



Explorations biologiques de l'infertilité masculine

Nathalie Le Foll

Médecin biologiste

Spécialisée en Biologie de La Reproduction



2/12/2017

Infertilité

= Absence de grossesse au bout de 24 mois de RS non protégés réguliers chez des couples en âge de procréer

15% des couples

- Facteur masculin prédominant: 30%
- Facteur masculin ET féminin: 30%
- Facteur féminin: 30%
- Cause indéterminée: 10%

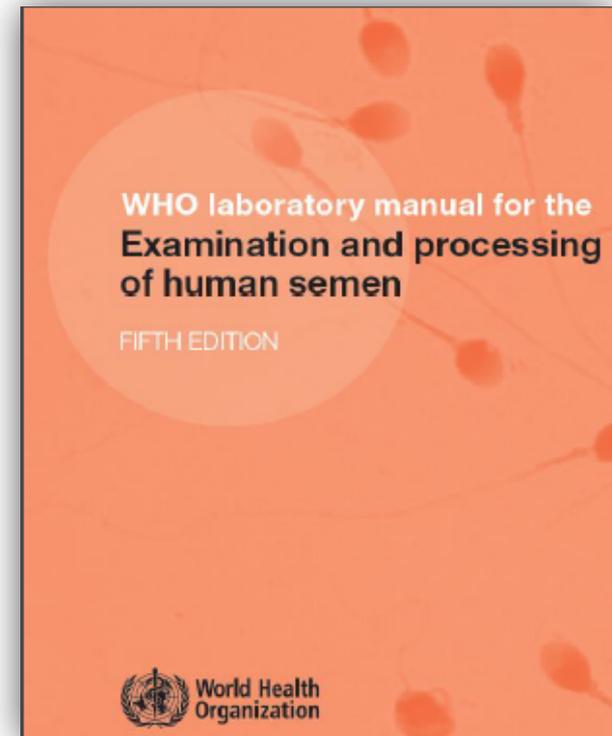
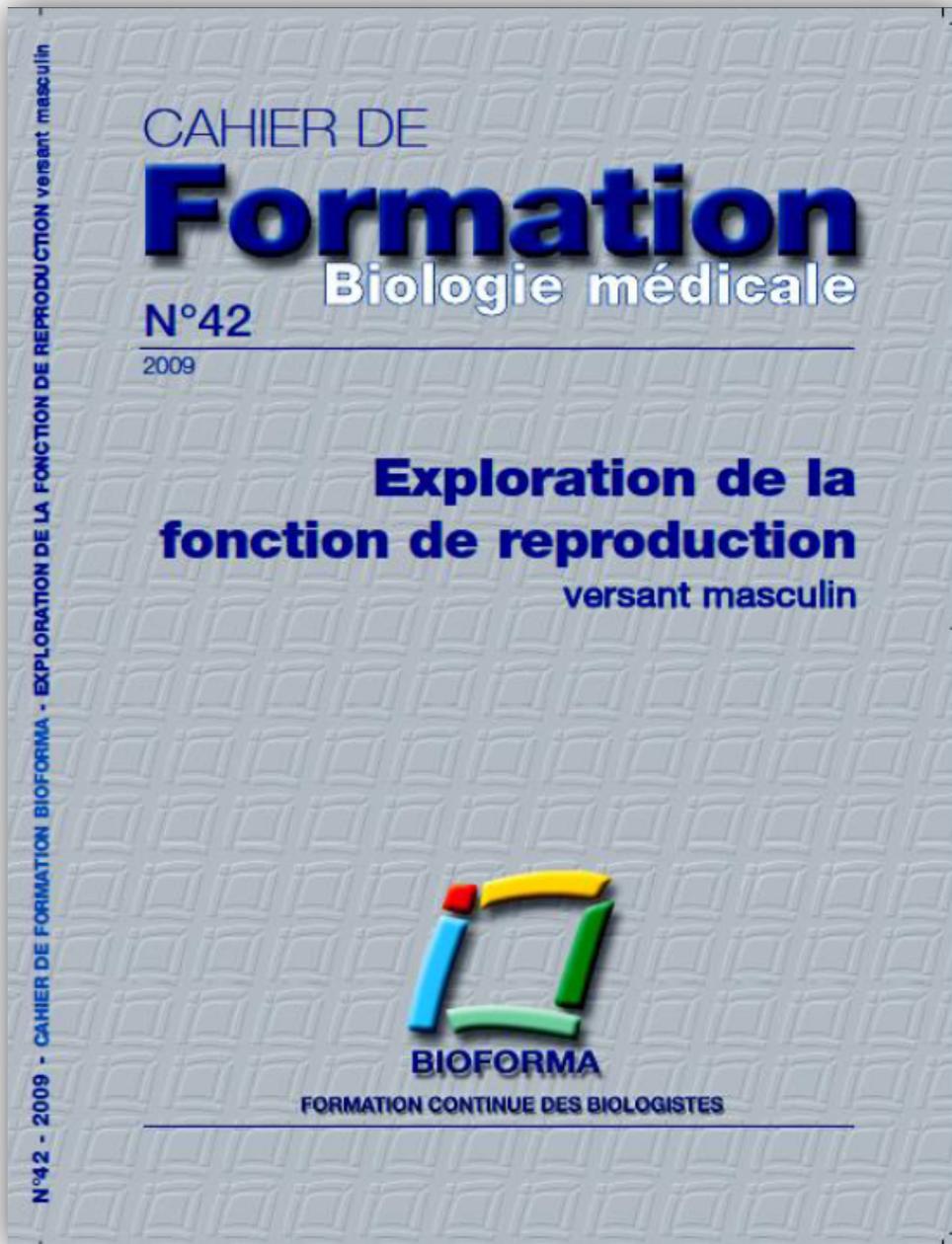
- Infertilité I
- Infertilité II

Analyses du sperme

- **En 1ère intention:** spermogramme-spermocytogramme
- **Tests complémentaires usuels:**
 - Test de migration survie, spermoculture
 - Recherche d'éjaculation rétrograde (EJR)
 - Recherche d'anticorps anti-spermatozoïde, biochimie séminale
- **Autres tests (Research procedures, WHO 5ème édition)**
 - Qualité de noyau du spermatozoïde
 - Syndrome inflammatoire génital
 - FISH
 - Microscopie électronique



Manuels détaillant les procédures en spermologie

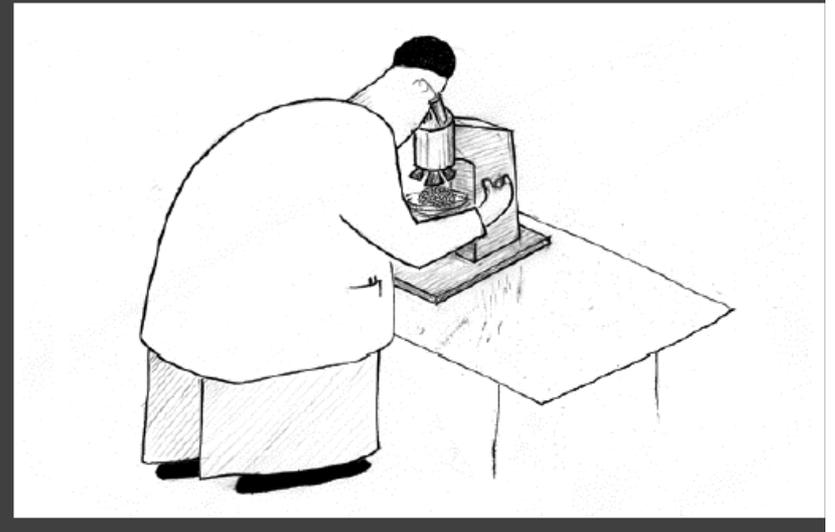


Etape analytique

en Biologie polyvalente \cong Automates



en Biologie de la Reproduction \cong tests
principalement au microscope
→ nature subjective



Habilitation et maintien des compétences (CQ) indispensables

Caractéristiques du sperme évaluées dans l'analyse spermogramme-spermocytogramme

- Caractéristiques physiques
- Caractéristiques spermatisques
- Cellules rondes

Analyses à faire dans les 30 min à 1H après le recueil

Frottis + coloration

Nom :	Prénom :	N° Dossier :	Prescripteur :
Date de naissance :	Date :	Délai d'abstinence (j) :	Lieu de recueil :

SPERMOGRAMME

VOLUME : ml	pH :	Viscosité :	normale <input type="checkbox"/>	augmentée <input type="checkbox"/>	forte <input type="checkbox"/>
CONCENTRATION :	x 10 ⁶ spermatozoïdes/ml			x 10 ⁶ cellules rondes/ml	
NUMÉRATION TOTALE :	x 10 ⁶ spermatozoïdes			Leucocytospermie (10 ⁶ /ml)	
MOBILITÉ :		à heure		à heure	
		Sur x spermatozoïdes		Sur x spermatozoïdes	
Progressifs (P)	Rapide et progressif (a)	%	} a + b : %	%	} a + b : %
Non progressifs (NP)	Lent et progressif (b)	%		%	
Immobiles (I)	Mobile sur place (c)	%		%	
	Immobile (d)	%		%	
VITALITÉ :	%			Présence d'agglutinats : <input type="checkbox"/>	

SPERMOCYTOGRAMME

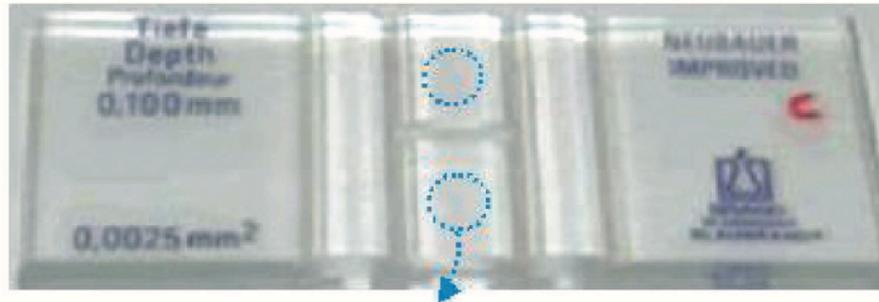
Sur x spermatozoïdes observés

TÊTE	PIÈCE INTERMÉDIAIRE	FLAGELLE
Allongée :	Reste cytoplasmique :	Absent :
Amincie :	Grêle :	Écourté :
Microcéphale :	Angulée / désaxée :	Calibre irrégulier :
Macrocéphale :		Enroulé :
Tête multiple :		Multiple :
Région post-acrosomique anormale :		
Région acrosomique anormale :		
Flagelles isolés :	INDEX D'ANOMALIES MULTIPLES (IAM) :	
Spermatozoïdes en lye :	Polynucléaires :	
Cellules de la lignée germinale :	Autres cellules :	

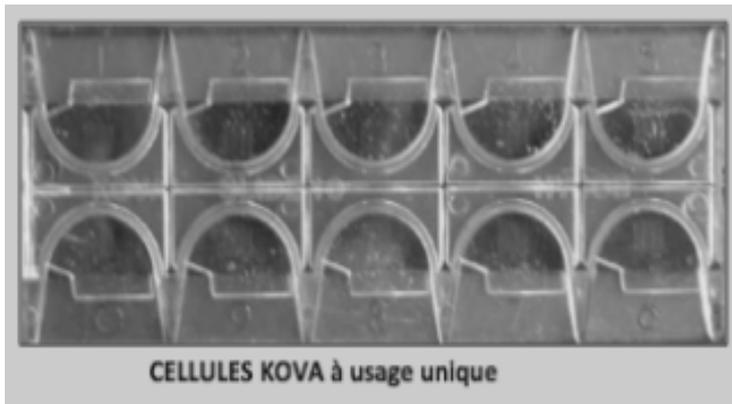
SPERMATOZOÏDES MORPHOLOGIQUEMENT TYPIQUES : %

Evaluation de la numération

MANUELLE



Cellules de mallassez



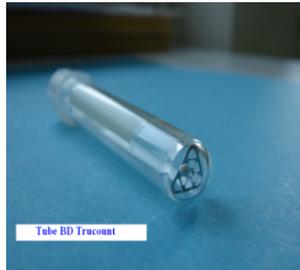
CELLULES KOVA à usage unique



Cellule de MAKLER

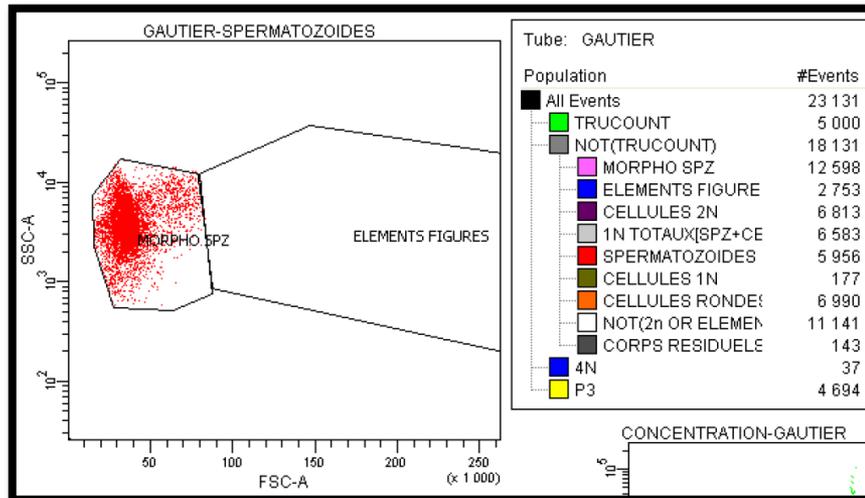
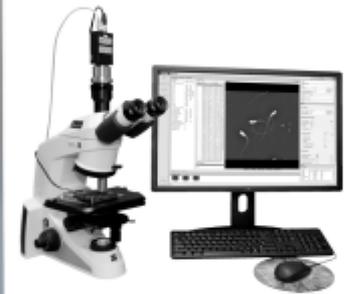
Evaluation de la numération

Cytométrie en Flux



AUTOMATISEE

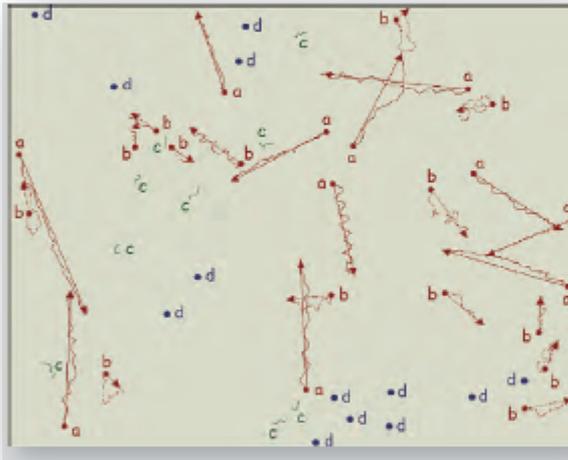
Computer aided
assisted analysis
CASA



Des technologies différentes:
-densité optique
-caméra + microscope

Evaluation de la mobilité

Manuelle: entre lames et lamelles



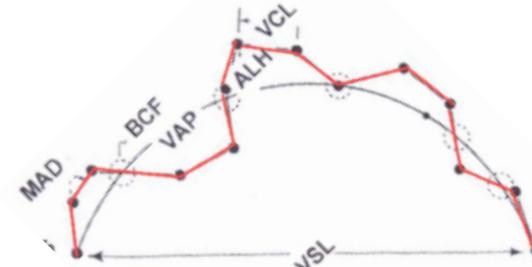
Automatisée



Mobilité totale

- a progression rapide et linéaire
- b progression lente ou peu linéaire
- c non progressif
- d immobiles

ESTIMATION / COMPTAGE



Critère de Mortimer, 1995

- VCL > 180 $\mu\text{m/s}$
- ALH > 6 μm
- LIN < 45%
- WOB (VAP/VCL) < 50%

Paramètres

VAP ($\mu\text{m/s}$)

VSL ($\mu\text{m/s}$)

VCL ($\mu\text{m/s}$)

ALH (μm)

BCF (Hz)

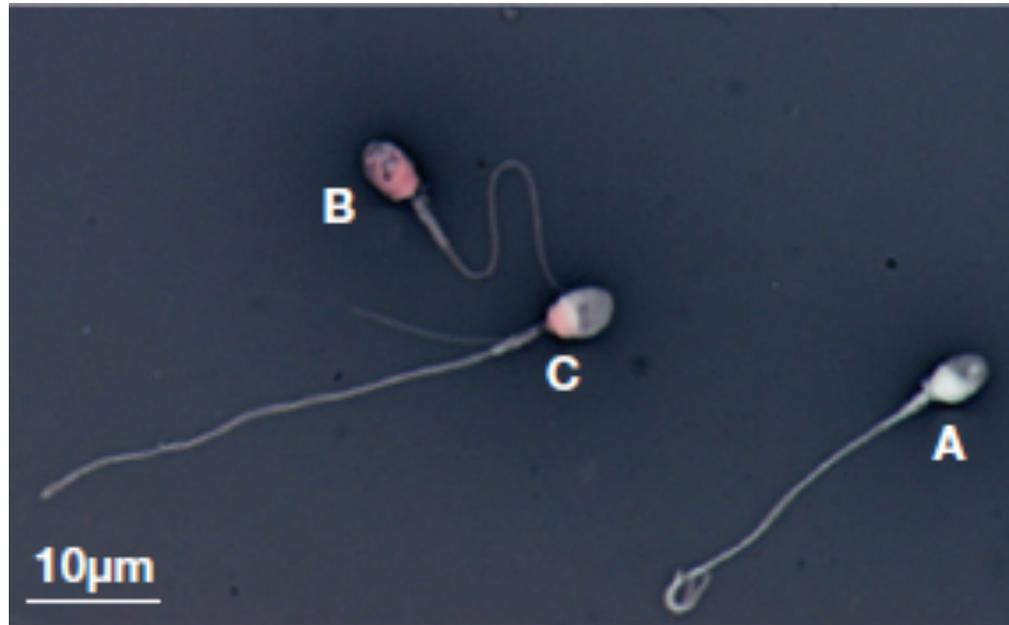
STR (VSL/VAP) (%)

LIN (VSL/VCL) (%)

Hyperactivation

Evaluation de la vitalité

Test à l'éosine ou éosine-négrosine



Bioforma

A spermatozoïde non coloré vivant

B spermatozoïde coloré en rose au niveau de la tête = spermatozoïde mort

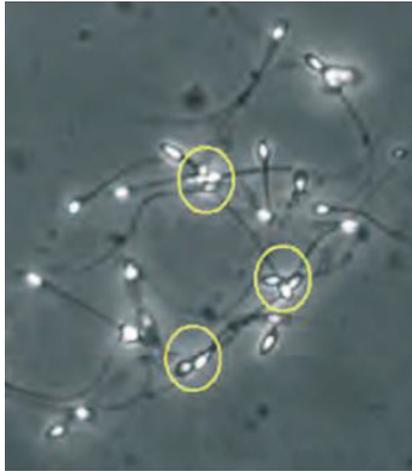
C spermatozoïde faiblement et partiellement coloré en rose = spermatozoïde mort

% de spermatozoïdes vivants > % de spermatozoïdes mobiles (a+b+c)

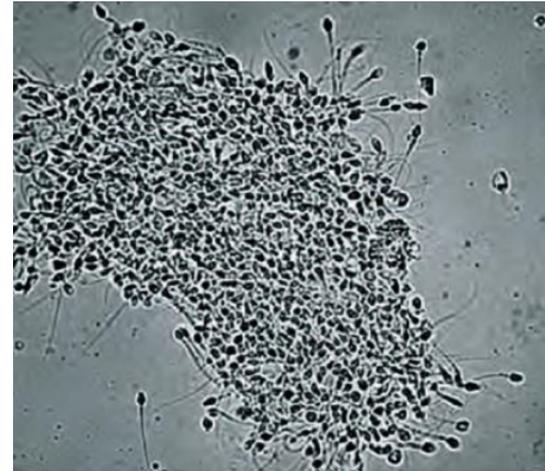
Présence d'agglutinats: Rechercher la présence d'ACAS

Traumatisme
Infection

Bien différencier des agrégats des agglutinats



Agglutination spécifique de spermatozoïdes **mobiles** par la têtes



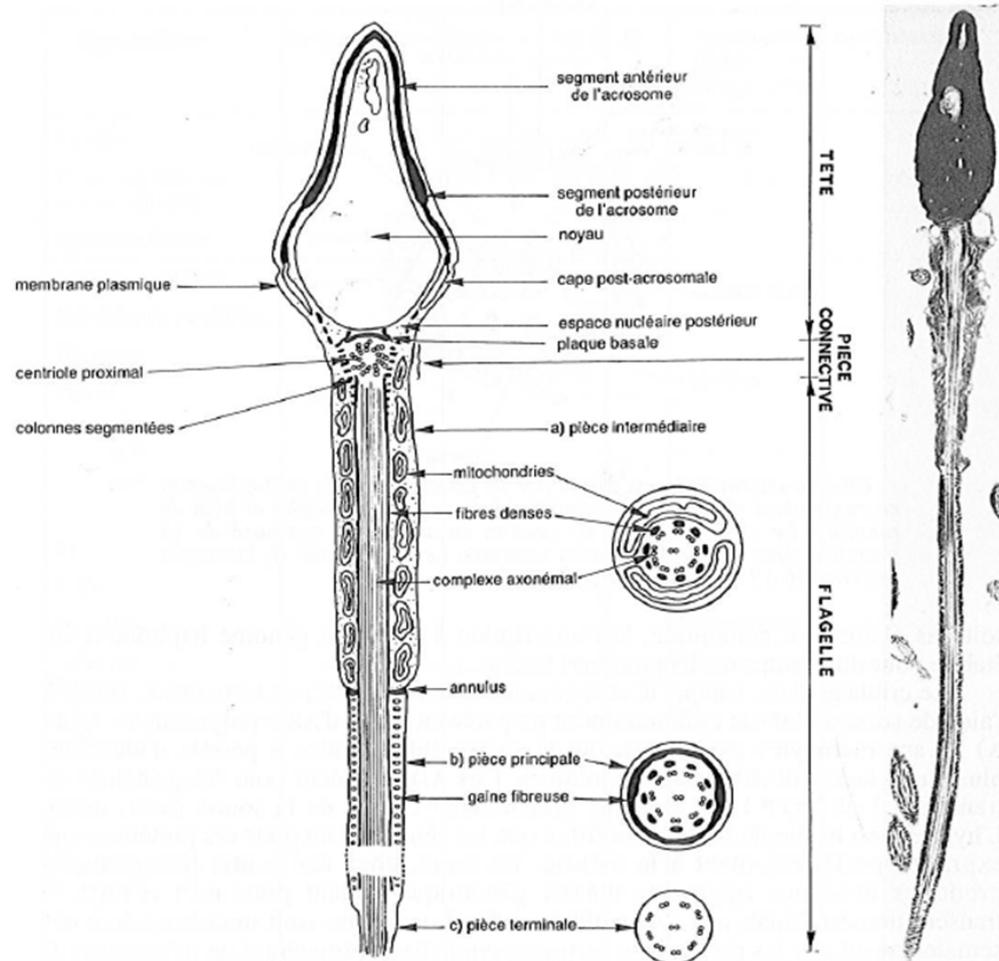
Agrégation non spécifique de spermatozoïdes immobiles

Bioforma

- Détection directe d'IgG et IgA sur les spermatozoïdes (particules de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-IgA et anti-IgG)
- Rechercher la présence de particules fixées sur les spermatozoïdes mobiles
- % de spermatozoïdes recouverts de billes pour 100 spermatozoïdes mobiles observés : **POSITIF si > 50%**

Evaluation de la morphologie (1)

% de spermatozoïdes morphologiquement normaux sur sperme frais et après TMS:
Typique/Atypique



Evaluation de la morphologie (2)

- La **classification de David modifiée** est celle la plus utilisée en France
 - Classement des anomalies
 - tête (7)
 - pièce intermédiaire (3)
 - pièce principale (5)
 - Calcul de l'index des anomalies multiples (IAM) ou index de tératozoospermie (TZI):
Nombre moyen d'anomalie de classe par spermatozoïde anormal
- La **classification de Kruger**: internationale
Anomalies répertoriées en 4 classes

+ PNN
+ autres cellules

- 1 - **Tête** : Morphologie, acrosome, vacuole
- 2 - **Pièce intermédiaire** : base, implantation, épaisseur
- 3 - **Pièce principale (flagelle)** : dimension, linéarité
- 4 - **Reste cytoplasmique** : présence ou absence

Norme OMS

Automatisation +++

Normes

	N	Centiles			
		2.5	(95% CI)	5	(95% CI)
Semen volume (ml)	1941	1.2	(1.0–1.3)	1.5	(1.4–1.7)
Sperm concentration (10^6 /ml)	1859	9	(8–11)	15	(12–16)
Total number (10^6 /Ejaculate)	1859	23	(18–29)	39	(33–46)
Total motility (PR + NP, %)*	1781	34	(33–37)	40	(38–42)
Progressive motility (PR, %)*	1780	28	(25–29)	32	(31–34)
Normal forms (%) *	1851	3	(2.0–3.0)	4	(3.0–4.0)
Vitality (%)	428	53	(48–56)	58	(55–63)

* Classification de Kruger

Cooper et al., Human Reprod Update 2010

Classification de David: quelle norme?

	Distribution range (percentiles)	
	1st	5th [95% CI]
Normal spermatozoa	13	23 [20–26]
Sperm defect categories*	99th	95th [95% CI]
Tapered head	7	3 [2–4]
Thin head	21	14 [12–16]
Microcephalic	11	7 [5–9]
Macrocephalic	3	1 [0–2]
Multiple heads	4	2 [1–3]
Abnormal post-acrosomal region	52	42 [39–45]
Abnormal acrosomal region	74	60 [57–63]
Excess residual cytoplasm	8	4 [3–5]
Thin midpiece	1	0
Bent or misaligned tail	16	13 [11–15]
No tail	9	5 [4–6]
Short tail	4	1 [0–2]
Irregularly shaped tail	5	2 [1–3]
Coiled tail	26	17 [15–19]
Multiple tails	3	1 [0–2]
Multiple Anomalies Index (MAI)	2.08	1.92

Spermocytogramme

Spermatozoïde normal



Tête

Longueur entre 4 et 5 μm

Largeur entre 2,5 et 3 μm

Acrosome

40 à 70% de la surface de la tête

Pièce intermédiaire

1,5 à 2 X la longueur de la tête

Flagelle

10 X la longueur de la tête

! Anomalies monomorphes > 50%

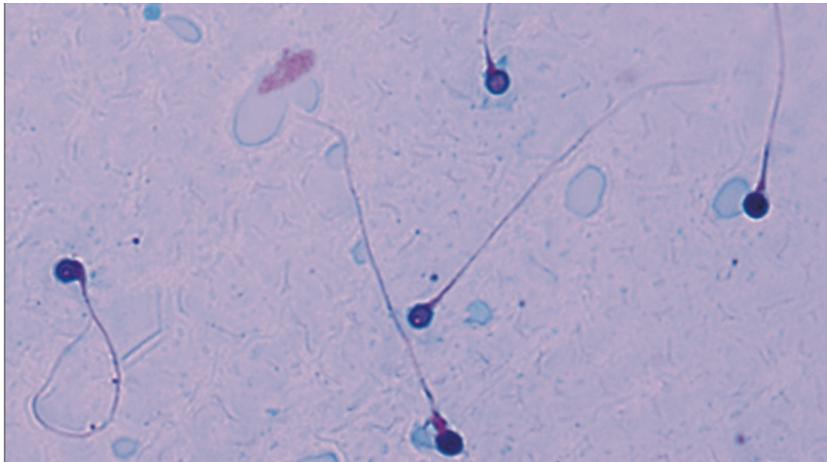
GENETIQUE +++

Tératozoospermie monomorphe

Globozoospermie

Tête

Petite tête ronde en tête d'épingle à région acrosomique anormale



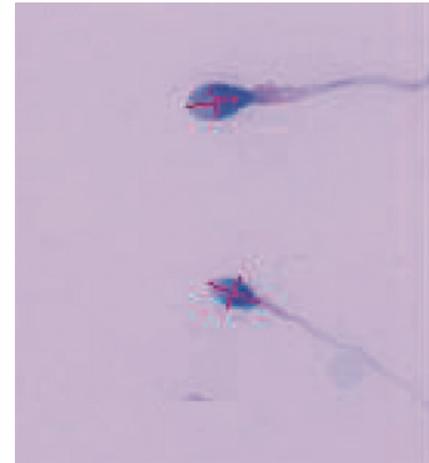
SPATA 16
DPY 19 L2

Acrosome contient des enzymes protéolytiques indispensable pour la traversée de la ZP
Absence de fécondation, activation ovocytaire

Macrocéphalie

Tête

$> 5 \mu\text{m}$ de long ET $> 3 \mu\text{m}$ de large

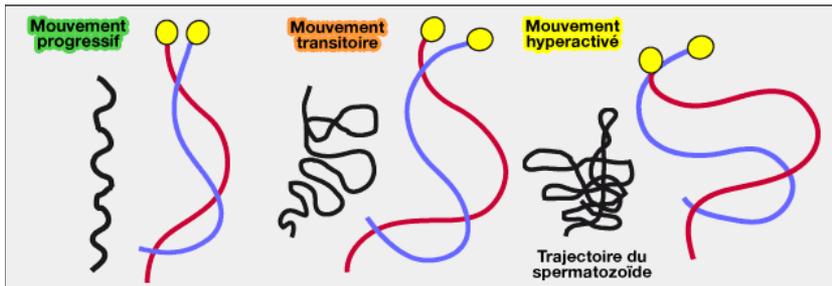
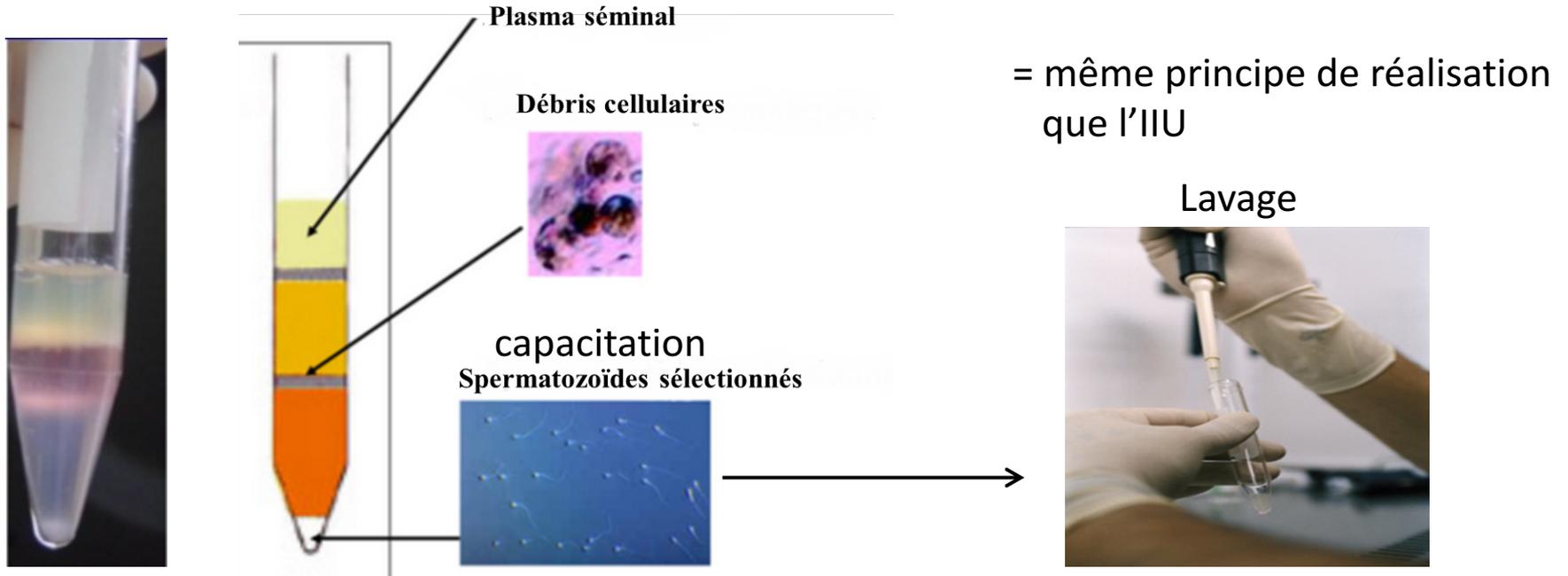


AURORA Kinase

Contre indication à la prise en AMP
Aneuploidie +++

CONSEIL GENETIQUE

Test de Migration Survie (TMS)



Nombre de spermatozoïdes mobiles progressifs

$\geq 1 \text{ million/ml} = \text{IIU}$

$\geq 500 \text{ 000/ml} = \text{FIVc}$

$< 500 \text{ 000/ml} = \text{ICSI}$

$a+b \geq 60\%$

Spermoculture, bactériologie

- **Sur le sperme:** recherche de germes usuels (ED et culture) + mycoplasme (UU et UH)
- **Sur les urines:** recherche de chlamydia, gonocoque +/- Mycoplasma genitalium (=IST) sur 1^{er} jet urinaire – RT PCR

➤ Spermoculture +: reconstrôler pour **différencier une contamination d'une réelle infection**

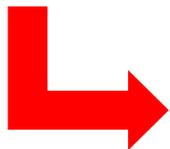
Contamination	Flore polymorphe (≥ 3 espèces)
Germes pathogènes de par leur présence	<i>Chlamydiae trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoea</i> <i>Mycoplasma genitalium</i>
Germes pathogènes au seuil de ≥ 1.102 UFC/mL	Entérobactéries : <ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Proteus mirabilis</i>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>• <i>Morganella morganii</i>
Germes pathogènes au seuil de ≥ 5.103 UFC/mL	<i>Corynebacterium seminale/glucoronyticum</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Candida albicans</i>
Germes pathogènes au seuil de ≥ 1.104 UFC/mL	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>

SEUILS de positivité
des principaux germes
(recommandations de la
société française de
microbiologie)

Réglementation

Arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d' AMP

- Investigations biologiques à réaliser préalablement avant AMP
 - ❖ Spermogramme-spermocytogramme + TMS: < 6mois avant 1^{ère} tentative, puis tous les ans
 - ❖ Spermoculture: < 6 mois
 - ❖ Tests de sécurité sanitaire: HIV, Hépatite B, Hépatite C, Syphilis: < 3 mois avant la première tentative puis tous les ans



Orienter le couple dans un circuit **RISQUE VIRAL**

- ❖ Recherche du virus **ZIKA**: sérologie +/- RT-PCR sur le plasma séminal pour les patients ayant voyager dans une zone à risque (site ECDC)

Anomalies du spermogramme et examens complémentaires

- Aspermie: EJR complète
- Hypospermie: biochimie séminale (BS), EJR incomplète
- Hyperspermie: non pathologique Mais attention au oligozoospermie de dilution
- PH acide ou basique: BS
- Oligo-crypto-azoospermie: sécrétoire ou obstructif?
- Nécrozoospermie: BS
- Asthénozoospermie – akinétozoospermie: BS, ME, recherche ACAS si agglutinat
- Tératozoospermie poly/monomorphe: étude génétique
- Leucytospermie +: spermoculture, ECBU, élastase, IL6, BS

Biochimie séminale

Hypospermie
Asthénospermie
Nécrozoospermie
Inflammation génitale

- Normes faite pour une DA de 5 jours
- Techniques manuelles
- Dosage par série (stockage à -20°C)

Valeurs
pathologiques

Prostate	Citrate ($\mu\text{mol}/\text{éjaculat}$)	<35	Cinétique enzymatique : mesure de l'absorbance due à la consommation de NADH
	Zinc ($\mu\text{mol}/\text{éjaculat}$)	<2,9	Test colorimétrique
	Phosphatase acide (U/ éjaculat)	<1 665	Test colorimétrique
Vésicule séminale	Fructose ($\mu\text{mol}/\text{éjaculat}$)	<15	Cinétique enzymatique: mesure de l'absorbance du NADH produit
Epididyme	Carnitine libre (nmol/ éjaculat)	<275	Test colorimétrique
	α 1-4 glucosidase (mU/ éjaculat)	<20	Spectrophotométrie

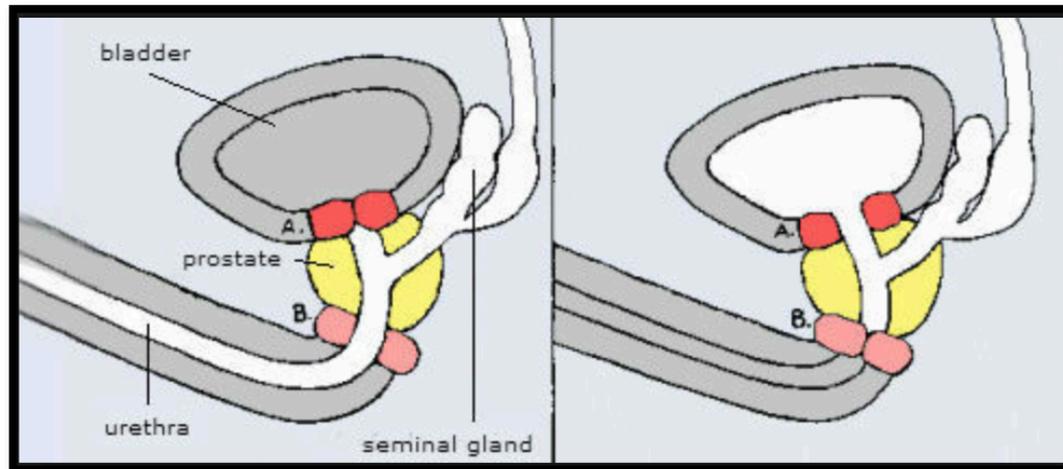
*Tests réalisés à l'hôpital Cochin dans le service SDBA

Recherche de spermatozoïdes dans les urines

Aspermie/hypospermie

- ✓ Pathologie neurologique
- ✓ Chirurgie prostatique
- ✓ Médicaments

1. Phase pré-analytique : alcalinisation des urines
2. Contrôle du PH sur quelques gouttes d'urine: 7,2-7,8
3. Recueil de sperme puis d'urine
4. Si absence de spermatozoïde dans les urines, doser le fructose (VS)



Reflux du sperme vers la vessie lors de la phase d'expulsion

Recherche d'une inflammation génitale

1

Cellules rondes $\geq 1.10^6/\text{ml}$

Coloration jaune-brun des PNN



Leucoscreen: réaction péroxidasique des granulations
Nombre de PNN pour 100 cellules rondes (%)

Leucocytospermie = Leucoscreen (%) X Nombre de cellules rondes

2

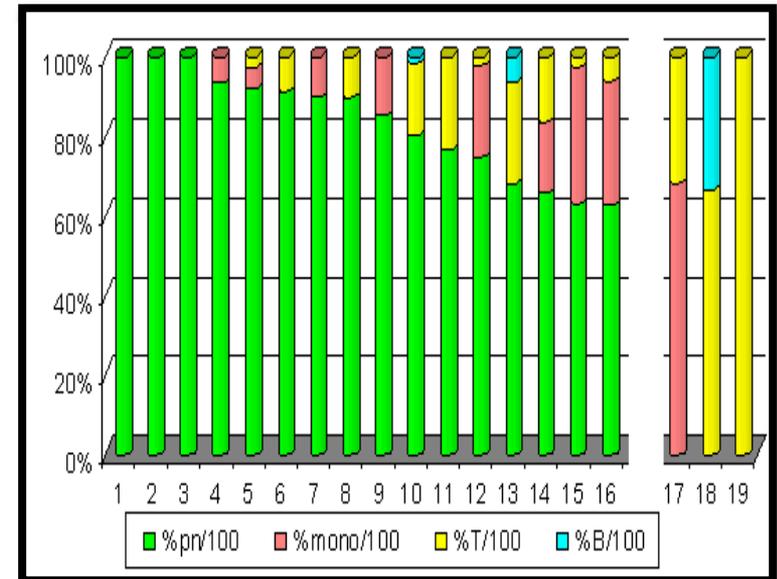
sur le frottis du spermocytogramme : Nombre de PNN pour 100 spermatozoïdes: à rapporter à la concentration spermatique du sperme frais

OMS

Autres manières d'évaluer le SIGM

- Déterminer une **formule leucocytaire**:

- CD45 panleucocytaire
- CD15 et 16 = PNN
- CD11c et CD14 = lignée monocytaire,
- CD16 et CD56 = NK,
- CD19 et CD20 = LB, CD4 et CD8 = LT T.

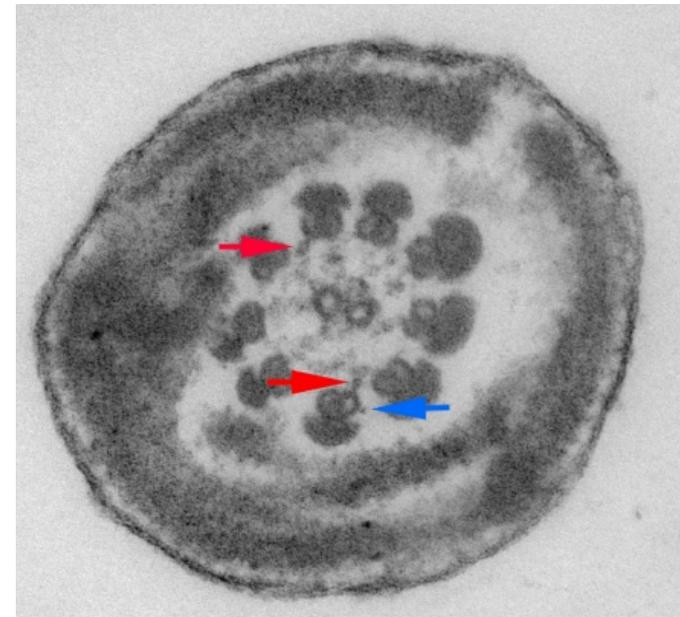
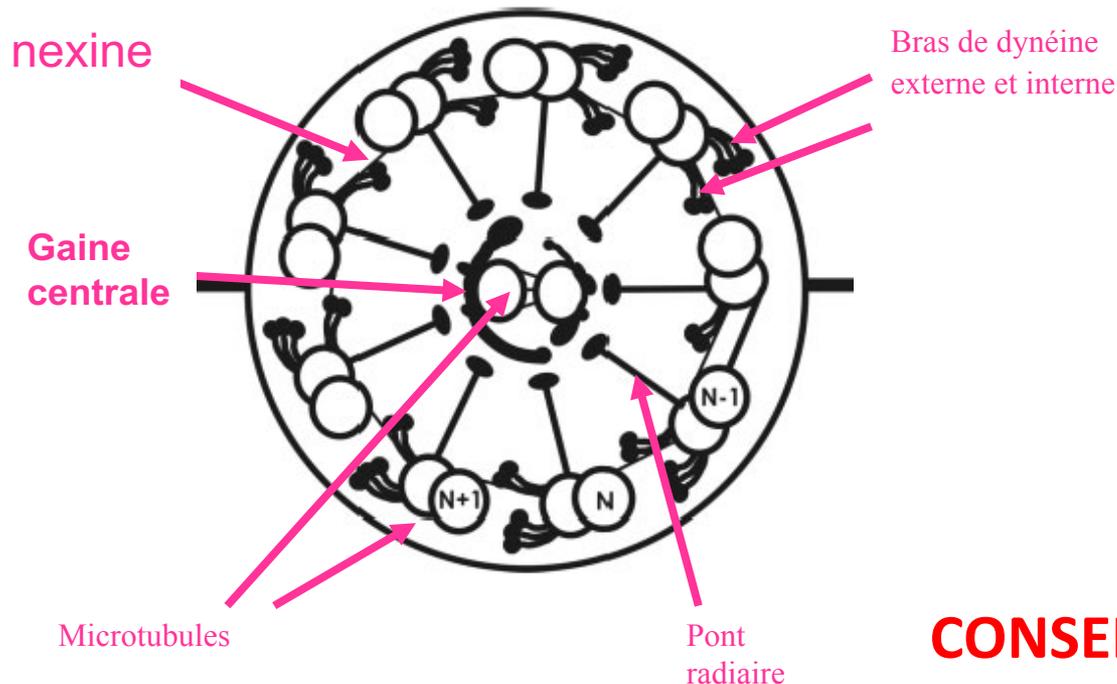


- **Protéase** relarguée par les PNN: élastase
- **Cytokines**: IL6, IL8, TNF

Microscopie électronique

- **Tératozoospermie monomorphe**: globozoospermie (reliquat d'acrosome?) +++
- **Akinétozoospermie**
 - Syndrome de Kartagener: dyskinésie flagellaire avec absence de bras externe de dynéine (DNAH5, DNAI1)

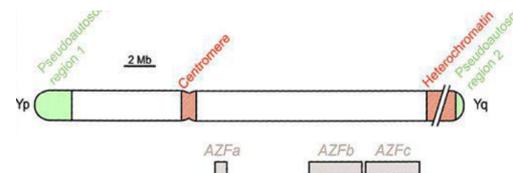
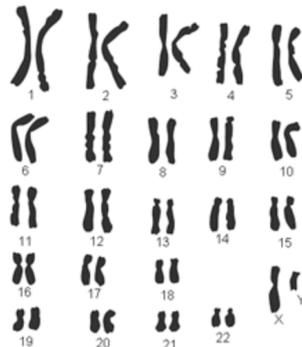
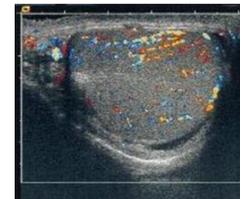
Axonème



CONSEIL GENETIQUE

Bilan devant une azoospermie (1)

- Rechercher à l'interrogatoire une cause: ATCD chimio/RT, fièvre très élevée dans les 3 mois précédent le recueil
- **Confirmer l'azoospermie** par un 2^{ième} prélèvement +++
- **Examen clinique**: taille des testicules, palpation des canaux déférents
- +/- échographie testiculaire et du carrefour urogénital
- **Bilan hormonal**: FSH, LH, Inhibine B, testostérone totale et biodisponible, prolactine
- **Bilan génétique**: caryotype standart, recherche de la microdélétion AZF
Si absence de déférent, demander une recherche de **mutation du CFTR**



Etiologie des Azoospermies (2)

Origine obstructive (35%)

- obstacle sur les voies excrétrices

Congénitale : ABCD +++

Hypospermie

PH acide

Diminution / absence de
sécrétion des VS +/- épididymaire

Déférents non palpable

Absence de déférent à l'échographie

Présence d'une mutation

CFTR/polymorphisme 5T de l'intron 8

CONSEIL GENETIQUE

Acquise: séquelles d'infection génitale,
ATCD vasectomie

Ponction épididymaire +/- testiculaire
Pronostic très favorable

Origine sécrétoire (65%)

- Trouble de la production des spermatozoïdes par le testicule de cause

périphérique

- **génétique** = anomalie de nombre (47,XXY) ou structure des chromosomes (translocation, microdélétion du chromosome Y)

- **acquise** = cryptorchidie, chirurgie inguino-scrotale, orchite infectieuse, toxique, trauma testiculaire, torsion

- **idiopathique** = 50% des cas

centrale = endocrinienne

Hypogonadisme Hypogonadotrope

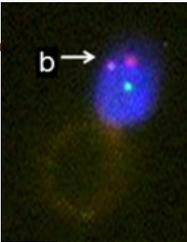
Ponction testiculaire
Facteurs prédictifs
Pronostic réservé

TECHNIQUE EVALUANT LA QUALITE DU NOYAU DES SPERMATOZOIDES

1. Anomalies génétiques du spermatozoïde



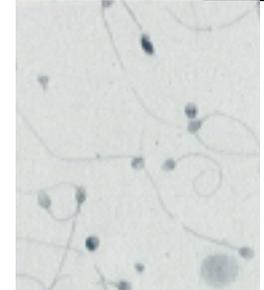
Fluorescence In Situ Hybridation



2. Défauts de condensation de la chromatine



Bleu de Toluidine (TEM)
Bleu d'aniline (AB)
Chromomycine A3 (CMA3)



3. ADN simple brin (natif ou après dénaturation)

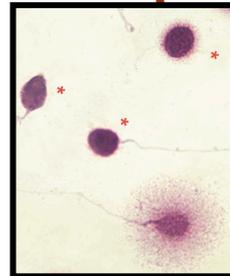


Acridine orange (AO) lame +++
Sperm chromatin structure assay (SCSA) FCM

4. ADN fragmenté



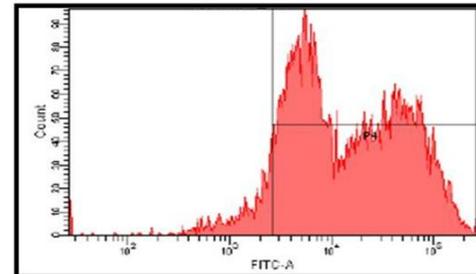
TUNEL assay (FCM ou lames) +++
COMET assay
Sperm Chromatin Dispersion (SCD)



5. ADN oxydé



8 OHdG



- 1: Macrocéphale, remaniement chromosomique
- Mesure directe avec des sondes fluorescentes /colorants ou indirecte en mesurant la susceptibilité de l'ADN à être dénaturé
- Pas de normes (2, 3, 4 et 5)



Je vous remercie pour votre attention