUGER T.F., VANDENDAEL A., et al. Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia*, 1997, 29(3): p. 133-5.
34. GARCEAU L., HENDERSON J., DAVIS L.J., et al. Economic implications of assisted reproductive techniques: a systematic review. *Hum Reprod*, 2002, 17(12): p. 3090-109.
35. PHILIPS Z., BARRAZA-LLORENS M. and POSNETT J. Evaluation of the relative cost-effectiveness of treatments for infertility in the UK. *Hum Reprod*, 2000, 15(1): p. 95-106.
36. GUZICK D.S., OVERSTREET J.W., FACTOR-LITVAK P., et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, 2001, 345(19): p. 1388-93.
37. OMBELET W., PUTTEMANS P. and BOSMANS E. Intrauterine insemination: a first-step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. *Hum Reprod*, 1995, 10 Suppl 1: p. 90-102.
38. COHLEN B.J., VANDEKERCKHOVE P., TE VELDE E.R., et al. Timed intercourse versus intra-uterine insemination with or without ovarian hyperstimulation for subfertility in men. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000(2): p. CD000360.
39. GOVERDE A.J., MCDONNELL J., VERMEIDEN J.P., et al. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet*, 2000, 355(9197): p. 13-8.
40. MONTANARO GAUCI M., KRUGER T.F., COETZEE K., et al. Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. *Andrologia*, 2001, 33(3): p. 135-41.
41. OMBELET W., WOUTERS E., BOELS L., et al. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl*, 1997, 20(6): p. 367-72.



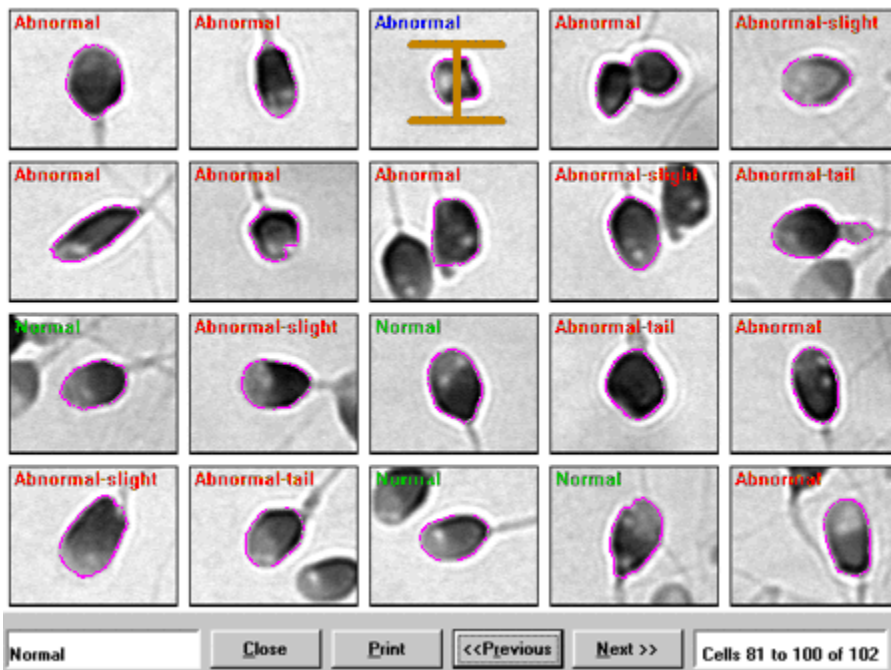
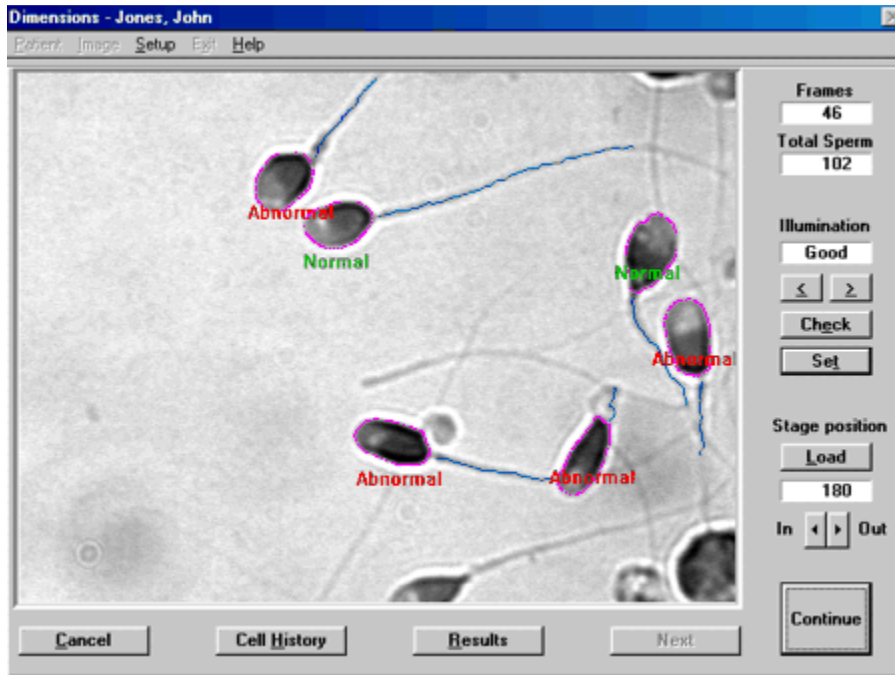
42. SPIESSENS C., VANDERSCHUEREN D., MEULEMAN C., et al. Isolated teratozoospermia and intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2003, 80(5): p. 1185-9.
43. SUN Y., LI B., FAN L.Q., et al. Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normal sperm concentration and motility? *Andrologia*, 2012, 44(5):299-304. doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01280.x. Epub 2012 Feb 16(5): p. p299-304.
44. DEMIR B., DILBAZ B., CINAR O., et al. Factors affecting pregnancy outcome of intrauterine insemination cycles in couples with favourable female characteristics. *J Obstet Gynaecol*, 2010, 31(5): p. 420-3.
45. OMBELET W., DEBLAERE K., BOSMANS E., et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7(4): p. 485-92.
46. VAN WAART J., KRUGER T.F., LOMBARD C.J., et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(5) : p. 495-500.
47. GRIGORIOU O., PANTOS K., MAKRAKIS E., et al. Impact of isolated teratozoospermia on the outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2005, 83(3): p. 773-5.
48. KARABINUS D.S. and GELETY T.J. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril*, 1997, 67(3): p. 536-41.
49. MATORRAS R., CORCOSTEGUI B., PEREZ C., et al. Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. *Fertil Steril*, 1995, 63(3): p. 608-11.
50. WAINER R., ALBERT M., DORION A., et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod*, 2004, 19(9): p. 2060-5.
51. CHEN X., ZHANG W., LUO Y., et al. Predictive value of semen parameters in in vitro fertilisation pregnancy outcome. *Andrologia*, 2009, 41(2): p. 111-7.
52. ENGINSU M.E., DUMOULIN J.C., PIETERS M.H., et al. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 1991, 6(6): p. 854-8.
53. OEHNINGER S., ACOSTA A.A., KRUGER T., et al. Failure of fertilization in in vitro fertilization: the "occult" male factor. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1988, 5(4): p. 181-7.
54. VAWDA A.I., GUNBY J. and YOUNGLAI E.V. Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. *Hum Reprod*, 1996, 11(7): p. 1445-50.
55. LUNDIN K., SODERLUND B. and HAMBERGER L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*, 1997, 12(12): p. 2676-81.
56. KEEGAN B.R., BARTON S., SANCHEZ X., et al. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2007, 88(6): p. 1583-8.
57. LUNDIN K. [The impact of sperm morphology analysis on IVF results]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2007, 36 Suppl 3: p. S69-73.
58. NALLELLA K.P., SHARMA R.K., AZIZ N., et al. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*, 2006, 85(3): p. 629-34.
59. FIGUEIREDO H., TAVARES A., FERRAS L., et al. Isolated teratozoospermia and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13(1): p. 64-8.
60. DUBEY A., DAYAL M.B., FRANKFURTER D., et al. The influence of sperm morphology on preimplantation genetic diagnosis cycles outcome. *Fertil Steril*, 2008, 89(6): p. 1665-9.
61. HOTALING J.M., SMITH J.F., ROSEN M., et al. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): p. 1141-5.

62. ROBINSON J.N., LOCKWOOD G.M., DOKRAS A., et al. Does isolated teratozoospermia affect performance in in-vitro fertilization and embryo transfer? *Hum Reprod*, 1994, 9(5): p. 870-4.
63. FAN W., LI S.W., LI L., et al. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in the case of isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(9): p. 905-10.
64. VAN STEIRTEGHEM A.C., NAGY Z., JORIS H., et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1993, 8(7): p. 1061-6.
65. BUKULMEZ O., YARALI H., YUCEL A., et al. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*, 2000, 73(1): p. 38-42.
66. RUIZ A., REMOHI J., MINGUEZ Y., et al. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 1997, 68(1): p. 171-3.
67. PISARSKA M.D., CASSON P.R., CISNEROS P.L., et al. Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertil Steril*, 1999, 71(4): p. 627-32.
68. ZHU Y., WU Q.F., ZHOU X.J., et al. ICSI improves fertilization in isolated teratozoospermic men: a study with strictly controlled external factors and WHO-5 standard. *Syst Biol Reprod Med*, 2013, 59(1): p. 21-6.
69. DEMIR B., ARIKAN II, BOZDAG G., et al. Effect of sperm morphology on clinical outcome parameters in ICSI cycles. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2012, 39(2): p. 144-6.
70. KRUGER T.F., ACKERMAN S.B., SIMMONS K.F., et al. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl*, 1987, 18(3): p. 275-7.
71. LACQUET F.A., KRUGER T.F., DU TOIT T.C., et al. Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Arch Androl*, 1996, 36(2): p. 133-8.
72. SCOTT L., ALVERO R., LEONDIRES M., et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*, 2000, 15(11): p. 2394-403.
73. BLAND J.M. and ALTMAN D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1(8476): p. 307-10.
74. KRUGER T.F., DUTOIT T.C., FRANKEN D.R., et al. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril*, 1993, 59(1): p. 202-9.
75. KRUGER T.F., DU TOIT T.C., FRANKEN D.R., et al. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril*, 1995, 63(1): p. 134-41.
76. GHIRELLI-FILHO M., MIZRAHI F.E., POMPEO A.C., et al. Influence of strict sperm morphology on the results of classic in vitro fertilization. *Int Braz J Urol*, 2012, 38(4): p. 519-28.
77. BEGUER M., *Analyse descriptive des résultats de fécondation in vitro sans et avec micro-injection au laboratoire d'AMP du CHU de Limoges de 2003 à 2006. Tentative de construction d'un score embryonnaire* 2009. 164 p.
78. KOBAYASHI T., JINNO M., SUGIMURA K., et al. Sperm morphological assessment based on strict criteria and in-vitro fertilization outcome. *Hum Reprod*, 1991, 6(7): p. 983-6.
79. OMBELET W., FOURIE F.L., VANDEPUT H., et al. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum Reprod*, 1994, 9(8): p. 1479-84.
80. BONDE J.P., ERNST E., JENSEN T.K., et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 1998, 352(9135): p. 1172-7.
81. LEE R.K., HOU J.W., HO H.Y., et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl*, 2002, 25(5): p. 277-80.
82. SHIBAHARA H., OBARA H., AYUSTAWATI, et al. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *Int J Androl*, 2004, 27(2): p. 63-8.

83. BADAWY A., ELNASHAR A. and ELTOTONGY M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2009, 91(3): p. 777-81.
84. MERVIEL P., HERAUD M.H., GRENIER N., et al. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril*, 2008, 93(1): p. 79-88.
85. CAMPANA A., SAKKAS D., STALBERG A., et al. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod*, 1996, 11(4): p. 732-6.
86. MILLER D.C., HOLLENBECK B.K., SMITH G.D., et al. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*, 2002, 60(3): p. 497-501.
87. WAINER R., MERLET F., BAILLY M., et al. [Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm]. *Contracept Fertil Sex*, 1996, 24(12): p. 897-903.
88. DORJPUREV U., KUWAHARA A., YANO Y., et al. Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *J Med Invest*, 2011, 58(1-2): p. 127-33.
89. BERG U., BRUCKER C. and BERG F.D. Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 1997, 67(4): p. 747-50.

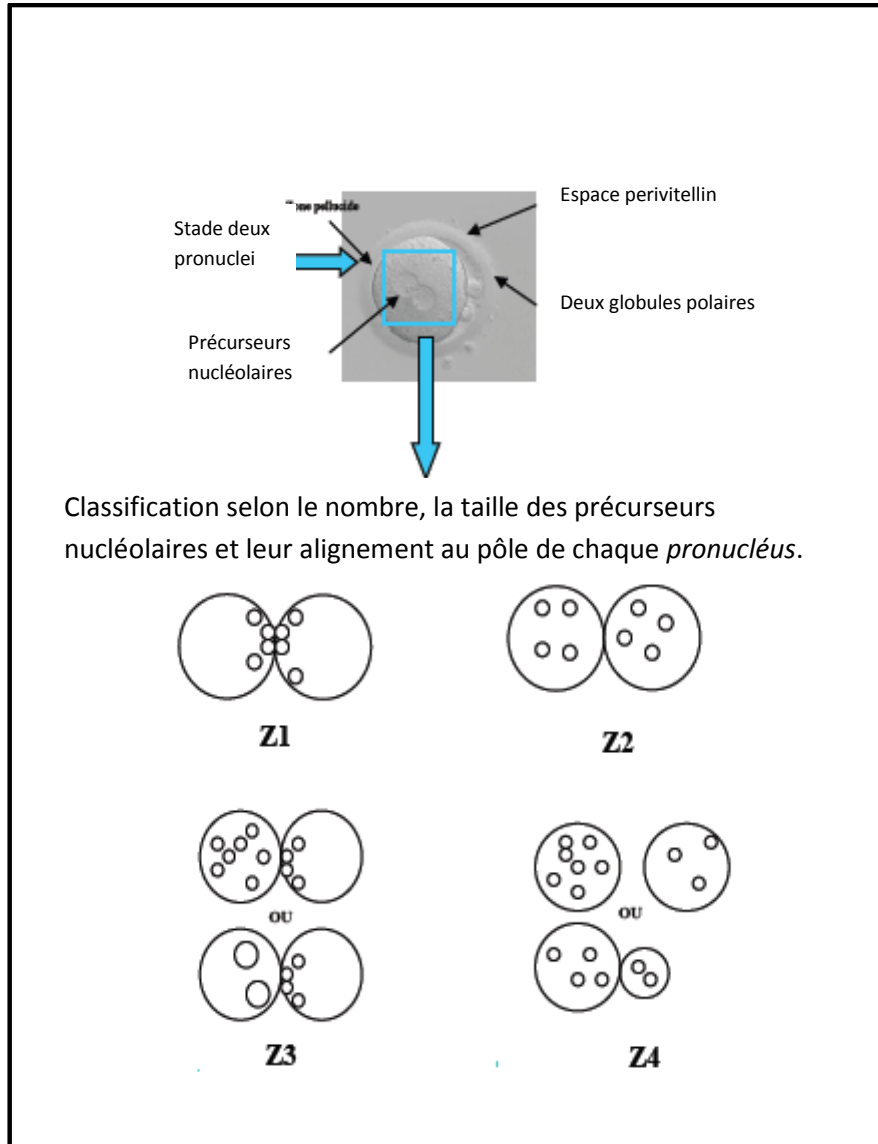
# ANNEXE 1

## Analyse de la morphologie spermatique par le Hamilton Thorne Research.



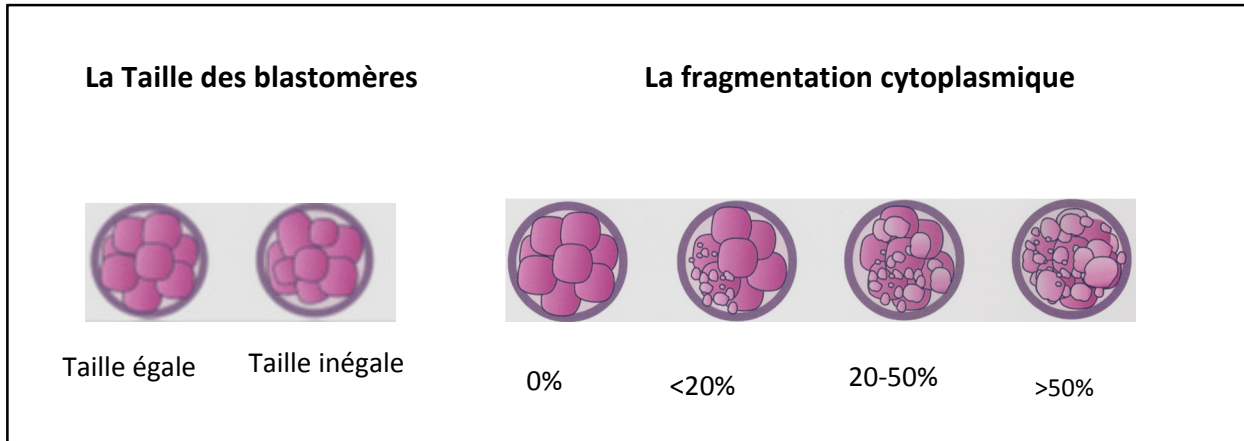
## ANNEXE 2

**Classification des Z : classification des corpuscules des nucléoles selon leur position dans chaque pronuclei (*Scott et al., 2000*).**



## ANNEXE 3

### Evaluation des embryons : taille des blastomères et fragmentation cytoplasmique.



- **TYPE I** : Blastomères réguliers sans présence de fragments
- **TYPE II** : Blastomères réguliers avec présence de fragments
- **TYPE III** : Blastomères irréguliers sans présence de fragments
- **TYPE IV** : Blastomères irréguliers avec présence de fragments
- **TYPE V** : Présence uniquement de fragments

-Le pourcentage de fragments cytoplasmiques est indiqué par un nombre de croix :

- ❖ pas de croix : pas de fragments
- ❖ + : moins de 20% de fragments
- ❖ ++ : de 20 à 50% de fragments
- ❖ +++ : plus de 50% de fragments

## LEXIQUE

<b>ABM</b>	Agence de Biomédecine
<b>ACAS</b>	Anticorps anti-spermatozoïdes
<b>AMP</b>	Assistance Médicale à la Procréation
<b>AMH</b>	Hormone anti-mullérienne
<b>CASA</b>	Computer aided analysis
<b>DES</b>	Distilbène® ou diéthylstilboestrol syndrome
<b>DNC</b>	Délai nécessaire à concevoir
<b>E2</b>	17 $\beta$ Estradiol
<b>et al.</b>	et collaborateurs
<b>FCS</b>	Fausse couche spontanée
<b>FIV</b>	Fécondation <i>in vitro</i>
<b>FIVETE</b>	Fécondation <i>in vitro</i> et transfert d'embryon
<b>FIVNAT</b>	Association FIVNAT
<b>FSH</b>	<i>Follicule Stimulating Hormone</i> ou Hormone Folliculo-Stimulante
<b>FT</b>	Formes typiques
<b>GEU</b>	Grossesse extra-utérine
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
<b>HMG</b>	<i>Human menauposal gonadotrophin</i>
<b><math>\beta</math>-HCG</b>	<i>Hormone chorionic gonadotrophin</i>
<b>HTA</b>	<i>hypertension artérielle</i>
<b>IAM</b>	<i>Indice d'anomalies multiples</i>
<b>ICSI</b>	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
<b>INSERM</b>	Institut national de la santé et de la recherche en France
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>IMG</b>	Interruption médicale de grossesse
<b>M</b>	Millions
<b>NSMI</b>	Nombre de spermatozoïdes normal inséminés
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PI</b>	Pièce intermédiaire
<b>TMS</b>	Test de migration survie
<b>TF</b>	Taux de fécondation
<b>TZI</b>	Index de tératozoospermie
<b>SMI</b>	Spermatozoïdes mobiles inséminés
<b>SUZI</b>	Sub zonal injection
<b>VPN</b>	valeur prédictive négative
<b>VPP</b>	valeur prédictive positive
<b>ZP</b>	Zone pellucide

## Table des matières

INTRODUCTION .....	21
PARTIE 1 : GENERALITES DE LA FERTILITE ET DE L'INFERTILITE.....	25
I. La fécondation naturelle .....	25
1. La gamétogenèse .....	25
2. La spermatogenèse.....	26
3. L'éjaculation.....	31
4. Migration des spermatozoïdes dans l'appareil génital féminin.....	31
5. La fécondation.....	32
II. Définitions et épidémiologie de l'infertilité .....	36
1. Quelques définitions .....	36
1-1. Fertilité et infertilité .....	36
1-2. Fécondité et infécondité .....	36
1-3. Fécondabilité .....	37
1-4. Le délai nécessaire à concevoir .....	37
1-5. Stérilité .....	38
2. Données épidémiologiques .....	38
2-1. L'importance de l'infertilité.....	38
2-2. Les causes d'infertilité .....	39
2-2-A. Généralités.....	39
2-2-B. Causes d'infertilité chez la femme .....	40
2-2-C. Causes d'infertilité chez l'homme.....	42
III. Bilan de l'infertilité .....	45
1. Généralités .....	45
1-1. Rappel du bilan féminin d'infertilité.....	45
1-2. Le bilan masculin d'infertilité .....	46
2. Analyse du sperme .....	48
2-1. Réalisation du spermogramme .....	48
2-2. Le spermocytogramme.....	50
2-2.A. Classification de David ( <i>David et al., 1975</i> )[11].....	51
2-2.B. Classification de Kruger (critères stricts) .....	52
2-2.B.1. Analyse manuelle .....	52
2-2.B.2. Analyse semi-automatisée ou CASA (Computer-aided sperm analysis) .....	54
❖ Hamilton Thorne Research IVOS .....	55



IV. Morphologie spermatique et revue de la littérature .....	57
1. Introduction.....	57
2. Spermocytogramme : les débuts.....	57
3. Organisation Mondiale de la Santé .....	58
3.1. Evolution de 1987 à 2010 .....	58
3.2. OMS 2010 : vers la standardisation.....	60
4. CASA et revue de la littérature.....	60
5. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans l'insémination intra-utérine (IIU)....	62
5.1. Principe et indications .....	62
5.2. Rôle de la morphologie spermatique en IIU.....	63
6. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans la fécondation in vitro .....	64
6.1. Principe et indications .....	64
6.2. Rôle de la morphologie spermatique en FIV. ....	64
7. Valeur prédictive de la morphologie spermatique dans la fécondation in vitro avec micro- injection ou ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection). ....	66
7.1. Principe et indications .....	66
7.2. Rôle de la morphologie dans l'ICSI .....	67
PARTIE 2 : ETUDE.....	68
I. MATERIELS ET METHODES .....	69
1. Population étudiée.....	69
2. Préparation du sperme pour les tentatives de FIV et d'IIU.....	69
3. Analyse de la morphologie spermatique.....	70
3.1. Comparaison David/Kruger .....	70
3.2. Analyse avec le CASA .....	70
4. Tentatives de FIV : déroulement de la tentative.....	71
5. Tentatives d'IIU .....	72
6. Méthodologie statistique .....	73
II. RESULTATS.....	74
1. Comparaison des deux classifications d'évaluation de la morphologie spermatique. ....	74
2. Résultats pour les tentatives de FIV .....	77
2.1. Impact sur le taux de fécondation (TF) .....	78
2.2. Impact sur le taux de grossesse.....	89
3. Résultats pour les tentatives d'IIU .....	92
III. DISCUSSION .....	99

CONCLUSION .....	109
ANNEXE 1.....	115
ANNEXE 2.....	116
ANNEXE 3.....	117
LEXIQUE .....	118

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

## **RESUME :**

Le but de notre étude prospective était d'évaluer la morphologie spermatique en critères stricts avec une méthode assistée par ordinateur l'IVOS, et son éventuelle valeur prédictive sur les résultats de fécondation in vitro (FIV, n=133) et d'insémination intra-utérine (IIU, n=102). Nous avons d'abord prouvé l'absence de bénéfice à analyser 200 spermatozoïdes plutôt que 100 sur le CASA (368 lames analysées par l'auteur avec un coefficient de corrélation 100/200 spermatozoïdes  $r=0,96$ ). Nous avons retrouvé une faible corrélation ( $r=0,5$ ) entre deux classifications (David/critères stricts de Kruger). La morphologie spermatique et le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés (SMI) en IIU (seuil à 5 millions) n'ont pas été retrouvés comme des facteurs prédictifs des taux de grossesse confirmant la nécessité de baisser encore le seuil de SMI dans notre centre. Notre travail a mis en évidence une corrélation significative ( $r=0.230$ ) entre un taux de FT et les taux de fécondation (TF) en FIV avec un seuil de FT à 16% avant capacitation. Ce seuil a une VP négative et positive respectivement à 82% et à 44% (AUC = 0,691 ;  $p<0,05$ ). Le TF dans le groupe  $FT\leq 16\%$  est plus bas (44%) que dans le groupe  $FT>16\%$  (55%) ( $p=0,06$ ). Dans ce travail, il n'y a pas eu d'impact significatif de la morphologie spermatique sur les taux de grossesse en FIV. En fonction de ces résultats, nous concluons que la réalisation d'ICSI lorsque le taux de FT est  $\leq 16\%$  nous permettrait d'éviter des échecs de fécondation. Une amélioration des TF nous permettrait alors d'espérer une augmentation des taux de grossesse cumulée après transfert des embryons congelés.

## **ABSTRACT :**

Impact of sperm morphology, analyzed by a semi automated method, on in vitro fertilization and intrauterine insemination results. Prospective study at medically assisted reproduction center of university hospital in Limoges in 2012.

The aim of our prospective study was to estimate the sperm morphology via strict criteria through an assisted method by IVOS computer and its possible predictive value on the results of in vitro fertilization (IVF:n=133) and intrauterine insemination (IUI:n=102).

First of all, we proved the absence of benefit from analyzing 200 sperms instead of 100 on the CASA (the author analyzed 368 slides with a correlation coefficient of 100/200 sperms  $r=0,96$ ). We found a low correlation ( $r=0,5$ ) between two classifications (David's/ Kruger's strict criteria). The sperm morphology and the number of motile spermatozoa inseminated (NMSI) in IUI (threshold at 5 million) were not confirmed as pregnancy rate predictive factors which confirms the need to lower the threshold of NMSI in our center. Our work highlighted a significant correlation ( $r=0,230$ ) between sperm morphology and the IVF fertilization rate (FR) with a threshold at 16% of normal forms (NF) before density gradient. This threshold has a negative predictive value (PV) and a positive one, respectively at 82% and at 44% (AUC = 0,691; $P<0,05$ ). The FR in the group  $NF \leq 16\%$  is lower than in the group  $>16\%$  (55%) ( $p=0,06$ ). In this study, sperm morphology did not impact significantly the IVF pregnancy rates. Based on these results, we conclude that the use of ICSI when the normal form rate is  $\leq 16\%$  would enable us to avoid fertilization failures. We expect FR improvement would permit an increase in cumulative pregnancy rates after the transfer of frozen embryos.

**DISCIPLINE :** BIOLOGIE MEDICALE spécialité BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

**MOTS CLES :** morphologie spermatique, critères stricts, CASA, FIV, IIU, taux de fécondation, taux de grossesse.

**KEY WORDS :** sperm morphology, CASA, strict criteria, IVF, IUI, fertilization rate, pregnancy rate.

**ADRESSE DE L'UFR :** Faculté de médecine de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges Cedex.