

Identification du gamète normal
morphologie du spermatozoïde

A.M.JUNCA
AMP Eylau - La Mulette
AMP Eylau - P Cherest

Hôpital Américain 25 Novembre 2005



Macrocéphale



Microcéphale



Flagelle enroulé



Reste cytoplasmique



Tête ronde



P.I Coudée



Amincie



Spz normal

SPERMATOZOÏDES

- **Anomalies grossières** de la majorité des têtes spermatiques ne donnent pas ou peu de grossesses (**macrocéphalie, globozoospermie, 0% de têtes normales**)
- **Pas de relation** entre le % de formes atypiques et les **résultats de l'ICSI**(car choix du spermatozoïde le plus normal possible)
- Le taux de **succès de l'ICSI** semble néanmoins dépendre de l'aspect morphologique du spermatozoïde injecté

A. De Vos et coll. 2003,
Fertil Steril, vol. 79, N° 1

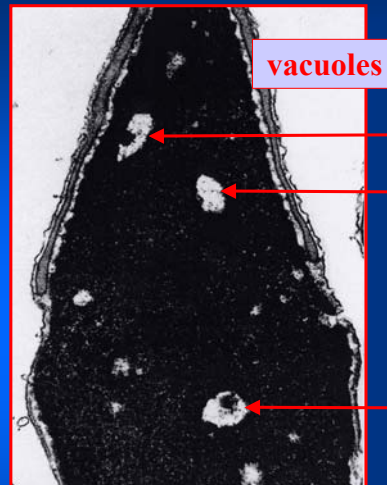
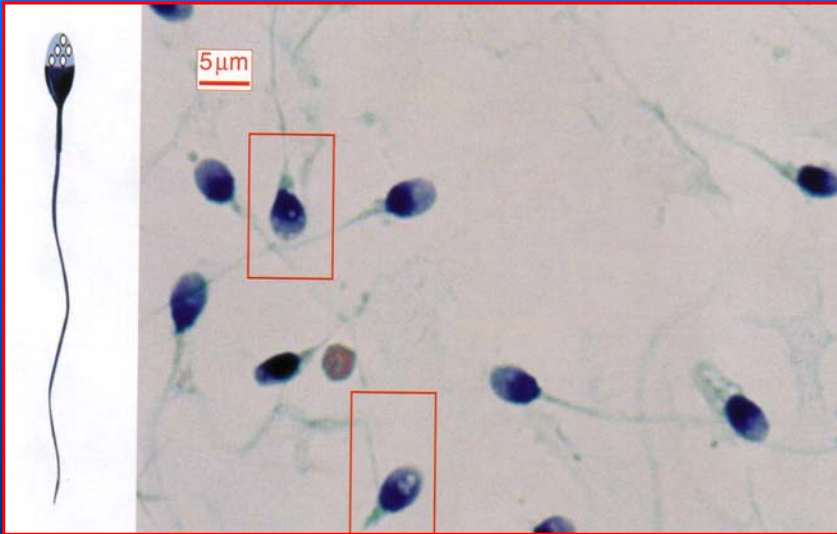
L'injection de spermatozoïdes anormaux s'accompagne:

1. D'une **baisse** du taux de **fécondation**: 60,7% versus 71,7%
2. D'aucune différence dans la morphologie des embryons observés à J2 ou J3
3. D'une **baisse** du taux de **grossesse**: 20,2% versus 36,7%
4. D'une **baisse** du taux d'**implantation** : 9,6% versus 18,7%



Présélection du spz=étape cruciale pour le succès de l'ICSI

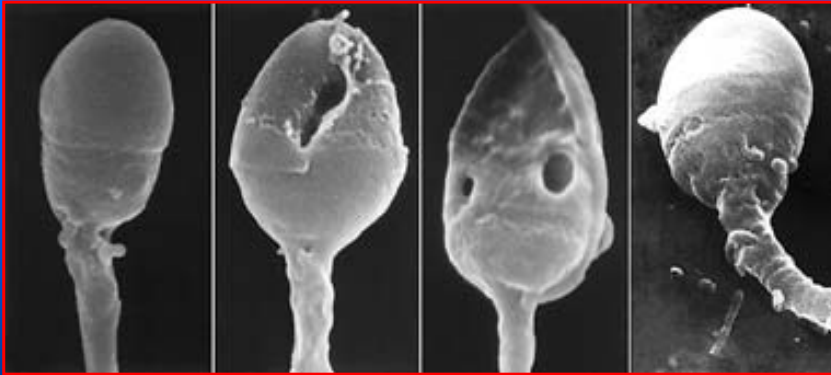
VACUOLES



Chromatine bien condensée Chromatine mal condensée

Bedford et al, 1973 (x 46000)

Normal and abnormal sperm samples



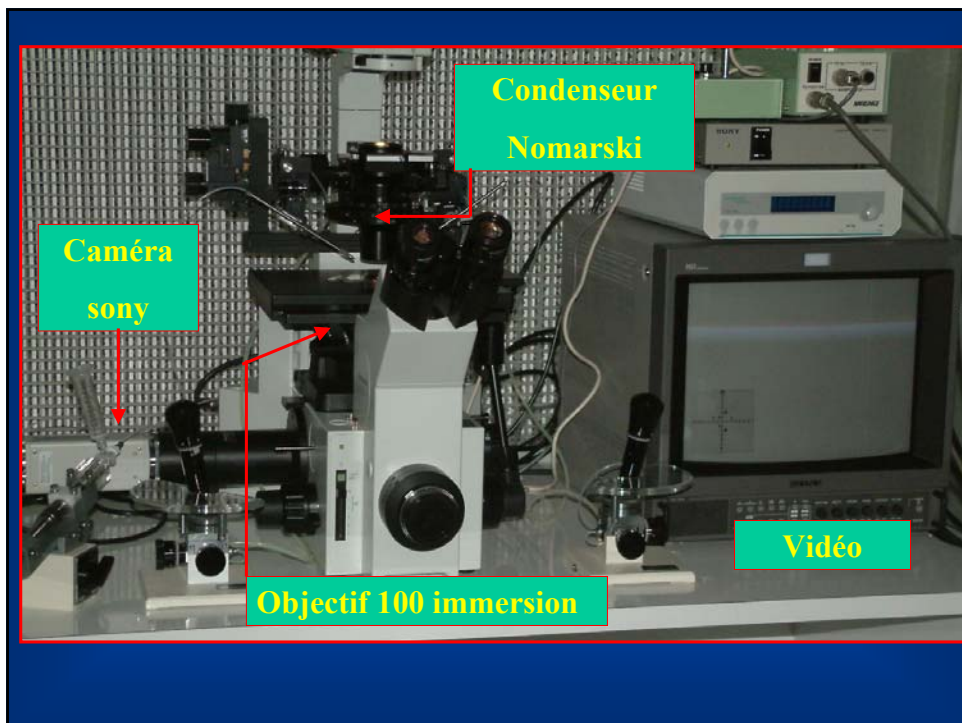
MSOME

- Observation à un fort grossissement(6600X) des différentes parties du spermatozoïde
 - Acrosome
 - Partie post-acrosomique
 - Cou
 - Pièce intermédiaire
 - Flagelle
 - Noyau

Bartoov et coll,2002

Matériel utilisé

- Microscope inversé Olympus:IX70
- Contraste interférentiel de **Nomarski: objectif 100 à immersion**
- Caméra vidéo sony
- Grossissement total = gross. du microscope (150x) × gross. du coupleur vidéo(0,99x) × gross. de la vidéo(44,45x) = **6600x**
- **Observation en boîte Wilco: fond en verre de 170µm**



Analyse fine du noyau

1. Forme:

Ovale, lisse, symétrique

2. Taille évaluée sur 100 spz normaux:

$4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ sur $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$

3. Chromatine:

Anormale: si 1 ou plusieurs vacuoles occupent plus de 4% de l'aire nucléaire

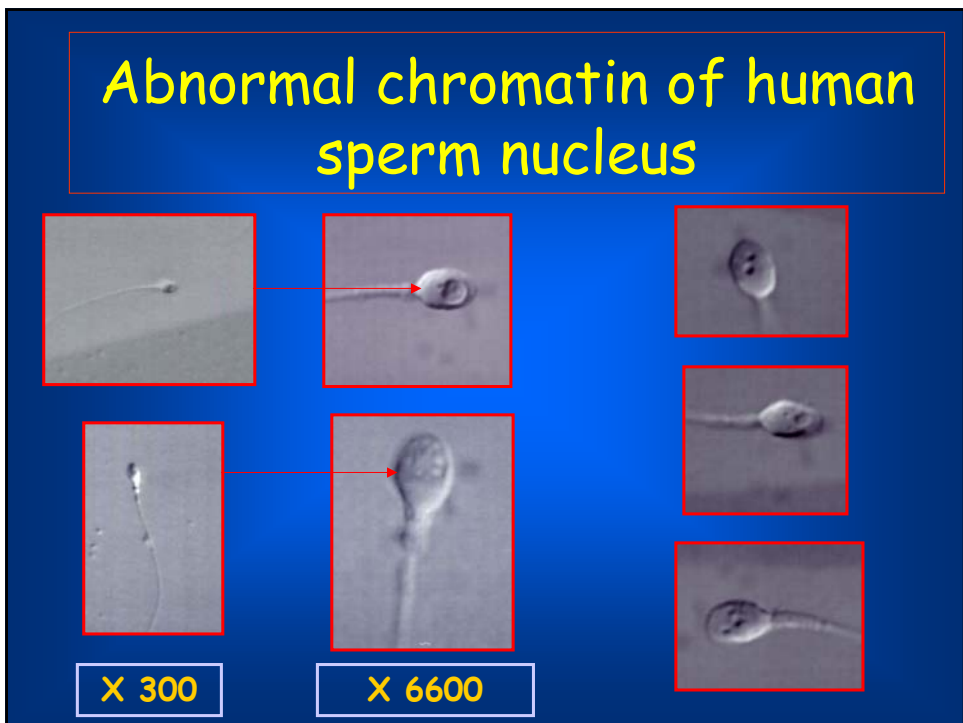
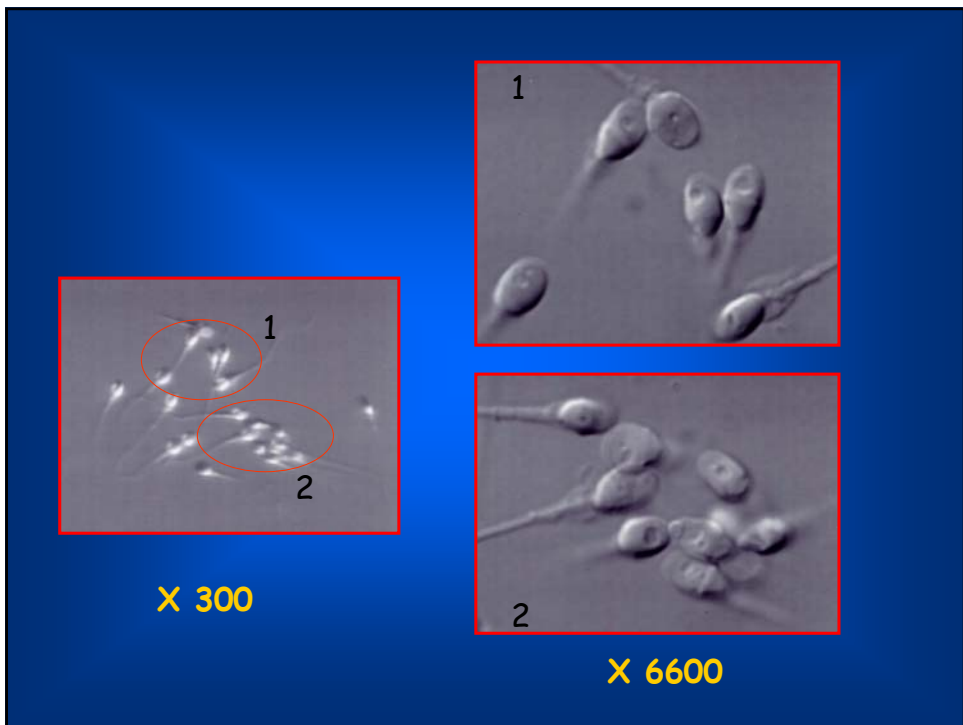
x400

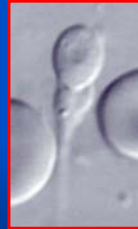


x6600

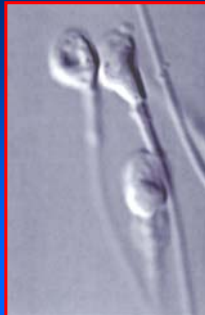


Données AMP EYLAU



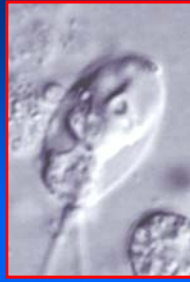
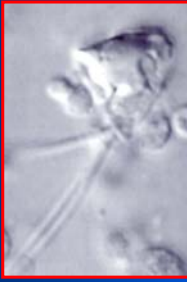


« spermatozoïdes »
de biopsie
testiculaire



Tératozoospermie





Syndrom de spermatozoïdes macrocéphales



Globozoospermie

Résultats

- Spz normaux: $3,3 \pm 0,5\%$ (0 à 15% et 38% pour 1pat.)
- Têtes spermatisques normales: $26,8 \pm 1,7\%$ (0 à 68%)
- Seule la morphologie du noyau spermatisque est significativement corrélée au taux de fécondation et au taux de grossesse.
- Pas de grossesse si moins de 20% de têtes normales

Spz issus de TESE

- 454 spz TESE congelés observés pour 14 ICSI
- 3 spz sans anomalie : 0,66% vs 7,7% spz éj
- 80,8% spz avec an multiples vs 53,1% spz éj
- La morphologie du spz testiculaire -cong est très différente de celle du spz éjaculé

Échecs d'IIU avec sp normal: $\frac{1}{2}$ FIV $\frac{1}{2}$ ICSI

- 42 cas , 4973 spz observés
- 7,3% des spz sans ano. (0-19,8%)
- Si < 8% spz norm : 12 cas/24 échecs ou <10% féc en FIV

% spz norm	Nb cas	% féc FIV	% féc ICSI	p
<8%	24	34,9	75,9	<0,001
≥8%	18	60,5	76,3	ns

Wittemer.C , données non publiées , 2005

Bartoov et al, 2003 - IMSI 50 couples appariés

	<u>TEMOINS</u>		<u>EXPERIMENTAL</u>	
	tentatives précédentes	tentative ICSI	tentatives précédentes	tentative IMSI
Ovo. recueillis	13,3	13,2	13,4	13,6
Ovo. injectés	10,3	10,2	10,1	10,6
Taux de fécondation	63,7%	65,5%	63,1%	64,5%
Embryons transférés	3,6	3,5	3,6	3,8
Grossesses cliniques	0	15 (30%/P)	0	33 (66%/P)
Taux d'implantation	--	9,5%	--	27,9% (3 FCS)

technique

1. **Tri** du spz mobile en acide hyaluronique +HSA (spermcatch)
2. **transfert** du spz dans **2 μ l** de milieu de culture, sur une autre boite
3. **renouveler** jusqu'à ce que l'on obtienne **suffisamment de spz** pour réaliser l'ICSI
4. **Incubation à 37°C** de la boite contenant les **spz triés**
Durée des étapes 1 2 3 4 : une heure
5. **ICSI** après immobilisation des spz en PVP

Sélection des spermatozoïdes HMICSI

UNITE AMP EYLAU MUETTE

44 patients

- 27 patients : \geq 2 ICSI avec embryons sans grossesse
- 17 patients : 1^{ère} tentative

Hazout et al

2003

Sélection des spermatozoïdes (HMICSI) 1^{ère} tentative

	ICSI même jour		HMICSI	
Cycles	59		17	
Ovocytes recueillis	540 (9 / P)		178 (10,5 / P)	
Ovocytes injectés	451 (83%)		148 (83%)	
Ovocytes fécondés	288 (64%) p < 0.01		91 (61%)	
Embryons obtenus	289		89	
Embryons transférés	120 (2,2/T)		32 (1,9/T)	
Transferts	55		17	
Grossesses cliniques	16	27% / P	9	53% / P
		29% / T		53% / T

2003

Sélection des spermatozoïdes (HMICSI) ≥ 2 tentatives ICSI avec embryons sans grossesse

	ICSI réalisés le même jour		HMICSI	
Cycles	88		27	
Ovocytes recueillis	999 (11,5 / P)		265 (9,8 / P)	
Ovocytes injectés	797 (80%)		226 (85%)	
Ovocytes fécondés	492 (62%) p < 0.01		160 (71%)	
Embryons obtenus	484		167	
Embryons transférés	202 (2,4/T)		68 (2,6/T)	
Transferts	83		26	
Grossesses cliniques	25	28% / P	12	44% / P
		30% / T		46% / T

2003

Indications actuelles

- Échecs d'implantation d'ICSI
- Tératos sévères < 10%
- Fragmentations élevées

Résultats 2004 + 6 mois 2005 tératos sévères

- 92 ponctions (8 femmes \geq 39 a , 0 grossesse)
- 1147 ovocytes (12,5/p)
- 885 inj après HMICSI (77% des ovos rec)
- 581 fécondés (66%)
- 570 embryons
- 193 embryons transférés
- 90 transferts (2,14 e/t)
- 30 grossesses cliniques : 32,6%/ ponction
- 6 fcs , 24 évolutives dont 7 acc (9 BB nés)

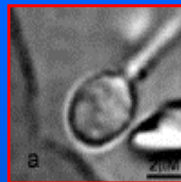
Résultats 2004 + 6 mois 2005

échecs d'implantation

- 165 ponctions (20 femmes \geq 39 ans , 2 grossesses)
- 1791 ovocytes (10,9 / ponction)
- 1463 inj après HMICSI (81,6%)
- 906 fécondés (62%)
- 881 embryons
- 399 transférés (2,53/ T)
- 47 grossesses cliniques (28,5 / P)
- 7 fcs , 40 évolutives , 14 acc , 15 BB nés

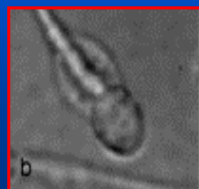
Berkovitz et coll,2005. Hum. Reprod.vol 20 1:185-190

1.Critère de 1^{er} choix: SPZ de taille normale et chromatine normale (0 ou 1 petite vacuole)

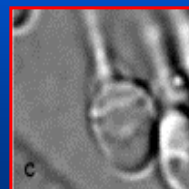


2.Critères de 2nd choix

a.1^{er} critère de 2nd choix: chromatine normale



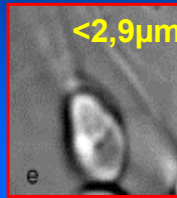
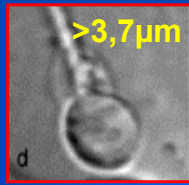
SPZ plus petit



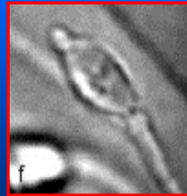
SPZ plus grand

2.Critères de 2nd choix

b.2^{ième} critère de 2nd choix: **chromatine normale**
mais SPZ de forme non ovale



c.3^{ième} critère de 2nd choix: **chromatine normale**
mais SPZ de forme anormale



Berkovitz et al, 2005

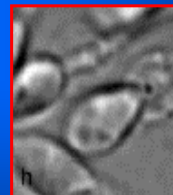
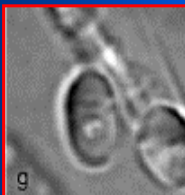
2.Critères de 2nd choix

d.4^{ième} critère de 2nd choix: **chromatine anormale**
avec de larges vacuoles

SPZ de forme ovale

ou

SPZ de forme amincie



Berkovitz et al, 2005

	38 cycles spz 1 ^{er} choix	38 cycles spz 2 nd choix
Nb ovo.	13,3+5,7	13,1+6,8
Nb ovo.inj.	10,1+4,5	9,2+4,0
Taux Fec.	71,3+20,8	50,3+24,1
Top emb.%	34,9+31,3	19,4+27,1
Nb emb.trf.	3,3+1,2	3,5+1,4
Taux impl.%	25,0+25,9	5,9+12,9
G/T %	52,6	18,4
Taux de FCS%	10,0	57,1

3 acc.: 2 x critère1
1 x critère2

4 Fes: critère 4 = larges vacuoles
Berkovitz et coll,2005

Critères de choix des têtes spermatiques

sur 72 cas

- 1^o choix (taille et chromatine normales)
 - 36 cas top spz
- 2^o choix
 - 29 cas
- Choix mixte
 - 7 cas

SPZ testiculaires

- Pour 11 ICSI.TESE , 77 ovo , les spz mobiles choisis pour l'ICSI au $\times 20$ sont d'abord observés au fort grossissement puis injectés :
 - relation directe morphologie spz- devenir de l'ovo
- Aucun spz normal
- Comparaison spz avec 1 ano. isolée - spz avec \times ano
- Taux de fec : idem
- Taux de clivage précoce et devt emb j2-j3 stat meilleur quand spz porte 1 seule ano
- Taux implantation : idem

Wittemer.C , données non publiées , 2005

Conclusion

- 1) la morphologie fine du spz (état de son noyau) semble être un facteur prédictif important de la fécondation et de la survenue d'une grossesse en ICSI
- 2) la sélection du spz injecté nous a permis d'augmenter le taux de grossesse dans des indications très précises et hors facteur féminin.
- 3) pour valider cette observation : étude randomisée