

L'IMSI : une nouvelle technique pour optimiser le choix du spermatozoïde

IMSI: high magnification of spermatozoa a new technic

●● P. Cohen-Bacrie*, M. Dumont*, A.-M. Junca*, S. Belloc*, M. Cohen-Bacrie*

La pratique de l'ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) et sa capacité à produire des embryons et aboutir à des naissances avec des spermatozoïdes très altérés nous a fait croire, au début, que tous les couples confrontés à la stérilité masculine allaient pouvoir être les parents biologiques de leur enfant. Les échecs de l'ICSI (échecs de fécondation et d'implantation) mettent en cause la qualité des ovocytes, du spermatozoïde injecté, la manipulation du biologiste ainsi que la qualité endométriale. Plusieurs observations d'anomalies très grossières, en particulier des têtes des spermatozoïdes, telles que la macrocéphalie ou la globozoospermie, ne donnaient pas ou peu de grossesses lorsque des embryons pouvaient être obtenus.

Plusieurs auteurs ont noté l'absence de corrélation entre le pourcentage de formes atypiques évaluées par le simple spermocytogramme (classification de David ou de Krüger) et les résultats de l'ICSI, car le choix du spermatozoïde d'aspect morphologiquement le plus normal est réalisé par le biologiste au moment de la micro-injection. Le taux de succès semble néanmoins dépendre de l'aspect morphologique du spermatozoïde injecté. De Vos et al. (1) ont publié en 2003 une analyse rétrospective concernant l'influence de la morphologie du spermatozoïde injecté au grossissement x 400 sur le taux de fécondation d'ovocytes tous matures, la morphologie embryonnaire et les taux de grossesses en ICSI. Un spermatozoïde, observé au grossissement x 400, était considéré comme normal si la tête était normale (forme, taille et acrosome) et s'il n'y avait défaut ni du flagelle ni de la pièce intermédiaire. Hormis les anomalies grossières de la tête des spermatozoïdes, les défauts les plus évidents pouvant être observés étaient : têtes allongées (deux fois moins larges que la normale), têtes amorphes, têtes au "cou cassé" (l'axe de la tête dévié de 30 °C par rapport à l'axe de la pièce intermédiaire), les restes cytoplasmiques. Sur 1 667 cycles et 1 393 transferts d'embryons, ils ont constaté une baisse du taux de fécondation avec l'injection de spermatozoïdes anormaux : 60,7% contre 71,7% pour les spermatozoïdes normaux quelle que soit l'origine des spermatozoïdes utilisés (éjaculat, épидидyme, testicule). Alors qu'il n'a été observé aucune différence dans la morphologie des embryons obtenus à J2 ou J3, les taux de grossesses et d'implantation étaient significativement plus élevés avec les

spermatozoïdes normaux, respectivement de 36,7% et 18,7% versus 20,2% et 9,6% pour les anormaux. La présélection des spermatozoïdes sur leur morphologie est donc une étape cruciale de la procédure d'ICSI.

La structure et/ou la composition de la chromatine des noyaux des spermatozoïdes humains sont très variables (même parmi les noyaux spermatiques de forme normale) et des vacuoles nucléaires de taille et de localisation variables sont régulièrement observées en microscopie électronique à transmission (2). La chromatine granuleuse peu condensée, retrouvée dans les spermatozoïdes, ressemble à celle que l'on trouve dans les spermatides allongées des autres espèces de mammifères, ce qui traduirait une immaturité nucléaire. En assistance médicale à la procréation, certains échecs d'implantation et de grossesse évolutive pourraient être dus à des altérations de la chromatine. C'est pourquoi Evenson et al. (3) préconisent de faire une évaluation de l'intégrité de la chromatine, en mesurant le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Ce test, appelé SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), pourrait être utilisé dans les stérilités dites inexplicables et/ou les échecs répétés d'implantation, à condition d'avoir au moins un million de spermatozoïdes par millilitre. Ce test ne peut donc pas être utilisé pour les OAT sévères avec lesquelles nous observons des échecs répétés d'implantation après ICSI.

De même, pour déterminer si des anomalies fines de la morphologie des spermatozoïdes pouvaient interférer avec les résultats de l'ICSI, Bartoov et al. (4) ont mis au point un microscope haute résolution permettant d'observer les spermatozoïdes à un grossissement x 6 600. La technique, appelée MSOME (*Motile Sperm Organelle Morphology Examination*), consiste à noter tous les détails morphologiques des spermatozoïdes mobiles en temps réel. Ces détails sont définis par les observations préalables faites en microscopie électronique à transmission et à balayage.

Dans cette technique MSOME, l'observation porte sur 6 parties du spermatozoïde : acrosome, lamina post-acrosomique, cou, mitochondries, flagelle, noyau. Pour le noyau, forme et taille sont notées, de même que l'aspect de la chromatine, et le nombre et la taille des vacuoles sont répertoriés. Un noyau est considéré comme normal s'il a une taille de $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ sur $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$, et si les vacuoles occupent moins de 4% de la surface nucléaire. Sur une série de 100 patients pour lesquels l'ICSI a été réalisée de façon conventionnelle, les spermatozoïdes non utilisés ont été soumis au MSOME (100 spermatozoïdes observés pour chaque patient). L'analyse des résultats

* Laboratoire d'Eylau, 55, rue Saint-Didier, 75116 Paris. AMP Eylau La Muette, 46-48, rue Nicolo, 75116 Paris. AMP Eylau Cherest, 5, rue Pierre-Cherest, 92200 Neuilly.

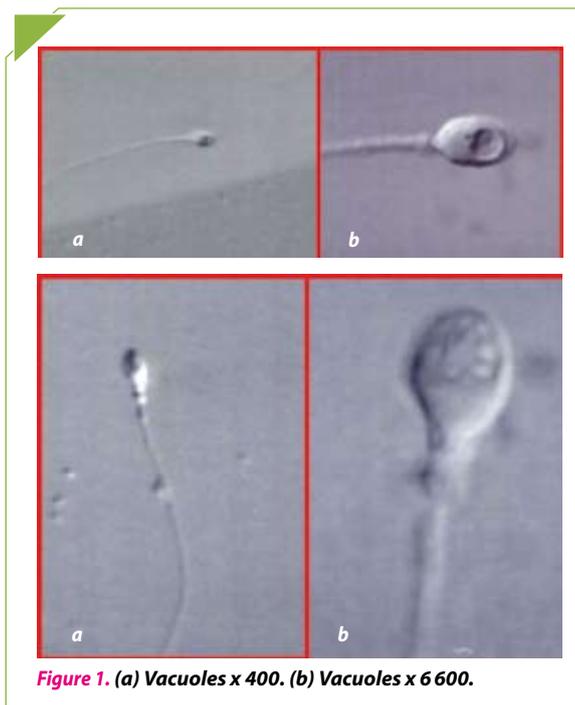


Figure 1. (a) Vacuoles x 400. (b) Vacuoles x 6 600.

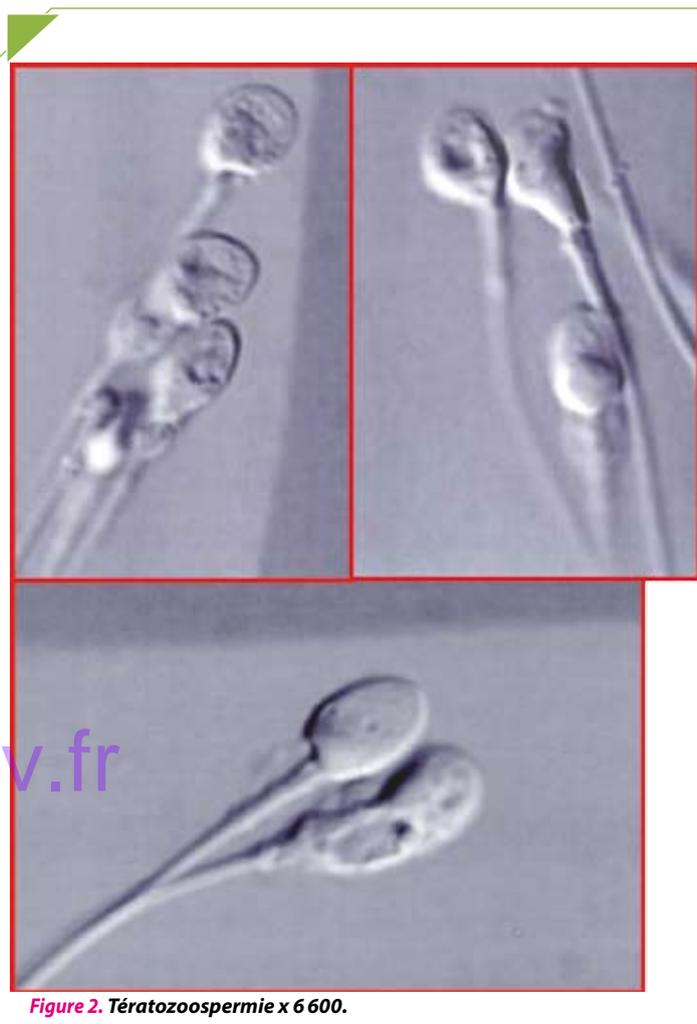


Figure 2. Tératozoospermie x 6 600.

montre que seul le pourcentage de noyaux spermatiques normaux est corrélé au taux de fécondation et au taux de grossesse. Aucun des spermatozoïdes contenant moins de 20 % de noyaux normaux n'a permis d'obtenir une grossesse. L'application préalable en ICSI de ce test à 24 couples en échecs répétés de cycles de FIV et/ou ICSI (7,6 + 2,1 cycles) a permis à Bartoov et al. (5) d'obtenir 14 grossesses (G) sur 21 transferts (T) d'embryons, soit un taux de 58 % de G/T.

Berkovitz et al. (6) ont établi des critères de choix des spermatozoïdes, le premier choix étant réalisé avec des spermatozoïdes de taille normale et de chromatine normale (zéro ou une petite vacuole). Quatre critères de deuxième choix : des spermatozoïdes plus petits ou plus grands, mais avec une chromatine normale ; des spermatozoïdes de forme non ovale avec une chromatine normale ; des spermatozoïdes avec une forme anormale, mais une chromatine normale ; des spermatozoïdes avec une chromatine anormale et de larges vacuoles. Dans cette série, pour 70 patientes, le taux d'accouchements par cycle et celui de fausses couches spontanées (FCS) étaient respectivement de 52,8 % et 9,8 % après ICSI avec des spermatozoïdes de premier choix, contre 17,1 % et 33,3 % après ICSI avec des spermatozoïdes de second choix. Dans ce même groupe, 4 FCS concernaient des ICSI avec spermatozoïdes contenant de grosses vacuoles. Dans une analyse rétrospective, ces mêmes auteurs, en 2006 (7), ont comparé 28 cycles d'ICSI avec injection de spermatozoïdes de premier choix à 28 cycles d'ICSI avec injection de spermatozoïdes de forme normale, mais avec de grosses vacuoles. Ils n'ont pas observé de

différences dans les taux de fécondation ni dans le taux d'embryons de qualité optimale (classification de Van Royen) [8]. En revanche, ils rapportent un taux de grossesse très abaissé, 18 % versus 50 %, et un taux de FCS très augmenté, 80 % versus 7 % dans le groupe des spermatozoïdes vacuolés. Ils concluent que la micro-injection des spermatozoïdes vacuolés réduit le taux de grossesses et augmente le taux de FCS précoces.

RÉSULTATS D'IMSI 2004 À 2006

Bartoov a donc mis au point l'IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection*) et nous avons reproduit sa technique dans nos deux centres AMP Eylau (Cherest, la Muette). Nous avons équipé un microscope inversé Olympus (IX 70) avec un contraste de Nomarski. On utilise un objectif 100 à immersion, lequel, avec le sélecteur de grossissement (x 1,5) nous donne un grossissement de 150 fois sur le microscope. L'image obtenue au microscope est récupérée

rée par une caméra Sony vidéo couleur de telle sorte que le grossissement final sur la vidéo est de 6600 fois. L'observation de spermatozoïdes normaux, fécondants en FIV, nous a permis de reconnaître des spermatozoïdes à tête normale. Puis nous avons déjà pu observer une très grande variabilité dans le nombre et la taille des vacuoles nucléaires des spermatozoïdes de patients d'ICSI. Le tri des spermatozoïdes par cette technique a été utilisé pour les patients en échecs répétés d'ICSI, pour les patients avec tératozoospermie élevée et polymorphe portant. Cette technique a été utilisée pour les patients avec un taux élevé de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, et aussi pour les couples ayant peu d'ovocytes. Dans les cas où aucun spermatozoïde à tête "normale" ne pourra être sélectionné, elle permettra au couple de passer à l'IAD, à l'adoption ou à l'arrêt des techniques d'AMP.

Hazout et al. (9) ont montré parmi 72 patients répartis en trois classes (< 30%, 30-40%, > 40%), selon le pourcentage d'ADN fragmenté par la méthode TUNEL et n'ayant eu aucune naissance après plusieurs tentatives d'ICSI, des taux d'implantation respectivement de 23,6%, 17,4% et 33,3% et des taux de naissance de 18,9%, 17,4% et 28,6%.

Sur 262 ponctions nous avons obtenu 80 grossesses cliniques évolutives (30,5% par ponction, 31,8% par transfert). Dans 441 ponctions pour échecs d'implantation, nous avons obtenu 127 grossesses évolutives (28,8% par ponctions, 29,7% par transfert).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilisation, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79:42-8.
2. Bedford JM, Bent MJ, Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973;33(1):19-29.
3. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23(1):25-43.
4. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.
5. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 2001;345: 1067-8.
6. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S et al. The morphological normalcy of the sperm

nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20(1):185-90.

7. Berkovitz, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21(7):1787-90.
8. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14(9):2345-9.
9. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca A-M, Cohen-Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *RBM on line* 2006;12,1.

Pour en savoir plus

10. Bartoov B, Fisher J, Eltes F, Langzam J, Lunenfeld B. A comparative morphological analysis of abnormal human spermatozoa. In: Insler V, Bettendorf G (eds), *Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility*. Amsterdam : Elsevier 1981:355-73.
11. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Lederman H, Caspi E, Soffer Y. Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod* 1993;8:65-70.
12. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 1994;9:2069-75.
13. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-9.
14. Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y et al. ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia* 1999;31:1-8.
15. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405-28.
16. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson JR, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of sperm morphology in in vitro fertilisation. *Fertil Steril* 1988;49:112-21.
17. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 1996;11:1942-6.
18. Liu DY, Baker HW. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992;58:465-83.
19. Mashiach R, Fisch B, Eltes F, Tadir Y, Ovadia J, Bartoov B. The relationship between sperm ultrastructural features and fertilisation capacity in vitro. *Fertil Steril* 1992;57:1052-7.
20. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002;17: 184-9.
21. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H et al. High fertilisation and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
22. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Hazout A. ICSI can one select the spermatozooids? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005;34(1-pt2):1831-4.