

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2022

N° 17

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Elise ALLEYSSON

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 27 avril 2022

**IMPACT DE LA MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES SUR LA
FECONDATION EN FIV CLASSIQUE : EXPERIENCE AU CHRU DE
TOURS**

JURY

Présidente : Pr Claire Pouplard (pharmacienne) - Professeure des Universités - Praticien hospitalier et Chef de service - Service d'Hématologie Hémostase - CHRU Tours

Membres :

Dr Cynthia Frapsauce (pharmacienne) - Praticien hospitalier - Service de Médecine et Biologie de la Reproduction - CHRU Tours

Dr Laurent Corcia (pharmacien) - Praticien hospitalier et Responsable unité de Biologie - Service de Médecine et Biologie de la reproduction - CHR Orléans

Directeur de thèse : Pr Fabrice GUERIF (pharmacien) - Professeur des Universités - Praticien hospitalier et Chef de service - Service de Médecine et Biologie de la Reproduction - CHRU Tours

ANNEE : 2021 - 2022

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

7 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBault	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHÉMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

37 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAIE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
OUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

2 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HILALI	Soukaïna	PHARMACOGNOSIE
--------	----------	----------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 27/04/2022

*L'étudiant
Mme Elise ALLEYSSON*

*Le Doyen de la Faculté
Professeur Véronique Maupoil*

Remerciements

Aux membres du jury

Madame la Professeure Claire POUPLARD, vous nous faites le très grand honneur de présider cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous m'avez accordé.

Monsieur le Professeur Fabrice GUERIF, je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse qui a été un apprentissage très formateur grâce à vous. Votre expérience et vos conseils précieux m'ont permis de mener à bien l'élaboration de ce travail.

Monsieur le Docteur Laurent CORCIA, je vous remercie pour votre accueil dans votre service et pour la formation que vous m'avez dispensée, je garderai un très bon souvenir de cette année.

Madame la Docteure Cynthia FRAPSAUCE, je vous remercie d'avoir accepté l'analyse de ce travail et la participation au jury de cette thèse.

A l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU de Saint Etienne pour m'avoir accueillie et initiée à la biologie de la reproduction durant mon externat qui a confirmé mon envie de me spécialiser dans cette discipline.

A l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHR d'Orléans, pour sa formation, sa bonne humeur, sa patience (même quand j'ai maltraité les pipettes), et son aide matérielle et psychologique lors de la rédaction de cette thèse

A mes parents, pour leur patrimoine génétique et les 26 ans de services après-vente

A ma sœur, pour ses surnoms inventifs qui ont jalonné mon enfance

A ma famille pour les moments partagés ensemble

A Eric pour ses gratins dauphinois

A tous ceux qui ont été là pendant mes études et mon internat,

Carl, pour son sens de l'humour et du compliment (mes cheveux te remercient également), et pour m'avoir maintenue sous forme humaine pendant la PACES,

Pauline, pour son amitié depuis le collège dont je garde un bel album photos, pour ses snaps inspirants et ses cartes postales arrivant à point

Arnaud, pour son soutien pendant une grande partie de mes études

Romane, Estelle, Mathilde, Pauline, Brice, Olivier et Nicolas, pour les bons moments en stage comme en-dehors de l'hôpital, pour m'avoir fait rire et aidée en milieu hostile

Alex, pour son hospitalité et sa sagesse venue avec ses cheveux blancs

Félix, pour son encouragement dans mes projets artistiques et son assistance dans les fins de vie de Sapin et Ciboulette

Table des matières

I.	Introduction	6
1.	Généralités.....	6
2.	Analyse du sperme	8
2.1.	Spermogramme.....	8
2.2.	Spermocytogramme	11
3.	Etapes de la fécondation <i>in vitro</i> classique.....	17
3.1.	La fécondation <i>in vivo</i>	17
3.2.	La fécondation <i>in vitro</i>	20
4.	Contexte et objectifs de la thèse	25
4.1.	Historique de l'évaluation de la morphologie et de l'établissement de normes	25
4.2.	Contexte actuel	26
II.	Matériel et méthodes	28
1.	Population d'étude.....	28
2.	Préparation et analyse du sperme	28
3.	Déroulement de la tentative de FIV classique	29
3.1.	Stimulation ovarienne.....	29
3.2.	Ponction ovarienne.....	29
3.3.	Préparation du sperme	29
3.4.	Mise en fécondation et évaluation de la fécondation	30
3.5.	Culture et évaluation de la qualité embryonnaire	31
3.6.	Transfert et suivi post-transfert	31
4.	Statistiques	32
III.	Résultats	34
1.	Caractéristiques générales de la population étudiée.....	34
1.1.	Population féminine	34
1.2.	Population masculine	35
2.	Place de la morphologie des spermatozoïdes	39
2.1.	Caractéristiques biologiques générales des tentatives de FIVc	39
2.2.	Comparaison du groupe < 4 % avec le groupe ≥ 4 % de formes typiques	41
IV.	Discussion	51
V.	Conclusion	61

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : structure générale d'un spermatozoïde humain en microscopie électronique

Figure 2 : algorithme décrivant la marche à suivre pour l'évaluation morphologique des spermatozoïdes

Figure 3 : exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Figure 4 : spermatozoïdes colorés avec la technique de Papanicolaou et classés selon les critères stricts

Figure 5 : schéma de la fécondation et du développement embryonnaire *in vivo*

Figure 6 : schéma d'un gradient de densité

Figure 7 : schéma d'une technique de swim-up

Figure 8 : schéma résumé des différentes étapes de la FIVc

Figure 9 : histogramme de distribution du pourcentage de formes typiques

Figure 10 : histogramme de distribution de la synthèse des anomalies des derniers spermogramme et spermocytogramme diagnostiques précédant la tentative de FIVc

Figure 11 : régression linéaire simple entre le taux de fécondation totale et le nombre de FT

Figure 12 : proportions relatives des issues de fécondation selon le nombre de FT

Tableaux

Tableau I : analyse microscopique du sperme

Tableau II : grades de la classification de Gardner et Schoolcraft

Tableau III : description de la population des femmes de l'étude

Tableau IV : description de la population masculine de l'étude

Tableau V : description des résultats des derniers spermogramme et spermocytogramme précédant la tentative de FIV

Tableau VI : description des aspects biologiques des tentatives de FIV

Tableau VII : comparaison des paramètres épidémiologiques de la population d'étude entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Tableau VIII : comparaison des résultats des spermogramme et spermocytogramme entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Tableau IX : comparaison des aspects biologiques des tentatives de FIV entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Tableau X : comparaison du TZI moyen des différents groupes d'issues de fécondation

Tableau XI : comparaison du taux de fécondation moyen de la fréquence cumulée des échecs et des pauci-fécondations entre deux groupes de TZI

Tableau XII : comparaison des paramètres spermatiques du spermogramme diagnostique entre le groupe « échec ou pauci-fécondation » et le groupe « fécondation normale »

Tableau XIII : fréquences des issues de fécondation dans les groupes TS isolée et normozoospermie

Tableau XIV : comparaison de la qualité embryonnaire entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Tableau XV : comparaison des aspects cliniques des tentatives de FIV entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Tableau XVI : comparaison des résultats de la littérature portant sur le lien entre la morphologie des spermatozoïdes avec le taux de fécondation et/ou la fréquence des échecs de fécondation

Tableau XVII : comparaison des résultats de la littérature portant sur le lien entre la morphologie des spermatozoïdes et la qualité embryonnaire à J2, le taux de grossesse et le taux de naissance

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribo-nucléique
AMH : *Anti-müllerian hormone*
AMP : Assistance médicale à la procréation
CFA : Compte de follicules antraux
COC : Complexe cumulo-ovocytaire
ESHRE : *European Society of Human Reproduction and Embryology*
FIV : Fécondation *In Vitro*
FIVc : Fécondation *In Vitro* classique
FSH : *Follicle stimulating hormone*
FT : Formes typiques
GnRH : *Gonadotrophine releasing hormone*
GP : Globule polaire
 β hCG : *Hormone chorionic gonadotrophine*
ICSI : Intracytoplasmic sperm injection
IIU : Insémination intra-utérine
IMC : Indice de masse corporelle
LH : *Luteinizing hormone*
MAI : Multiple abnormabilities index
MII : Ovocytes en métaphase II
OMS : Organisation mondiale de la santé
ND : Non Déterminé
NS : Non Significatif
PN : Pronucleus/pronuclei
S : Significatif
TS : Tératozoospermie
TZI : Teratozoospermia index

I. Introduction

1. Généralités

La fertilité d'un couple correspond à sa capacité à initier une grossesse. A l'inverse, on parle d'infertilité lorsqu'un couple ne parvient pas à concevoir un enfant au bout de 12 mois de rapports sexuels réguliers en l'absence de contraception (1). Elle concerne aujourd'hui entre 15 et 25 % des couples en âge de procréer, et trouve son origine dans des causes masculines exclusivement (20 % des cas), féminines exclusivement (33 % des cas), mixtes (39 % des cas) ou idiopathiques (8 % des cas). Ainsi, un facteur masculin d'infertilité est retrouvé dans 60 % des cas (2).

La prise en charge de ces patients dans le cadre de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) est règlementée en France par la loi de bioéthique depuis 1994, dernièrement révisée le 2 août 2021, et est définie dans l'article L2141-1 du code de la santé publique telle que : « l'assistance médicale à la procréation s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception *in vitro*, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle. ».

Historiquement, la première naissance par fécondation *in vitro* classique (FIVc) a eu lieu en 1978, suivie en 1992 par la première naissance obtenue grâce à la technique de micro-injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde, aussi nommée ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*). Depuis lors, la proportion de nouveau-nés issus de l'AMP ne cesse de croître, passant de 2,6 % des enfants nés dans la population générale française en 2009 à 3,6 % en 2019 (3).

Pour parvenir à obtenir ces grossesses, l'AMP se décline en différentes techniques :

- **L'insémination intra-utérine (IIU)** : elle consiste à introduire avec un cathéter les spermatozoïdes, préparés à partir du sperme du conjoint ou d'un donneur, directement dans l'utérus après une stimulation pauci-folliculaire. Elle permet d'optimiser l'ovulation et la rencontre des gamètes. La fécondation se déroule *in vivo* dans les trompes de la femme où les spermatozoïdes auront migré depuis l'utérus.

- **La fécondation *in vitro* classique (FIVc)** : elle consiste à reproduire en laboratoire ce qui se passe naturellement dans les trompes féminines, c'est-à-dire la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire. Après une stimulation multi-folliculaire, les complexes cumulo-ovocytaires prélevés lors de la ponction sont mis en contact avec des milliers de spermatozoïdes préparés à partir du sperme du conjoint. A l'issue d'un temps de culture plus ou moins long, le ou les embryon(s) obtenu(s) est/sont transféré(s) dans l'utérus avant leur nidation potentielle.
Cette technique permet de court-circuiter les trompes (infertilités tubaires) et de rapprocher les spermatozoïdes des ovocytes (infertilités masculines modérées). Elle est aussi indiquée en cas de trouble de l'ovulation, d'infertilité inexplicée et d'échec des IIU.
- **La fécondation *in vitro* avec micro-injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)** : elle consiste à injecter un seul spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte mature pour le féconder. Les étapes du développement embryonnaire sont identiques à celles d'une FIVc. Cette technique nécessite au préalable une étape de décoronisation afin de retirer les cellules du cumulus oophorus entourant l'ovocyte, et une étape de sélection des spermatozoïdes. Elle est proposée en cas d'hypofertilité masculine majeure ou d'échec de fécondation en FIVc.

Afin de poser un diagnostic et de décider de la meilleure stratégie à adopter, un bilan initial féminin et masculin sont réalisés.

Du côté féminin, le bilan de base comporte un interrogatoire, un examen clinique, une échographie pelvienne, un bilan hormonal permettant d'estimer la qualité de l'ovulation et l'état de la réserve ovarienne, et une évaluation de la perméabilité des trompes de Fallope.

Le bilan initial masculin contient, en plus de l'interrogatoire et de l'examen clinique, un spermogramme, un spermocytogramme et éventuellement un test de migration survie.

En cas d'anomalie d'un des examens précédents ou d'un point d'appel à l'interrogatoire et/ou à l'examen clinique, des examens complémentaires peuvent être prescrits.

2. Analyse du sperme

Le sperme est constitué des spermatozoïdes baignant dans le plasma séminal. Ce dernier provient des sécrétions des glandes annexes (vésicules séminales, prostate, épидidyme et glandes de Cooper).

2.1. Spermogramme

Il constitue l'examen de première intention pour explorer une infertilité d'origine masculine. Il reflète les étapes de production, de formation et de maturation des spermatozoïdes des trois derniers mois.

Il s'effectue sur un prélèvement recueilli par masturbation dans un réceptacle stérile après 2 à 7 jours d'abstinence sexuelle et une aseptie locale. Ce dernier doit être analysé dans l'heure, en respectant le délai de liquéfaction de 15 à 30 minutes. Les modalités de l'analyse suivent les recommandations de l'OMS 2021 (4).

L'examen macroscopique permet d'évaluer l'activité des compartiments participant à l'éjaculation grâce à la détermination :

- du volume, par calcul à partir de la pesée. Il doit être compris entre 1,4 et 6 mL. En – dessous de ces valeurs il s'agit d'hypospermie, tandis qu'il s'agit d'hyperspermie au-dessus.
- de la viscosité, visualisée à partir de l'écoulement d'une pipette. L'écoulement doit se faire par petites gouttes individualisées de moins de 2 cm de longueur.
- du pH, par comparaison de la couleur de la bandelette pH à une gamme étalon. Il doit être supérieur à 7,2. En-dessous de cette valeur, un manque de sécrétions alcalines produites par les vésicules séminales est suspecté.

L'examen microscopique permet quant à lui d'évaluer la qualité et la quantité de la production spermatique à travers les paramètres du **tableau I** suivant. A noter que ces paramètres peuvent également être évalués de manière automatisée.

Tableau I : analyse microscopique du sperme

Paramètres mesurés	Mesures	Normes de l'OMS 2021	Anomalies associées
Concentration en spermatozoïdes	Dilution puis comptage dans une chambre d'hémocytomètre	≥ 16 millions/mL ≥ 39 millions /éjaculat	Oligozoospermie : diminution du nombre de spermatozoïdes dans le plasma séminal Cryptozoospermie : Absence de spermatozoïdes à l'examen direct, mais spermatozoïdes observés après centrifugation Azoospermie : absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat après centrifugation
Mobilité	Evaluation microscopique des proportions relatives des 4 catégories de mouvement a : progressifs rapides b : progressifs lents c : mobiles sur place d : immobiles	$a+b \geq 30 \%$ et/ou $a+b+c \geq 42 \%$	Asthénozoospermie : diminution de la mobilité des spermatozoïdes Akinétospermie : absence totale de mobilité
Agglutinats	Observation microscopique de spermatozoïdes mobiles attachés entre eux par la tête, la pièce intermédiaire ou le flagelle	Absence	Si présence, recherche des anticorps anti-spermatozoïdes associés à une infertilité d'origine immunologique
Vitalité (proportion de spermatozoïdes vivants)	Coloration par éosine-nigrosine ou test hypo-osmotique	$\geq 54 \%$	Nécrozoospermie : proportion importante de spermatozoïdes morts dans le plasma séminal
Concentration en cellules rondes (cellules germinales immatures ou cellules somatiques épithéliales, leucocytes)	Dilution puis comptage des cellules rondes dans une chambre d'hémocytomètre Identification puis numération des leucocytes à partir de la lame du spermocytogramme ou coloration de leurs granulations	Leucocytes < 1million/ mL	Leucospermie : présence de polynucléaires à une concentration supérieure à la norme

En cas d'anomalie(s), un contrôle est effectué trois mois plus tard. Ce délai correspond à la durée d'un cycle de spermatogenèse, soit 74 jours de production au niveau du testicule et 14 jours de transit épидидymaire. Il est important de prendre connaissance des éléments pouvant impacter les résultats (délai d'abstinence, antécédents uro-génitaux, fièvre, prise médicamenteuse, consommation de toxiques, exposition à la chaleur ...) afin d'interpréter correctement l'examen.

En complément de cet examen, une spermoculture, un MAR-test ou encore une biochimie séminale peuvent être réalisés.

2.2. Spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'examen qui permet d'évaluer la morphologie des spermatozoïdes sur frottis.

2.2.1. Description de la structure d'un spermatozoïde

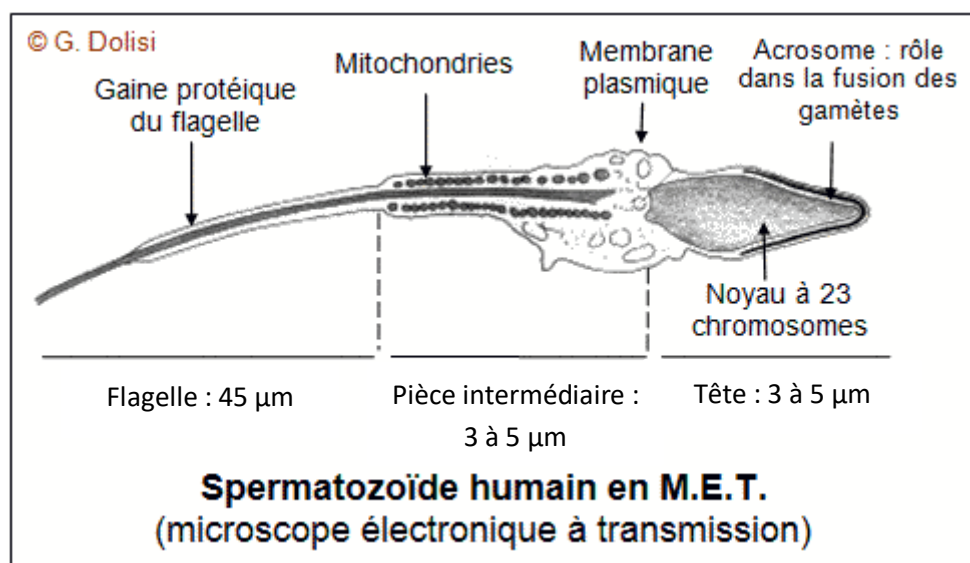
La microscopie électronique est la méthode qui permet d'étudier au mieux la structure d'un spermatozoïde. Il mesure environ 60 μm de long et est composé, en plus de la membrane plasmique qui l'entoure :

- D'une tête ovale et aplatie. Elle contient le noyau qui occupe la majeure partie de la tête et dont la chromatine est très condensée. Il est surmonté par l'acrosome qui recouvre les deux tiers antérieurs du noyau. Le tiers postérieur du noyau est quant à lui entouré de cytoplasme, qui occupe donc une partie limitée, en région post-acrosomique.
- D'un col, joignant la tête et le flagelle, et contenant l'appareil centriolaire proximal.
- D'un flagelle qui se décompose lui-même en trois parties. La première partie est la pièce intermédiaire, constituée du complexe axonemal, de fibres denses et d'une spirale mitochondriale. La deuxième partie est la pièce principale, contenant le prolongement du complexe axonemal, des fibres denses, et une gaine fibreuse. Enfin la troisième partie est composée de la fin du complexe axonemal.

La structure générale d'un spermatozoïde au microscope électronique est présentée dans la **figure 1** ci-dessous :

Figure 1 : structure générale d'un spermatozoïde humain en microscopie électronique

(tirée et modifiée de <http://pierrotdcdl.over-blog.com/2017/11/autour-du-spermatozoide.html> consulté le 13/01/2022 (5))



Ces éléments concourent à assurer les fonctions biologiques du spermatozoïde :

- Migration dans le tractus féminin jusqu'au complexe cumulo-ovocytaire grâce à l'énergie fournie par les mitochondries et aux microtubules de l'axonème qui lui confèrent une trajectoire curvilinéaire.
- Reconnaissance, fixation, fusion et activation de l'ovocyte grâce à la membrane plasmique et aux enzymes contenues dans l'acrosome (acrosine, hyaluronidase).
- Transmission du patrimoine génétique paternel grâce à son noyau haploïde.
- Initiation des premières divisions du zygote grâce au centriole proximal.

Si l'un d'entre eux est altéré, le spermatozoïde peut dysfonctionner.

2.2.2. Etapes de réalisation

Il s'agit dans un premier temps d'étaler 5-10 µL de sperme (brut ou ayant préalablement subi une étape de centrifugation ou de lavage) sur une lame à l'aide d'une lamelle, puis de la faire sécher à l'air libre.

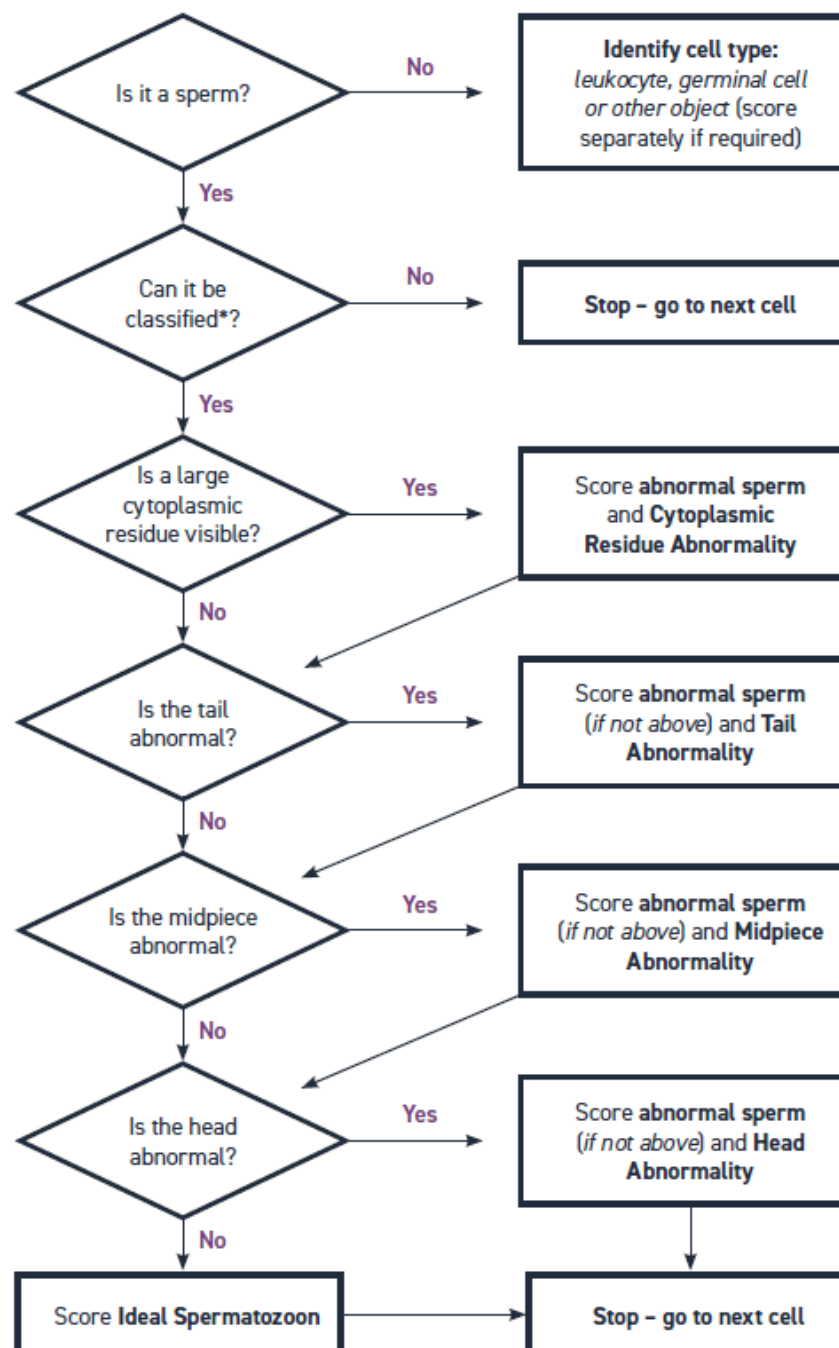
Les étapes suivantes de fixation et de coloration peuvent être réalisées avec différents réactifs. La coloration de Papanicolaou est celle recommandée par l'OMS. De cette manière, la région acrosomique apparaît bleu pâle tandis que la région post-acrosomique apparaît bleu foncé. La pièce intermédiaire peut être rouge et le flagelle peut être coloré en bleu ou en rouge. Les restes cytoplasmiques sont repérés en rouges. Sont également colorées les autres cellules, que ce soient les cellules germinales immatures (spermatides, spermatocytes) ou les cellules non germinales (cellules épithéliales, leucocytes). En dehors de la coloration de Papanicolaou, l'OMS décrit aussi la coloration de Shorr et la coloration rapide telle que Diff-Quick. Ces techniques présentent l'avantage d'être plus rapides que celle de Papanicolaou, mais les résultats obtenus peuvent présenter une faible corrélation entre eux (6).

Pour l'observation, il est conseillé de commencer par avoir une vision globale au grossissement x400 afin d'apprécier la répartition des spermatozoïdes, des autres cellules et des débris. Puis examiner 200 spermatozoïdes intacts consécutifs au microscope à immersion au grossissement x1000. Il s'agit de les répartir en deux groupes : spermatozoïdes normaux ou typiques, et les anormaux ou atypiques. Les spermatozoïdes anormaux font l'objet d'une identification des différentes anomalies qu'ils présentent au niveau de la tête, de la pièce intermédiaire, du reste du flagelle, ou d'un éventuel reste cytoplasmique. Cela doit être réalisé par du personnel formé et habilité, participant régulièrement à des contrôles qualité internes et externes.

L'algorithme décrivant la marche à suivre pour l'observation visuelle fournit par l'OMS (4) est présenté dans la **figure 2** ci-dessous.

Figure 2 : algorithme décrivant la marche à suivre pour l'évaluation morphologique des spermatozoïdes

(tirée du manuel de l'OMS, 6^{ème} édition (4))



* Complete with head and tail, clearly visible and not overlapped by other cells or objects

En alternative à l'analyse visuelle de la morphologie des spermatozoïdes, des méthodes semi-automatisées permettent de classer les spermatozoïdes sur des critères portant sur la tête et la pièce intermédiaire.

2.2.3. Classification de Krüger

Cette classification a été proposée en 1986 par Krüger et son équipe de l'hôpital de Tygerberg et détaillée en 1990 (7). Leur but est d'évaluer de manière reproductible la morphologie des spermatozoïdes afin d'en faire un facteur pronostique du taux de fécondation et du taux de grossesse en FIVc (8). Elle constitue aujourd'hui la classification internationale recommandée par l'OMS (4), qui fournit des planches validées par le Dr Krüger, ainsi qu'une définition précise de la morphologie d'un spermatozoïde normal :

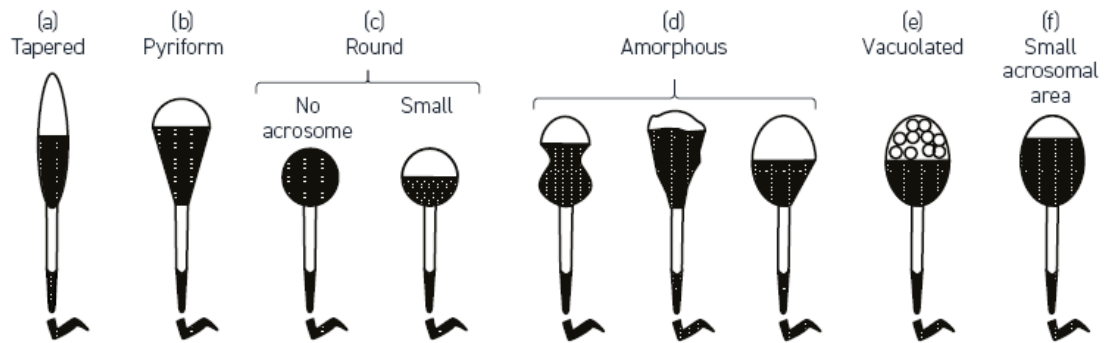
- La tête doit être ovale, lisse et régulière, avec un acrosome occupant 40 à 70 % de son volume. Elle-même mesure 3-5 μm de long sur 2,5-3,5 μm de large. La région post-acrosomique ne doit contenir aucune vacuole tandis qu'un maximum de 2 vacuoles est toléré en région acrosomique si elles restent de petite taille, c'est-à-dire qu'elles occupent moins de 20 % de la tête.
- La pièce intermédiaire doit être d'environ la même taille que la tête et alignée dans le même axe. Elle doit rester mince et régulière.
- Le flagelle doit être de calibre régulier sur toute sa longueur d'environ 10 fois celle de la tête (45 μm). Il est plus fin que la pièce intermédiaire et ne présente pas d'angle aigu.
- Les restes cytoplasmiques ne doivent pas excéder le tiers de la taille d'une tête normale.

Les critères sont dits stricts car les formes limites sont considérées comme anormales, à l'inverse des autres classifications qui les classent parmi les normales. Des exemples d'anomalies sont présentés dans la **figure 3** ci-dessous :

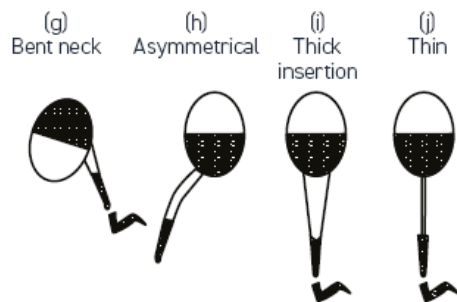
Figure 3 : exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes

(tirée du manuel de l'OMS, 6^{ème} édition (4))

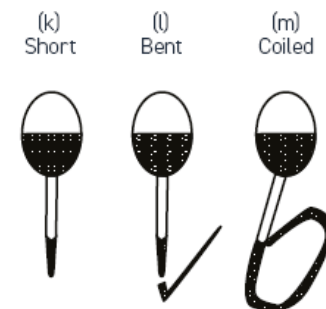
A. Head defects



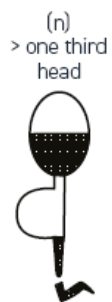
B. Neck and midpiece defects



C. Tail defects



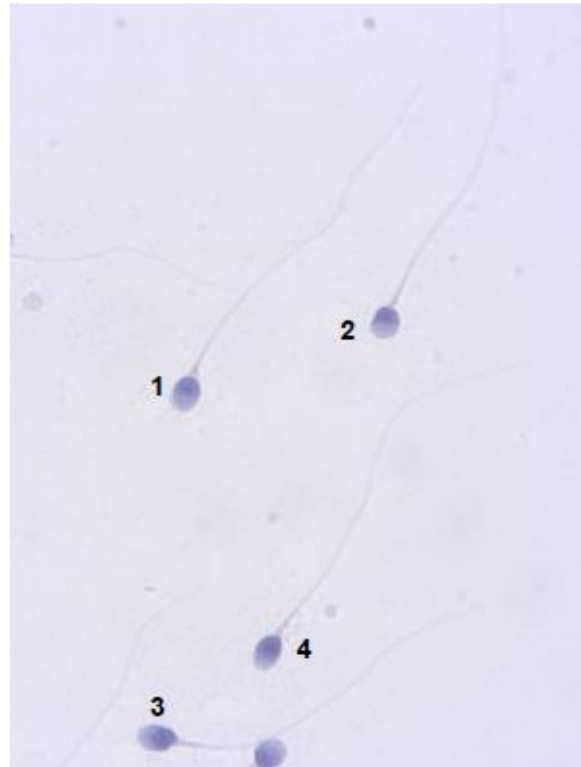
D. Excess residual cytoplasm



Un exemple de spermatozoïdes colorés avec la technique de Papanicolaou et classés selon les critères stricts est présenté dans la **figure 4** ci-dessous :

Figure 4 : spermatozoïdes colorés avec la technique de Papanicolaou et classés selon les critères stricts

(tirée du manuel de l'OMS, 6^{ème} édition (4))



Légende :

- 1 – spermatozoïde normal
- 2/3/4 – spermatozoïdes anormaux

Le nombre de spermatozoïdes normaux ainsi que les anomalies de chacune des parties des spermatozoïdes anormaux sont recensées. Cela permet d'obtenir le pourcentage de spermatozoïdes normaux, la proportion de chacune des anomalies, et de calculer le TZI (*Teratozoospermia Index*). Ce dernier correspond au nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde anormal :

$$TZI = \frac{\text{Somme des anomalies}}{\text{Somme des spermatozoïdes anormaux}}$$

Il est compris entre 1 et 4 (9). Aucune norme n'a été proposée par l'OMS pour le TZI.

Le seuil normal de formes typiques a d'abord été fixé à 14 % (10). En-deçà, on parle de tératozoospermie, c'est-à-dire une proportion trop importante de spermatozoïdes anormaux.

Elle était initialement divisée en deux groupes, le groupe « bon pronostic » ayant 5 à 14 % de formes typiques, et le groupe de « faible pronostic » ayant < 5 % de formes typiques. Par la suite, le seuil de 14 % a été controversé car la majeure partie des hommes fertiles de la population générale ne satisfait pas ce critère (11).

Le seuil de normalité a été abaissé à 4 % dans la 5^{ème} édition de l'OMS et maintenu dans la suivante.

3. Etapas de la fécondation *in vitro* classique

3.1. La fécondation *in vivo*

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes ne sont pas féconds. Cette capacité est inhibée par des facteurs présents dans le plasma séminal. Ils sont notamment représentés par des protéines de surface et du cholestérol qui va s'inclure dans la membrane pour en diminuer la fluidité. Ce n'est qu'au cours de leur migration dans les voies féminines qu'ils acquièrent le pouvoir d'être fécondant. Ce phénomène est la capacitation, la maturation fonctionnelle du spermatozoïde. Elle a lieu d'abord grâce à la glaire cervicale qui permet de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et des glycoprotéines de revêtement inhibitrices de la capacitation qui le recouvrent. De plus, la perte progressive en cholestérol permet à la membrane d'être plus fluide et donc d'extérioriser ses récepteurs tout en laissant entrer des ions calcium. La capacitation se termine au niveau de l'isthme. Elle se traduit par l'hypermobilité des spermatozoïdes qui sont alors capables de progresser à travers les trompes à la rencontre du complexe cumulo-ovocytaire.

Le complexe cumulo-ovocytaire (COC) est le résultat de l'ovogenèse et de l'ovulation. Il est constitué d'un ovocyte, et de cellules périphériques du cumulus oophorus formant la corona radiata. L'ovocyte est bloqué en métaphase II de la méiose, et présente donc un globule polaire dans l'espace péri-vitellin, signant sa maturité nucléaire. Sa maturité cytoplasmique est marquée par les granules corticaux présents sous la membrane plasmique. La zone pellucide de l'ovocyte est de nature glyco-protéique.

La fécondation est la fusion des deux gamètes mâle et femelle, le spermatozoïde et l'ovocyte, pour former une cellule unique nommée zygote. Elle ne peut avoir lieu que dans les 24h suivant l'ovulation. Les spermatozoïdes survivant environ 4 jours dans l'appareil génital féminin, la période de fécondabilité ne dure que 5 jours globalement.

La fécondation débute par la traversée des cellules du cumulus oophorus par les spermatozoïdes grâce à leur hyper-mobilité. Ils parviennent ensuite à la zone pellucide à laquelle ils se fixent selon un mode de reconnaissance spécifique. Cette liaison va induire la réaction acrosomique, qui consiste en la libération du contenu de l'acrosome, notamment de l'acrosine et de la hyaluronidase, permettant la pénétration du spermatozoïde fécondant à l'intérieur de la zone pellucide. Il entre ensuite en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte avec laquelle il fusionne. Cela entraîne un influx de calcium dans l'ovocyte, ce qui a pour effet de l'activer. L'ovocyte libère alors le contenu des granules corticaux (réaction corticale), pour rendre la zone pellucide imperméable à d'autres spermatozoïdes et ainsi éviter la polyspermie.

L'ovocyte peut alors terminer sa méiose, expulser son deuxième globule polaire, et faire apparaître le pronucleus femelle. Le pronucleus mâle se forme à partir du noyau du spermatozoïde remanié. Les deux pronuclei s'accolent, leurs membranes nucléaires respectives disparaissent au cours du phénomène de syngamie : la première division cellulaire de l'embryon peut démarrer.

La première division de segmentation du zygote le transforme en deux cellules nommées blastomères. C'est le stade du premier clivage ou clivage précoce qui survient entre 24 et 30 heures après la fécondation.

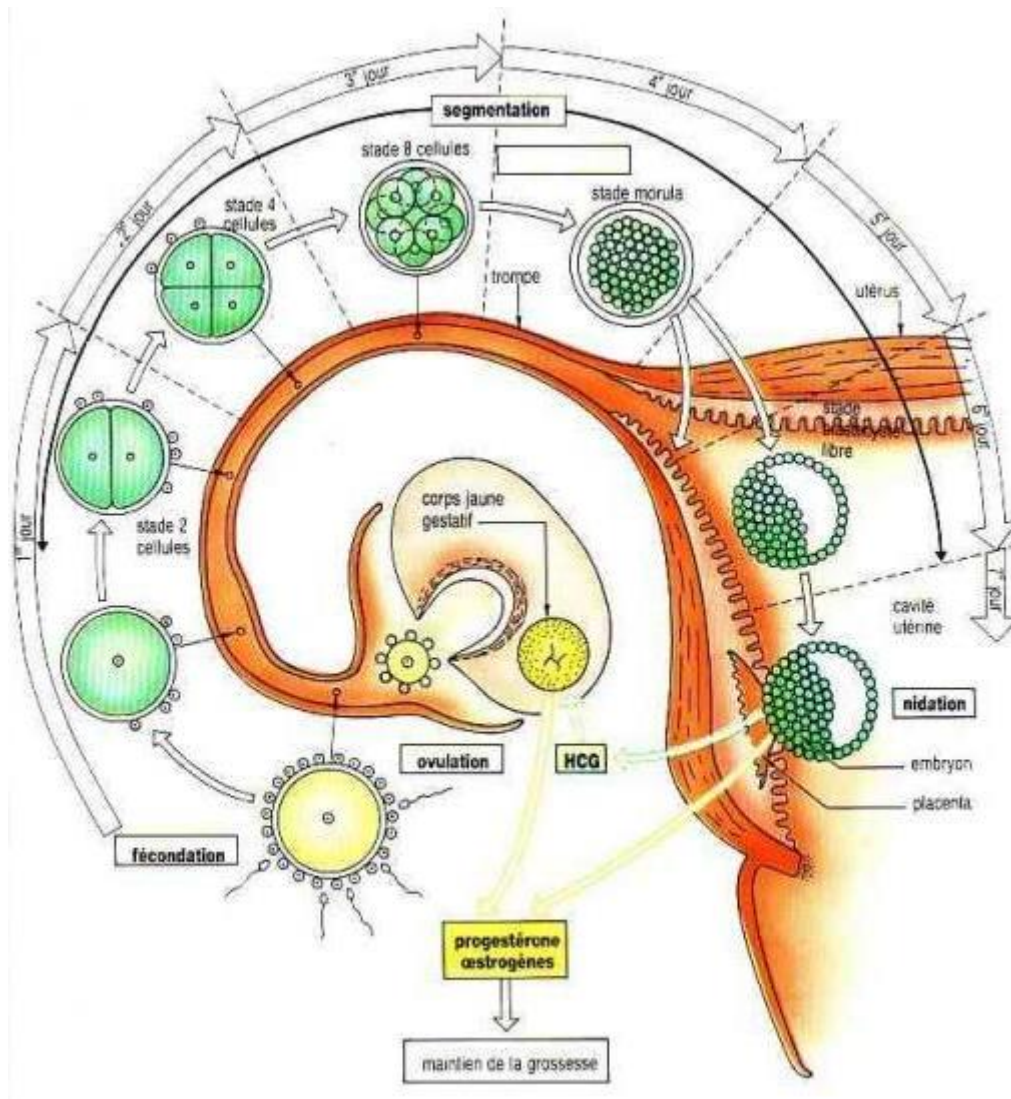
La deuxième division permet d'atteindre le stade 4 cellules après une brève étape transitoire à 3 cellules. Le stade 8 cellules est atteint à l'issue de la troisième division. Alors que l'embryon est constitué d'environ 16 cellules grâce à ses divisions successives, il va former une morula, c'est-à-dire un amas de cellules sphériques qui vont se compacter entre elles. Malgré le nombre croissant de cellules, l'embryon possède toujours la même taille car il reste délimité par sa zone pellucide.

Lorsque le blastocèle (cavité liquidienne) se creuse en son sein, l'embryon devient un blastocyste. A ce stade, il est formé de deux types de cellules : les cellules périphériques du trophoctoderme qui donneront les annexes de l'embryon (placenta) et les cellules de la masse cellulaire interne qui donneront l'embryon lui-même. Petit à petit, la cavité s'agrandit tandis que la zone pellucide s'affine pour finalement se rompre : c'est l'éclosion du blastocyste qui a lieu à J5 ou J6. Il est alors prêt pour la nidation dans l'endomètre.

Ces étapes sont schématisées dans la **figure 5** ci-dessous :

Figure 5 : schéma de la fécondation et du développement embryonnaire *in vivo*

(tirée de <http://infirmi.e-monsite.com/pages/biologie-1/schema-fecondation.html> consulté le 13/01/2022 (12))



3.2. La fécondation *in vitro*

La FIV consiste à reproduire au laboratoire ce qui se passe naturellement dans les voies génitales féminines : la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire.

Elle a lieu après une stimulation ovarienne de la femme, induisant la croissance de plusieurs follicules sous contrôle échographique et hormonal. Une fois un nombre suffisant de follicules mûrs atteint, le déclenchement assure la maturation finale des ovocytes. 36h plus tard, la ponction ovarienne permet de prélever les complexes cumulo-ovocytaires contenus dans les follicules. Ce prélèvement est rapidement acheminé au laboratoire afin d'extraire les complexes cumulo-ovocytaires du liquide folliculaire et de les placer dans un milieu adapté en attendant d'être mis en contact avec les spermatozoïdes.

Le recueil du sperme se fait le jour de la ponction. Pour reproduire le phénomène de maturation fonctionnelle qui se déroule naturellement dans le tractus féminin, le prélèvement doit subir une préparation. Deux techniques sont principalement utilisées : celle du gradient de densité et celle du swim-up.

Le gradient de densité consiste à faire migrer les spermatozoïdes à travers deux solutions de micro-billes de silice de concentrations croissantes au cours d'une centrifugation. Il a pour but d'éliminer les débris cellulaires ou acellulaires, les micro-organismes, les spermatozoïdes immobiles ainsi que les agglutinats contenus dans le sperme. Les spermatozoïdes normaux se concentrent dans le culot. Ils sont ensuite lavés et remis en suspension.

Le swim-up consiste quant à lui en une migration ascendante dans un milieu de culture capacitant. Après un temps d'incubation à 37°C, les spermatozoïdes les plus mobiles se trouvent à la surface du milieu tandis que les spermatozoïdes pas ou peu mobiles et tous les autres éléments contenus dans le sperme demeurent au fond du tube.

Ces techniques permettent donc la sélection, la concentration et la capacitation des spermatozoïdes en les séparant du plasma séminal. Ils sont alors capables de féconder un ovocyte.

Les **figures 6 et 7** permettent de schématiser ces deux techniques.

Figure 6 : schéma d'un gradient de densité

(tirée de Malvezzi, 2014 (13))

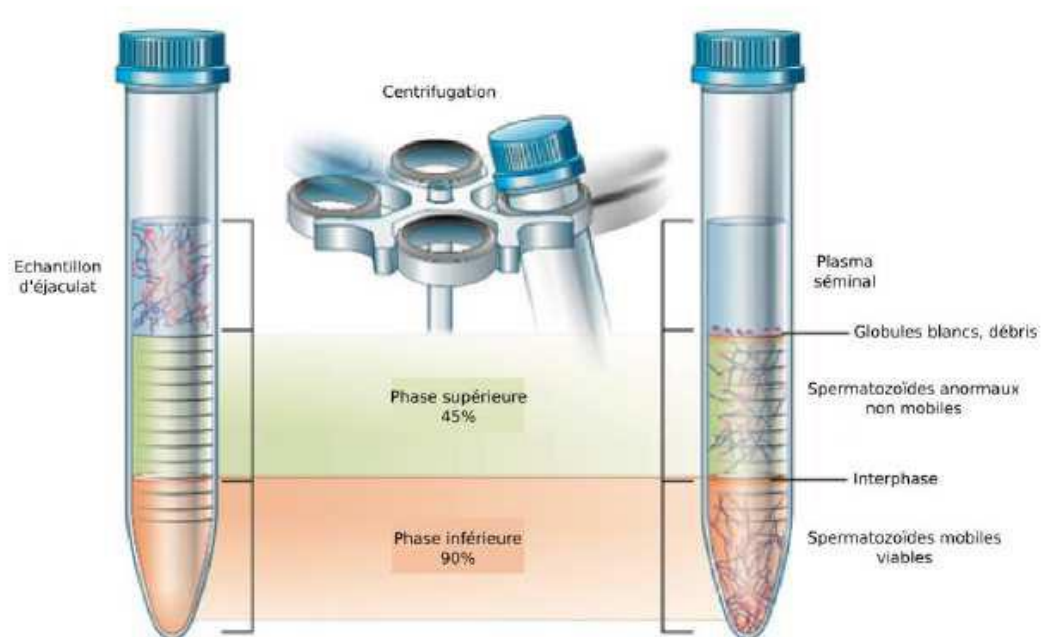
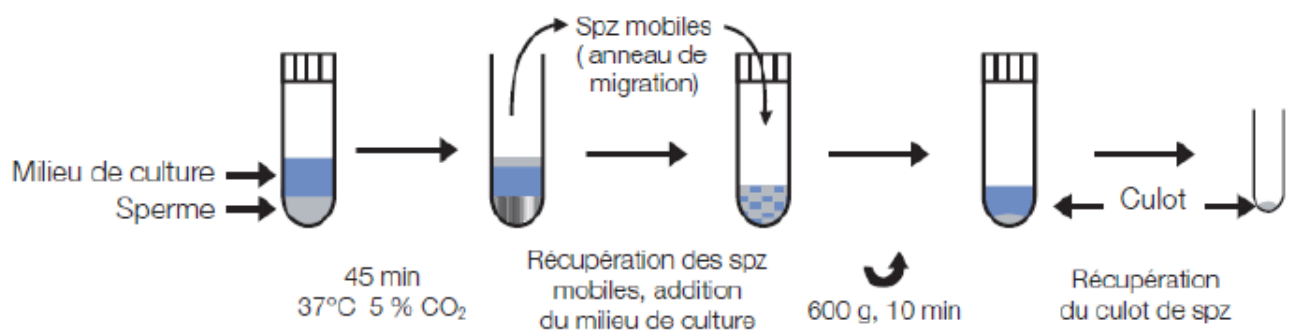


Figure 7 : schéma d'une technique de swim-up

(d'après le cours du Dr C. Frapsauce, CHRU Tours)



La FIVc à proprement parler consiste à mettre en contact les complexes cumulo-ovocytaires directement avec un nombre défini de spermatozoïdes préparés. Elle se distingue de la technique d'ICSI par le fait que les spermatozoïdes traversent d'eux-mêmes les cellules du cumulus oophorus et la zone pellucide. Elle se fait dans une boîte remplie de milieu adéquat, qui est ensuite placée dans un incubateur à température et atmosphère contrôlées.

Le lendemain, il faut réaliser une étape de décoronisation, c'est-à-dire débarrasser mécaniquement l'ovocyte des cellules de la corona radiata qui l'entourent. Cette étape permet d'abord de visualiser si l'ovocyte est mature (expulsion du premier GP) et s'il a été correctement fécondé (expulsion du deuxième GP et visualisation des deux PN).

La culture des embryons se poursuit ensuite jusqu'à J2-J3 ou J5-J6 selon les centres d'AMP. En effet, le stade de transfert n'étant pas consensuel, chaque centre adopte une stratégie de transfert qui lui est propre.

Afin de sélectionner les embryons ayant le plus de probabilité de s'implanter et donc d'aboutir à une naissance, des scores permettant d'apprécier la qualité embryonnaire ont été établis. Ils reposent sur des critères morpho-cinétiques. Cette évaluation peut se faire ponctuellement au microscope ou en time-lapse qui consiste à suivre la morphologie embryonnaire en semi-continu grâce à une caméra intégrée dans l'incubateur.

L'évaluation à J2-J3 repose sur le nombre et l'homogénéité de taille des blastomères, la présence de fragments cytoplasmiques, et la présence de blastomères multinucléés (14). En terme de cinétique optimale, l'embryon doit avoir 2 cellules à la 25^{ème} heure (clivage précoce), 4 cellules à J2 et 8 cellules à J3. Les cellules doivent être de taille similaire pour que l'embryon soit typique, dans le cas contraire il est qualifié d'atypique. Les fragments cytoplasmiques ne doivent pas excéder 10 % du volume de l'embryon. Enfin, les blastomères ne doivent posséder qu'un seul noyau, les blastomères multinucléés étant associés à des anomalies chromosomiques (14).

Dans le but d'améliorer le taux d'implantation, on peut envisager de prolonger la culture *in vitro* des embryons jusqu'au stade de blastocyste. Cela permettra d'identifier et d'éliminer les embryons dont la segmentation s'arrête après quelques divisions.

L'évaluation des blastocystes à J5-J6 est réalisée selon la classification de Gardner et Schoolcraft de 1999 (15). Elle prend en compte le degré d'expansion (allant de B1 à B6) et la cinétique de formation du blastocyste, ce stade doit être atteint à J5 pour avoir un meilleur taux d'implantation. A partir du stade B3, la masse cellulaire interne et le trophoctoderme peuvent être gradés de A à C, la lettre A étant associée à une meilleure qualité embryonnaire. La signification des différents grades est précisée dans le **tableau II** ci-dessous.

Tableau II : grades de la classification de Gardner et Schoolcraft (15)

Stade d'expansion du blastocyste			
B1	Blastocèle < 50 % du volume embryonnaire	B4	Blastocyste expansé
B2	Blastocèle ≥ 50 % du volume embryonnaire	B5	Blastocyste en cours d'éclosion
B3	Blastocyste en cours d'expansion	B6	Blastocyste éclos
Masse cellulaire interne		Trophectoderme	
A	Nombreuses cellules regroupées	A	Epithélium cohésif sur 100 % de la surface
B	Quelques cellules regroupées	B	Epithélium cohésif sur ≥ 50 % de la surface
C	Pas ou peu de cellules	C	Epithélium cohésif sur < 50 % de la surface

Le ou les embryons sélectionnés pour le transfert sont montés dans un cathéter puis placés dans la cavité utérine.

Les embryons surnuméraires de bonne qualité sont vitrifiés afin d'être transférés lors d'un prochain cycle. Ceux ayant arrêté leurs divisions sont éliminés.

Le test grossesse par β hCG (*Hormone chorionic gonadotrophine*) plasmatique est réalisé 7 à 10 jours après le transfert, puis contrôlé deux fois et confirmé par échographie.

L'ensemble de ces étapes est résumé dans la **figure 8** ci-dessous :

Figure 8 : schéma résumé des différentes étapes de la FIVc

(tirée de <https://pma-clermont-ferrand.fr/fiv-fecondation-in-vitro-deroulement-clermont-ferrand-prix-definition/> consulté le 10/01/2022 (16))



4. Contexte et objectifs de la thèse

4.1. Historique de l'évaluation de la morphologie et de l'établissement de normes

Chez l'Homme, la morphologie des spermatozoïdes résulte d'un processus complexe de spermatogénèse. Durant environ 3 mois, les spermatogonies puis les spermatocytes et les spermatides subissent de nombreux remaniements structuraux puis une maturation épидидymaire post-testiculaire, aboutissant ainsi à des spermatozoïdes matures de formes relativement hétérogènes. Cette hétérogénéité rend l'évaluation de la morphologie spermatique difficile.

Dès 1951, MacLeod et Gold (17) comparent la morphologie des spermatozoïdes d'hommes infertiles avec ceux d'hommes fertiles décrivant des anomalies qui doivent être présentes chez moins de 20 % des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes normaux sont ceux qui ne présentent pas d'anomalie : ils sont qualifiés ainsi par défaut.

C'est sur cette classification et avec la contribution des travaux d'Eliasson (18) que sont basées les deux premières éditions de recommandations de l'OMS publiées respectivement en 1980 et en 1987. Aucune description du spermatozoïde normal n'y est mentionnée. La proportion de formes normales des hommes fertiles se situe entre 48 et 98 % dans la première édition, tandis que le seuil de référence est placé à 50 % dans la deuxième. Cependant, la pertinence clinique de cette manière de classer les spermatozoïdes est remise en question par Page et Holding en 1951 (19).

Une deuxième méthode pour identifier les spermatozoïdes de forme normale consiste à examiner ceux présents dans la glaire endo-cervicale post-coïtale, notamment dans la partie la plus haute du canal, par rapport à ceux du sperme brut. En effet, il s'opère une première sélection des spermatozoïdes dans la glaire cervicale constituée de glycoprotéines fibrillaires et d'eau. Seuls les spermatozoïdes les plus mobiles parviennent à la traverser. Ce sont eux qui sont considérés comme fonctionnels et capables d'atteindre le complexe cumulo-ovocytaire.

Cette approche a été développée par Van Zyl en 1976 (7) puis corroborée par Mortimer en 1982 (20). C'est également l'approche utilisée pour l'élaboration des critères stricts afin de relier la morphologie spermatique classée en 7 catégories et le taux de fécondation (8). Elle est complétée par Liu et Baker qui mettent en œuvre une technique complémentaire : l'examen des spermatozoïdes liés à la zone pellucide. Ils montrent que le taux de liaison des spermatozoïdes de forme normale est corrélé au taux de fécondation *in vitro* (21). Ceci s'explique par le fait que la zone pellucide constitue une barrière sélective, par exemple en éliminant les spermatozoïdes incapables d'effectuer la réaction acrosomique.

Ce n'est qu'à partir de sa 3^{ème} édition publiée en 1992 que l'OMS recommande les critères stricts associés à la définition claire d'un spermatozoïde normal. Le seuil est fixé à 30 %. Cette édition inclut le MAI (*Multiple abnormalities index*) décrit par Jouannet en 1988 (22) qui est finalement remplacé par le TZI en 1997. Ce dernier est présenté comme le reflet de la fertilité *in vivo* (9).

Il faut attendre la 4^{ème} édition de 1999 (23) pour que l'OMS adopte complètement les critères de Kruger et que le seuil de 14 % initialement proposé par Krüger soit notifié, sans être pour autant recommandé.

Puis la 5^{ème} édition de 2010 (24) fournit pour la première fois une valeur seuil de référence minimale à 4 % correspondant au 5^{ème} percentile de l'étude de Cooper (25).

Enfin, la 6^{ème} édition OMS 2021 actuellement en vigueur reprend les critères et les valeurs dictées dans la précédente édition. Elle précise que les spermatozoïdes anormaux sont associés à un pouvoir fécondant diminué selon le type d'anomalie, et qu'ils peuvent avoir une altération de l'ADN qu'ils véhiculent (fragmentation, chromatine immature, aneuploïdie, aberration chromosomique).

En dehors des recommandations de l'OMS, d'autres classifications co-existent mais elles sont utilisées seulement dans certains pays. C'est le cas notamment de la classification de David modifiée par Jouannet (22) qui a introduit le MAI. Elle est principalement utilisée en France. Cependant, sa capacité à prédire le taux de fécondation en FIV est controversée (26).

4.2. Contexte actuel

En-dehors de quelques rares anomalies monomorphes dont le lien avec l'infertilité a été prouvé et associé à une anomalie génétique (par exemple en cas de globozoospermie totale ou lors du syndrome de Kartagener (27)), la vaste majorité des anomalies de morphologie spermatique est polymorphe, et leur signification n'est pas clairement établie.

In vivo, la morphologie est présentée par certains auteurs comme le paramètre le plus discriminant entre une population d'hommes fertiles et infertiles (28,29) et est incluse dans les algorithmes de prédiction de la fertilité *in vivo*. D'autres auteurs au contraire ne trouvent pas de corrélation entre la morphologie et le taux de grossesse spontanée (30) et montrent que des hommes ayant une absence totale de formes normales dans le sperme ont tout de même de forts taux de grossesse spontanée (31).

Cette controverse soulève la question de la valeur clinique de la morphologie et de sa capacité à établir un diagnostic d'infertilité masculine, notamment en cas de tératozoospermie isolée : constitue-t-elle un critère de prise en charge en AMP à elle seule ?

Une fois la prise en charge en AMP initiée, l'impact de la morphologie sur le type de technique à adopter ainsi que sur les résultats de cette dernière sont également sujet à

discussion. Ceci peut être imputable au caractère subjectif et variable de l'évaluation de la morphologie (32) et à son manque de standardisation (11) qui a amené certains auteurs à proposer que chaque laboratoire définisse ses propres normes (33). Il n'existe donc pas de recommandation de la part de l'OMS pour privilégier une technique par rapport à une autre en fonction des résultats de l'analyse morphologique.

Dans le cas de la FIVc, le potentiel de ce paramètre en tant que marqueur pronostic indépendant de la numération et de la mobilité ne fait pas l'unanimité.

L'objectif de notre travail est de déterminer dans quelle mesure la morphologie des spermatozoïdes influence les résultats de fécondation en FIV classique au CHRU de Tours.

Pour atteindre notre ***objectif principal***, nous avons mesuré le taux de fécondation ainsi que la fréquence de survenue d'échec de fécondation et de pauci-fécondation. Nous avons également recherché un seuil optimal du nombre de spermatozoïdes normaux qui permettrait de prédire l'issue de la fécondation, et déterminé les performances analytiques associées à un tel seuil.

Secondairement, nous nous sommes intéressés à des marqueurs de qualité embryonnaire à J2 et au devenir des embryons transférés via le taux de grossesse et le taux de naissance.

II. Matériel et méthodes

1. Population d'étude

Ce travail consiste en une étude rétrospective portant sur **582 couples de patients**. Il inclut les couples ayant bénéficié d'une **FIV classique de rang un avec sperme frais du conjoint entre 2017 et 2020** au **CHRU de Tours**. Les indications de la tentative de FIVc sont : l'imperméabilité tubaire, les troubles de l'ovulation, l'endométriose, l'infertilité masculine modérée, l'infertilité d'origine mixte et l'infertilité idiopathique.

Critères d'inclusion

Seuls les couples ayant un spermogramme complet et un spermocytogramme évalué selon les critères stricts de Krüger avant la tentative ont été inclus, pour que les valeurs soient obtenues avec la même classification. Lorsque plusieurs spermocytogrammes étaient disponibles, uniquement celui précédant immédiatement la tentative a été pris en compte dans l'étude.

Critères d'exclusion

Les ponctions ne retrouvant pas d'ovocyte ou pas d'ovocyte mature n'ont pas été retenues car le taux de fécondation tel que défini dans notre étude est alors incalculable.

Les FIVc de rang supérieur ou égal à deux ont été exclues afin qu'aucune indication sur une fécondation antérieure ne soit disponible, et que chaque couple ne soit représenté qu'une seule fois.

Les autres techniques d'AMP (IIU et ICSI) ne sont pas concernées.

2. Préparation et analyse du sperme

Les prélèvements de sperme sont recueillis par masturbation après une abstinence de 2 à 7 jours.

Leur analyse est conduite selon les recommandations de la 5^{ème} édition de l'OMS, version alors en vigueur au moment de l'étude (24).

Après complète liquéfaction, le volume, la viscosité, le pH du prélèvement, ainsi que la concentration, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes sont déterminés dans l'heure suivant l'émission. Ceci permet d'identifier l'hypovolémie (volume $\leq 1.5\text{mL}$), l'oligozoospermie (concentration en spermatozoïdes < 39 millions par éjaculat), l'asthénozoospermie (mobilité progressive a+b $< 32\%$) et la nécrozoospermie (vitalité $< 58\%$).

Après coloration de Harris Shorr, l'analyse morphologique est réalisée au microscope à l'objectif à immersion (x1000) sur 200 spermatozoïdes consécutifs, par deux évaluateurs différents, selon les critères stricts décrits par Krüger. La définition du spermatozoïde normal est appliquée pour déterminer le pourcentage de formes dites typiques. Tout spermatozoïde de forme limite est considéré comme anormal. Les anomalies de chaque partie du spermatozoïde (tête, pièce intermédiaire et flagelle) sont rapportées afin de calculer le TZI (teratozoospermia index). La tératozoospermie se définit par une valeur de formes typiques < 4 %.

La numération des polynucléaires neutrophiles dans le sperme permet de mettre en évidence une éventuelle leucospermie en cas de valeur supérieure ou égale à 1 million/mL.

3. Déroulement de la tentative de FIV classique

3.1. Stimulation ovarienne

Le protocole de stimulation ovarienne commence par une première phase de blocage de l'axe hypothalamo-hypophysaire, soit grâce à un agoniste, soit grâce à un antagoniste de la GnRH (*Gonadotrophine releasing hormone*). Une fois la mise au repos des ovaires atteinte, la deuxième phase de stimulation à proprement parler est obtenue grâce à la FSH (*Follicle stimulating hormone*). Les effets du traitement sont suivis par des échographies régulières des ovaires et par des dosages hormonaux, notamment de l'œstradiol, de la LH (*Luteinizing hormone*) et de la progestérone. En fonction des résultats, le déclenchement de l'ovulation par β hCG est programmé.

3.2. Ponction ovarienne

Le recueil ovocytaire a lieu environ 36h après le déclenchement de l'ovulation, par voie trans-vaginale échoguidée au bloc opératoire. Les tubes de ponction sont acheminés rapidement au laboratoire de FIV afin d'isoler et de laver les complexes cumulo-ovocytaires du liquide folliculaire (ORIGIO® Flushing Medium). Ils sont ensuite incubés en puits de 0,8mL à 37°C sous 6 % de CO₂ et 5 % d'O₂ en attendant la mise en contact avec les spermatozoïdes.

3.3. Préparation du sperme

La sélection des spermatozoïdes pour l'insémination des ovocytes est effectuée par un gradient de densité (ORIGIO® Gradient™ 40/80), avec une étape de centrifugation puis de lavage du culot. La concentration et la mobilité sont également évaluées après gradient, à la différence de la morphologie dont l'évaluation n'est pas réitérée le jour de la tentative.

3.4. Mise en fécondation et évaluation de la fécondation

Les ovocytes sont inséminés avec environ 80 000 spermatozoïdes mobiles progressifs par puits, en milieu ORIGIO® Sequential Fert™. Le temps de contact entre les complexes cumulo-ovocytaires et les spermatozoïdes est d'environ 2h. A l'issue de cette durée, les ovocytes sont placés dans des puits de milieu (ORIGIO® Sequential Fert™) ne contenant pas de spermatozoïdes.

Le lendemain, à J1, les ovocytes sont décoronisés manuellement puis placés individuellement dans des micro-gouttes de 25 µL de milieu de culture unique (ORIGIO® SAGE 1-Step™) sous huile minérale. 18 à 20h après l'insémination, la fécondation est évaluée en parallèle des caractéristiques morphologiques des zygotes : nombre et taille des pronuclei, nombre des globules polaires (GP).

Les ovocytes matures sur le plan nucléaire, sont identifiés par l'expulsion du premier GP sans signe de fécondation ou par des signes de fécondation.

Les ovocytes fécondés sont caractérisés par l'expulsion du deuxième globule polaire signant la fin de la méiose, l'apparition du pronucleus (PN) femelle et du pronucleus mâle (correspondant au matériel génétique apporté par le spermatozoïde). Lorsque plus de deux pronuclei sont visibles, la fécondation est considérée comme anormale car due probablement à une polyspermie si présence de 2 GP.

La mise en évidence de ces 2 GP et de ces 2 PN permet de définir le taux de fécondation normale. Selon l'ESHRE (34), il s'agit du nombre d'ovocytes présentant 2 GP et 2 PN rapporté au **nombre total de COC inséminés**, quel que soit leur statut de maturation nucléaire. **Dans notre étude**, nous avons choisi une définition différente de l'ESHRE en rapportant le taux de fécondation au **nombre d'ovocytes matures et non au nombre total de COC inséminés**. En effet, la présence d'ovocytes immatures parmi les COC inséminés risquerait d'entraîner une sous-estimation du pouvoir fécondant du sperme en diminuant le taux de fécondation, alors que les ovocytes immatures ne sont en réalité pas fécondables. Ainsi, dans notre étude, les différents taux de fécondation peuvent être définis comme suit :

- **Taux de fécondation totale** : $\frac{2PN + 3PN}{MII}$
- **Taux de fécondation normale** : $\frac{2PN}{MII}$
- **Taux de polyspermie** : $\frac{3PN}{2PN + 3PN}$

Par ailleurs, les recommandations de l'ESHRE spécifient qu'on interprète comme un **échec de fécondation** la situation où aucun ovocyte inséminé ne présente de signe de fécondation. Le taux d'échec de fécondation est alors la proportion des cycles présentant un échec de fécondation.

De plus, l'ESHRE définit le **taux de pauci-fécondation** comme la proportion de cycles dans lesquels < 25 % des ovocytes inséminés (matures ou non) présentent des signes de fécondation.

Dans notre étude, nous avons appliqué la **même définition du taux d'échec de fécondation** que l'ESHRE. Cependant, nous avons modifié la définition du taux de pauci-fécondation pour qu'il n'inclue pas les échecs de fécondation. Ainsi, le **taux de pauci-fécondation représente la proportion des cycles pour lesquels le taux de fécondation normale est strictement inférieur à 25 % mais strictement supérieur à 0 %**. Les échecs de fécondation sont comptabilisés à part du taux de pauci-fécondation.

3.5. Culture et évaluation de la qualité embryonnaire

Les embryons ont été cultivés à 37°C avec 6 % de CO₂, 5 % d'O₂ et 89 % de N₂ (milieu ORIGIO® SAGE 1-Step™).

44 à 46h après insémination (J2), la qualité embryonnaire est évaluée au microscope par deux observateurs sur la base du nombre et de la taille des blastomères, du taux de fragmentation, et de la présence de blastomères multi-nucléés.

A J2, un embryon est considéré comme « top qualité » lorsqu'il présente 4 blastomères de taille et de forme régulières, un taux de fragmentation inférieur à 10 %, et aucun blastomère multi-nucléé.

Un embryon est considéré comme « fragmenté » à J2 lorsqu'il présente des fragments cytoplasmiques anucléés occupant plus de 50 % de l'espace embryonnaire.

Au CHRU de Tours, la majorité des cycles sont associés à une culture prolongée jusqu'au stade blastocyste à J5 ou J6. L'évaluation morphologique des blastocystes repose sur l'expansion du blastocèle (score de B1 à B6 du moins au plus expansé). A partir du stade B3, l'organisation des cellules constituant la masse cellulaire interne (aussi appelée bouton embryonnaire), ainsi que celles composant le trophoctoderme sont évaluées selon un score allant de A à C.

A J5, un blastocyste est considéré comme « top qualité » s'il atteint a minima le stade B3 avec un score de masse cellulaire interne et de trophoctoderme A ou B.

3.6. Transfert et suivi post-transfert

A l'issue de la culture embryonnaire, un ou plus rarement deux embryons sont transférés à J2, J5 ou J6 à l'aide d'un cathéter sous échographie. La phase lutéale est ensuite soutenue par apport de progestérone micronisée administrée par voie vaginale.

La concentration sérique en β hCG est dosée 10 jours après le transfert d'un embryon J2 ou 7 jours après le transfert d'un blastocyste. La présence d'un sac gestationnel avec détection d'une activité cardiaque fœtale par ultrasons à 5 semaines de la ponction permet d'identifier une grossesse clinique.

Enfin, l'issue de la grossesse est recherchée afin de comptabiliser le nombre de naissances vivantes.

Ces étapes permettent de calculer les indicateurs suivants :

- Taux de grossesses cliniques par transfert :
$$\frac{\text{Nombre de grossesses cliniques}}{\text{Nombre de transferts}}$$
- Taux d'implantation :
$$\frac{\text{Nombre de sacs gestationnels}}{\text{Nombre d'embryons transférés}}$$
- Taux de naissances vivantes par transfert :
$$\frac{\text{Nombre de naissances vivantes}}{\text{Nombre de transferts}}$$
- Taux de naissances multiples :
$$\frac{\text{Nombre de naissances multiples}}{\text{Nombre total de naissances}}$$
- Taux de fausses couches :
$$\frac{\text{Nombre de fausses couches}}{\text{Nombre de grossesses cliniques}}$$

4. Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, JK, USA). Le seuil de significativité est fixé à 5 % (p-value < 0,05).

Tests statistiques réalisés :

- le t-test de Student a permis de comparer deux groupes pour les variables quantitatives
- l'analyse de variance (ANOVA) a permis la comparaison de plusieurs groupes entre eux pour les variables quantitatives
- le test du Khi-deux a permis de comparer la distribution des variables nominales entre différents groupes
- la régression linéaire simple a permis d'évaluer la corrélation entre le pourcentage de formes typiques et le taux de fécondation

- la courbe ROC a permis de définir un seuil de pourcentage de formes typiques optimal pour prédire le taux de fécondation et les performances analytiques de prédiction d'un tel seuil

III. Résultats

1. Caractéristiques générales de la population étudiée

1.1. Population féminine

Les principaux paramètres épidémiologiques décrivant la population féminine de notre étude sont détaillés dans le **tableau III** ci-dessous :

Tableau III : description de la population des femmes de l'étude

Paramètre	Valeur \pm SD (range)
Effectif (n)	582
Age (années)	33,3 \pm 4,5 (21-43)
IMC (en Kg/m ²)	Non disponible dans le fichier analysé
AMH (en ng/mL)	3,34 \pm 3,46 (0,16-30,0)
Patientes avec AMH > 1,1 ng/mL*	79 %
CFA	21 \pm 14 (1-100)
Patientes avec CFA > 7*	88 %
Trompes normales	61,5 %
Endométriose	17 %
Ovulation normale	31 %

*Test de réserve ovarienne anormal selon les critères de Bologne de 2011 (35) : CFA < 5-7 follicules ou AMH < 0,5-1,1 ng/mL

La moyenne d'âge des femmes de notre population se situe aux alentours de 33 ans. Ces dernières possèdent en majorité une réserve ovarienne « satisfaisante » selon les critères de Bologne de 2011 (79 % selon l'AMH et 88 % selon le CFA).

La majorité d'entre elles ont des trompes normales.

Une endométriose est retrouvée chez 17 % d'entre elles.

L'ovulation est évaluée normale dans 31 % des cas.

1.2. Population masculine

1.2.1. Paramètres épidémiologiques

Les principaux paramètres épidémiologiques décrivant la population masculine de notre étude sont détaillés dans le **tableau IV** ci-dessous :

Tableau IV : description de la population masculine de l'étude

Paramètre	Valeur \pm SD (range)
Effectif (n)	582
Age (en années)	35,1 \pm 5,8 (21-60)
IMC (en Kg/m ²)	25,6 \pm 4,0 (16.4-46.4)
Fumeurs actifs	34 %
Nombre moyen de cigarettes par jour	12 \pm 7 (1-30)
Caryotype normal	99 % (119/120)
Cryptorchidie	1,7 %
Varicocèle	2,7 %

La moyenne d'âge des hommes de notre population se situe à 35 ans environ. En moyenne, leur IMC est au-dessus des valeurs normales (18,5-24,9 kg/m²). Le tiers des patients présente un tabagisme actif. La presque totalité des hommes inclus dans cette étude présente un caryotype normal, à l'exception d'un unique patient possédant un petit fragment chromosomique supplémentaire sans incidence (MAR[5]/46XY[45]). Par ailleurs, il est rapporté pour un très faible nombre d'entre eux (< 3 %) une cryptorchidie ou une varicocèle.

1.2.2. Derniers spermogramme et spermocytogramme préalables à la tentative de FIV classique

Les résultats des derniers spermogramme et spermocytogramme, préalables à la tentative de FIVc sont regroupés dans le **tableau V** suivant :

Tableau V : description des résultats des derniers spermogramme et spermocytogramme précédant la tentative de FIV

Paramètre	Valeur \pm SD (range)
Effectif (n)	582
SPERMOGRAMME	
Délai d'abstinence (jours)	4,1 \pm 2,0 (0-21)
Prélèvements avec délai entre 2 et 7 jours	91 %
Volume (mL)	3,8 \pm 1,6 (0,4-10,8)
Prélèvements avec volume \geq 1,5 mL	97 %
Concentration (en millions/mL)	60,6 \pm 50,3 (1,3-326)
Concentration (en millions/éjaculat)	214,9 \pm 182,2 (9,0-1018,8)
Prélèvements avec concentration \geq 39 millions/éjaculat	86 %
Mobilité (a+b)	35 \pm 10 % (5-69)
Prélèvements avec mobilité \geq 32 %	58 %
Vitalité	75 \pm 11 % (28-96)
Prélèvements avec vitalité \geq 58 %	92 %
Leucospermie	7 %
SPERMOCYTOGRAMME	
Formes typiques	3,8 \pm 3,3 % (0-18)
TZI	1,39 \pm 0,16 (1,04-1,97)

Les recommandations concernant le délai d'abstinence sont en majorité respectées. Le volume de sperme est globalement normal, tout comme la vitalité (> 90 % des prélèvements).

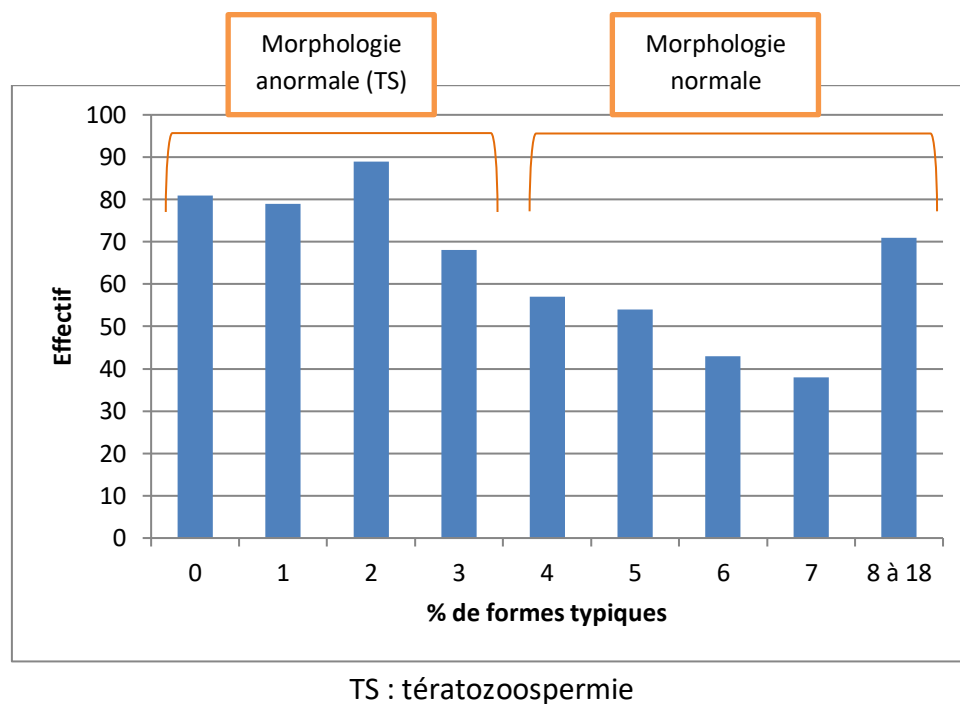
La proportion de patients présentant une leucospermie s'élève à 7 %.

Sans surprise, nous observons une grande disparité des valeurs de numération, mobilité, et formes typiques des spermatozoïdes.

La moyenne des formes typiques se situe légèrement en-dessous du seuil de 4 % considéré comme normal selon l'OMS. L'analyse morphologique des spermatozoïdes a fait l'objet d'une évaluation plus détaillée ci-dessous.

La **figure 9** permet de visualiser la distribution du pourcentage de formes typiques pour chaque couple de patients inclus dans l'étude :

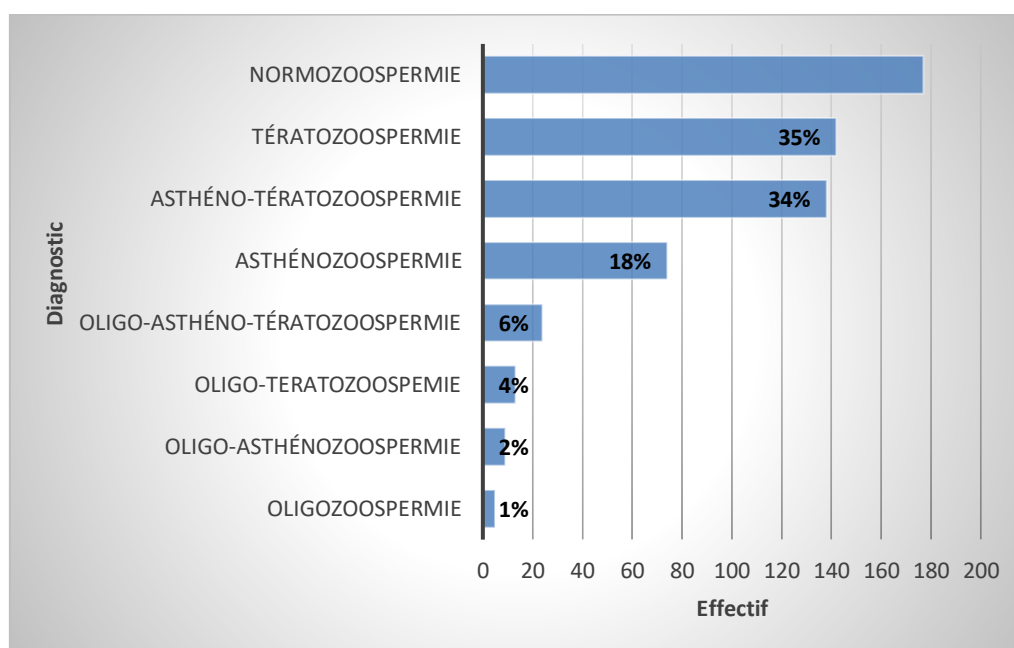
Figure 9 : histogramme de distribution du pourcentage de formes typiques



Plus de la moitié des prélèvements analysés (374/582 soit 64 %) présentent une térazozoospermie (FT < 4 %), isolée ou associée à d'autres anomalies du spermogramme.

La répartition des différentes anomalies identifiées au cours du spermogramme et du spermocytogramme diagnostiques précédant la tentative de FIVc est présentée dans la **figure 10** ci-dessous :

Figure 10 : histogramme de distribution de la synthèse des anomalies des derniers spermogramme et spermocytogramme diagnostiques précédant la tentative de FIVc



30 % des hommes de notre étude ont un spermogramme et un spermocytogramme normaux.

Lorsqu'une anomalie est rencontrée, il s'agit le plus fréquemment d'une tératozoospermie isolée (dans 35 % des cas) tandis que l'oligozoospermie isolée est l'anomalie la moins fréquemment diagnostiquée (dans 1 % des cas).

2. Place de la morphologie des spermatozoïdes

2.1. Caractéristiques biologiques générales des tentatives de FIVc

Les aspects biologiques des tentatives de FIVc sont détaillés dans le **tableau VI** ci-dessous :

Tableau VI : description des aspects biologiques des tentatives de FIV

Paramètre	Valeur \pm SD
Effectif (n)	582
Nombre d'ovocytes totaux	6002
Moyenne par ponction	$10,3 \pm 5,9$
Range	(1-40)
Nombre d'ovocytes matures (MII)	4606
Moyenne par ponction	$7,9 \pm 4,6$
Range	(1-30)
Taux d'ovocytes matures	77 %
Taux de fécondation totale	65,3 %
Taux de fécondation normale	59,7 %
Taux de polyspermie	5,6 %
Taux de pauci-fécondation	4,5 %
Taux d'échec de fécondation	6,7 %
Taux de pauci-fécondation + échec de fécondation	11,2 %
Nombre d'embryons totaux (J2)	3433
Moyenne par ponction	$5,9 \pm 4,2$
Range	(0-24)
Nombre d'embryons « top qualité » (J2)	750
Moyenne par ponction	$1,3 \pm 1,7$
Range	(0-11)
Taux d'embryons « top qualité » (J2)	22 %
Nombre d'embryons fragmentés (J2)	1166
Moyenne par ponction	$2,0 \pm 2,6$
Range	(0-14)
Taux d'embryons fragmentés (J2)	34 %

Au cours de cette étude, 6002 ovocytes ont été recueillis, dont 4606 étaient matures sur le plan nucléaire, ce qui situe le taux de maturité à 77 %.

Au final, le taux de fécondation totale est de 65 %, avec 60 % de fécondation normale.

Parmi ces tentatives de FIVc, nous observons 6,7 % d'échec de fécondation et 4,5 % de pauci-fécondation.

Concernant la qualité embryonnaire à J2, 22 % des embryons sont de « top qualité » alors que 34 % présentent une fragmentation cytoplasmique.

2.2. Comparaison du groupe < 4 % avec le groupe ≥ 4 % de formes typiques

Afin d'étudier l'impact de la morphologie sur les différentes étapes de la FIVc, nous avons divisé notre population d'étude en deux groupes selon le pourcentage de FT retrouvé lors du dernier spermocytogramme précédant la tentative : TS (térazozoospermie) et contrôle. Le groupe TS inclut les patients ayant < 4 % de FT, c'est-à-dire les patients avec une morphologie des spermatozoïdes considérée comme anormale selon les recommandations de l'OMS. Le groupe contrôle inclut les patients ayant 4 % ou plus de FT, c'est-à-dire avec une morphologie normale.

2.2.1. Données épidémiologiques

Les paramètres épidémiologiques des patients des deux groupes sont détaillés dans le **tableau VII** ci-dessous :

Tableau VII : comparaison des paramètres épidémiologiques de la population d'étude entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Paramètre	Groupe TS (FT < 4 %)	Groupe contrôle (FT ≥ 4 %)	p-value
Effectif (n)	317	265	
HOMME			
Age (en années)	34,6 ± 5,6	35,8 ± 5,9	0,01
IMC (en Kg/m ²)	25,7 ± 4,1	25,5 ± 3,9	0,65
Fumeurs	30 %	38 %	0,06
Nombre moyen de cigarettes par jour	10,9 ± 6,9	13,0 ± 7,1	0,06
Cryptorchidie	1,6 %	1,9 %	0,08
Varicocèle	3,3 %	2,3 %	0,51
FEMME			
Age (en années)	33,0 ± 4,4	33,8 ± 4,6	0,03
Femmes âgées de ≥ 37 ans	24 %	31 %	0,06
AMH (en ng/mL)	3,24 ± 3,2	3,46 ± 3,7	0,45
CFA	21 ± 14	20 ± 14	0,38
Trompes normales	62 %	60 %	0,69
Ovulation normale	27 %	35 %	0,08
Endométriose	17 %	17 %	0,95

Parmi tous les paramètres épidémiologiques masculins étudiés ci-dessus, seul l'âge diffère significativement entre les deux groupes (p = 0,01), avec des patients légèrement plus jeunes dans le groupe TS.

De même que pour les paramètres épidémiologies masculins, les paramètres féminins des deux groupes ne diffèrent significativement que par l'âge avec des femmes plus jeunes dans le groupe TS ($p = 0,03$). Cependant, la différence des proportions de femmes âgées d'au moins 37 ans dans les deux groupes n'atteint pas le seuil de significativité ($p = 0,06$).

2.2.2. Paramètres spermatiques

Les résultats des spermogrammes des deux groupes sont rassemblés dans le **tableau VIII** suivant :

Tableau VIII : comparaison des résultats des spermogrammes et spermocytogramme entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Paramètre	Groupe TS (FT < 4 %)	Groupe contrôle (FT ≥ 4 %)	p-value
Effectif (n)	317	265	
SPERMOGRAMME			
Délai d'abstinence (jours)	4,0 ± 2,1	4,2 ± 1,9	0,47
Volume (mL)	3,9 ± 1,6	3,7 ± 1,6	0,13
Leucospermie (%)	6,3 %	7,2 %	0,67
Concentration (en millions/mL)	51,3 ± 45,6	71,9 ± 53,4	< 0,0001
Concentration totale (en millions/éjaculat)	186,5 ± 174,1	248,8 ± 186,2	< 0,0001
Mobilité a+b (%)	32,5 %	37,0 %	< 0,0001
Vitalité	74 %	76 %	0,0502
SPERMOCYTOGRAMME			
Taux de FT	1,5 ± 1,1	6,7 ± 2,7	
Tête	97,6 %	92,0	< 0,0001
Pièce intermédiaire	11,3 %	9,0 %	< 0,0001
Flagelle	9,5 %	7,0 %	< 0,0001
Reste cytoplasmique	5,2 %	3,2 %	< 0,0001
TZI	1,44 ± 0,2	1,33 ± 0,1	< 0,0001

Seules la concentration et la mobilité spermatique sont significativement différentes avec une concentration et une mobilité amoindries dans le groupe TS ($p < 0,0001$ pour les deux paramètres).

Sans surprise, les anomalies de toutes les parties du spermatozoïde ainsi que le TZI augmentent avec la tératozoospermie ($p < 0,0001$).

2.2.3. Données biologiques de la tentative de FIV classique

Les aspects biologiques des tentatives de FIVc des deux groupes sont détaillés dans le **tableau IX** ci-dessous :

Tableau IX : comparaison des aspects biologiques des tentatives de FIV entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

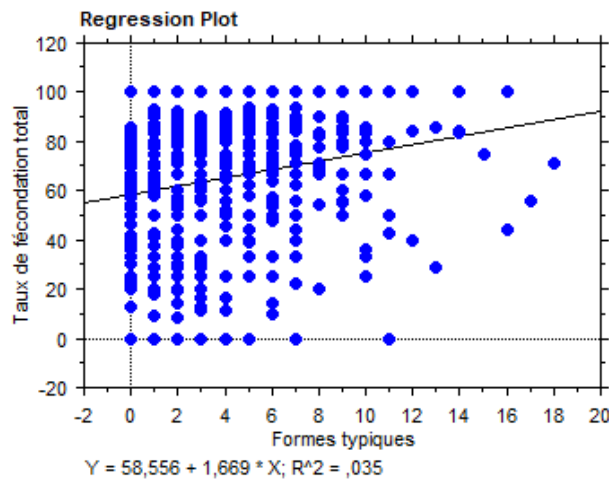
Paramètre	Groupe TS (FT < 4 %)	Groupe contrôle (FT ≥ 4 %)	p-value
Effectif (n)	317	265	
Nombre d'ovocytes totaux	10,3 ± 5,6	10,3 ± 6,0	0,97
Taux d'ovocytes matures (%)	77,2 ± 19,1	79,6 ± 17,6	0,12
Taux de fécondation totale (%)	60,0 ± 31,3	70,8 ± 25,5	< 0,0001
Taux de fécondation normale (%)	55,8 ± 30,0	64,1 ± 25,0	0,0004
Taux de polyspermie (%)	6,06 ± 13,5	8,72 ± 14,4	0,03
Taux de pauci-fécondation (%)	5,7	3,0	0,12
Taux d'échec de fécondation (%)	9,8	3,0	0,001
Nombre d'embryons totaux à J2	5,4 ± 3,9	6,5 ± 4,5	0,002

2.2.3.1. Taux de fécondation

Avec un nombre d'ovocytes totaux et un taux d'ovocytes matures équivalents dans les deux groupes, les **taux de fécondation totale et normale** sont significativement plus faibles dans le groupe TS ($p < 0,0001$ et $p = 0,0004$ respectivement). Cela s'accompagne également d'un taux de polyspermie significativement réduit ($p = 0,03$).

En effectuant une régression linéaire simple entre le taux de fécondation totale (variable expliquée) et le nombre de FT (variable explicative), une pente et une ordonnée à l'origine significativement différentes de l'hypothèse nulle ($p\text{-value} < 0,0001$) sont obtenues, avec un coefficient de détermination faible ($r^2 = 0,035$) mais significatif. La régression linéaire simple est présentée ci-dessous dans la **figure 11** :

Figure 11 : régression linéaire simple entre le taux de fécondation totale et le nombre de FT



Ce graphique représente la tendance à une meilleure fécondation totale lorsque le nombre de FT augmente. Cependant, la morphologie n'apparaît pas comme un facteur prédictif absolu de fécondation : un échec total de fécondation peut être observé avec ≥ 4 % de formes typiques et 100 % de fécondation peuvent être obtenus avec < 4 % de formes typiques.

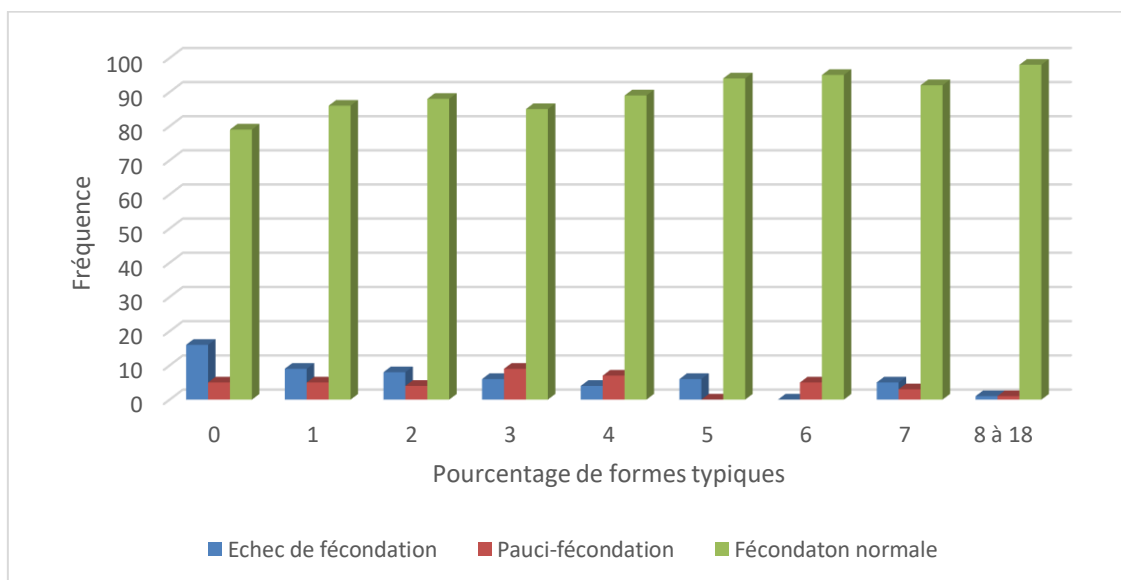
2.2.3.2. Echec et pauci-fécondation

Le **taux d'échec de fécondation** est plus important dans le groupe TS ($p = 0,001$), ce qui aboutit à un nombre réduit d'embryons totaux à J2 dans ce groupe de morphologie anormale ($p = 0,002$). En revanche, le **taux de pauci-fécondation** tend seulement à être plus important dans le groupe TS sans atteindre le seuil de significativité ($p = 0,12$).

Trois groupes correspondant aux 3 issues de fécondation possibles (échec de fécondation, pauci-fécondation et fécondation normale) ont ainsi été constitués.

Les proportions relatives des différentes issues de la mise en fécondation selon le nombre de FT sont présentées dans la **figure 12** ci-dessous :

Figure 12 : proportions relatives des issues de fécondation selon le nombre de FT



De 0 à 2 % de FT, la proportion d'échecs de fécondation est supérieure à celle des pauci-fécondations. La fréquence des échecs de fécondation diminue jusqu'à 2 % de FT puis se stabilise ensuite, avec une fréquence très faible au-delà de 8 % de FT.

La fréquence des pauci-fécondations est très variable en fonction du pourcentage de FT et ne montre pas de tendance à la hausse ou à la baisse en cas d'augmentation du pourcentage de FT.

Afin d'étudier le rôle éventuel du TZI dans la fécondation, le TZI moyen des différents groupes d'issues de fécondation est présenté dans le **tableau X** ci-dessous :

Tableau X : comparaison du TZI moyen des différents groupes d'issues de fécondation

Issue de fécondation	Echec de fécondation	Pauci-fécondation	Fécondation normale	p-value
TZI moyen	1,45 ± 0,15	1,38 ± 0,14	1,39 ± 0,16	0,5

Le TZI moyen est similaire entre les différents groupes de fécondation.

Le taux de fécondation moyen et la fréquence cumulée des échecs et des pauci-fécondations entre deux groupes de TZI ont été comparés dans le **tableau XI** ci-dessous, selon une valeur de TZI déterminée par une recherche de seuil de proche en proche.

Tableau XI : comparaison du taux de fécondation moyen de la fréquence cumulée des échecs et des pauci-fécondations entre deux groupes de TZI

TZI	< 1,27	≥ 1,27	p-value
Effectif (n)	132	449	
Taux de fécondation moyen	69,5	63,7	0,045
Fréquence d'échecs + paucifécondations	7,6 %	14 %	0,13

Le taux de fécondation moyen est plus faible dans le groupe ayant un TZI ≥ 1,27 (p = 0,045) alors que la fréquence cumulée des échecs et des pauci-fécondations n'est pas significativement différente entre les deux groupes de TZI (p = 0,13).

Afin d'identifier les paramètres du spermogramme diagnostique qui diffèrent entre le groupe « échec ou pauci-fécondation » et le groupe « fécondation normale », un t-test de Student dont les résultats sont présentés dans le **tableau XII** ci-dessous a été réalisé.

Tableau XII : comparaison des paramètres spermatiques du spermogramme diagnostique entre le groupe « échec ou pauci-fécondation » et le groupe « fécondation normale »

Paramètres Groupes comparés	TZI	Concentration (millions/mL)	Concentration totale (millions/éjaculat)	Mobilité	FT
Echec + Pauci-fécondation VS Fécondation normale	NS	p = 0,007	p = 0,01	p = 0,005	p = 0,0001

Le TZI ne diffère pas significativement entre les deux groupes. En revanche, la concentration (p = 0,007 et p = 0,01), la mobilité (p = 0,005), et le nombre de FT (p = 0,0001) sont significativement différents (plus faibles) dans le groupe « échec ou pauci-fécondation » par rapport au groupe « fécondation normale ».

Ainsi, on peut supposer que non seulement le nombre de formes typiques, mais aussi les autres paramètres, peuvent jouer un rôle dans la réussite de la fécondation.

Afin de s'affranchir de ces autres paramètres, nous avons constitué deux sous-groupes, à savoir « TS isolée » et « normozoospermie » qui ne diffèrent entre eux que par leur morphologie, leurs mobilités et leurs concentrations étant normales. Leurs fréquences respectives d'issues de fécondation sont comparées dans le **tableau XIII** ci-dessous :

Tableau XIII : fréquences des issues de fécondation dans les groupes TS isolée et normozoospermie

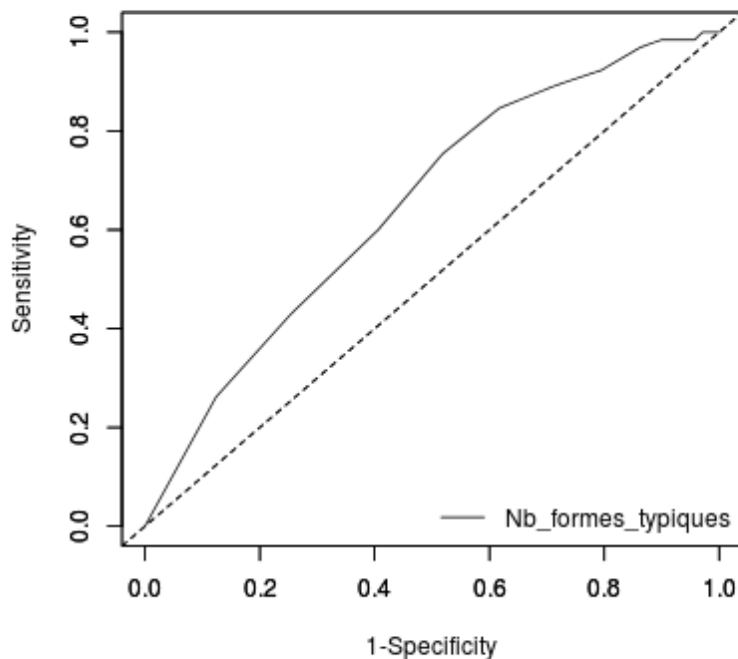
Groupes diagnostiques Fréquence des issues de fécondation	Tératozoospermie isolée	Normozoospermie	p-value
Echec + Pauci-fécondation	12,0 %	3,4 %	0,003

La fréquence cumulée des échecs et pauci-fécondations est significativement plus élevée dans le groupe TS isolée (p = 0,003).

2.2.3.3. Prédiction de la réussite de la fécondation à partir du taux de formes typiques et recherche d'un seuil

La courbe ROC utilisant le pourcentage de FT pour prédire un taux de fécondation < 25 % (c'est-à-dire l'appartenance au groupe échec de fécondation ou au groupe pauci-fécondation) est présentée dans la **figure 13** ci-dessous :

Figure 13 : courbe ROC



L'aire sous la courbe a une valeur de 0,65 avec une p-value < 0,0001, ce qui signifie qu'elle est significativement différente de 0,5 et que dans 65 % des cas, une tentative tirée au sort parmi les échecs ou pauci-fécondation a une valeur de formes typiques inférieure à celle d'une tentative tirée au sort parmi les succès de fécondation.

L'indice de Youden montre que **le seuil optimal se situe à 3 %**. Avec ce cut-off, les performances analytiques suivantes sont obtenues :

- Sensibilité = 0,754
- Spécificité = 0,482
- Valeur prédictive positive = 0,155
- Valeur prédictive négative = 0,940

La sensibilité et la spécificité signifient respectivement que parmi les échecs et pauci-fécondations, 75 % des patients ont un pourcentage de FT ≤ 3 % et que parmi les succès de fécondation, 48 % ont un pourcentage de FT > 3 %.

Les valeurs prédictives positive et négative traduisent respectivement le fait que, parmi les patients ayant $\leq 3\%$ de FT, 15 % ont un échec ou une pauci-fécondation, et que lorsque le patient a $> 3\%$ de FT, il y a 94 % de chances pour que la fécondation soit un succès.

Avec ce seuil de FT $> 3\%$, nous retrouvons le seuil de $\geq 4\%$ de FT recommandé par l'OMS.

2.2.3.4. Qualité embryonnaire à J2

Les critères de qualité embryonnaire sont comparés dans le **tableau XIV** ci-dessous :

Tableau XIV : comparaison de la qualité embryonnaire entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Paramètre	Groupe TS (FT $< 4\%$)	Groupe contrôle (FT $\geq 4\%$)	p-value
Effectif (n)	317	265	
Taux d'embryons « top qualité » à J2 (%)	22,4 \pm 27,3	19,2 \pm 22,0	0,13
Taux d'embryons fragmentés à J2 (%)	42,4 \pm 33,8	41,3 \pm 32,3	0,72

En FIVc, la morphologie des spermatozoïdes n'impacte pas la **qualité embryonnaire** à J2. En effet, ni le taux d'embryons de « top qualité », ni le taux d'embryons fragmentés à J2 ne sont significativement différents entre les deux groupes ($p = 0,13$ et $p = 0,72$).

2.2.4. Données cliniques

Les aspects cliniques des tentatives de FIV des deux groupes sont comparés dans le **tableau XV** ci-dessous :

Tableau XV : comparaison des aspects cliniques des tentatives de FIV entre les deux groupes de morphologie des spermatozoïdes

Paramètre	Groupe TS (FT < 4 %)	Groupe contrôle (FT ≥ 4 %)	p-value
Effectif (n)	317	265	
Taux de transfert	70 %	77 %	0,08
Nombre d'embryons frais transférés	1,16 ± 0,37	1,25 ± 0,43	0,02
Taux de grossesses cliniques par transfert	40,5 %	37,0 %	0,45
Nombre de naissances	72	57	
Taux de naissances par transfert (%)	32 %	28 %	0,33
Taux de naissances multiples (%)	4 %	7 %	0,49
Taux de fausses couches (%)	13 %	18 %	0,39
Taux d'implantation (%)	36,5 %	34,4 %	0,69

Si dans le groupe TS il y a autant de transferts, le nombre moyen d'embryons transférés est significativement plus faible que dans le groupe contrôle ($p = 0,02$). Cependant, cela n'impacte ni le taux de grossesses cliniques ($p = 0,45$), ni le taux de fausses couches ($p = 0,39$), ni le taux de naissances ($p = 0,33$), ni le taux de naissances multiples ($p = 0,49$), ni le taux d'implantation ($p = 0,69$).

IV. Discussion

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'impact de la morphologie des spermatozoïdes sur les résultats de fécondation en FIV classique (FIVc). Pour cela, nous avons réalisé une étude rétrospective sur 582 cycles de FIVc au CHRU de Tours entre 2017 et 2020.

L'objectif principal était d'étudier le lien potentiel entre morphologie et fécondation (taux, fréquence de survenue d'un échec ou d'une pauci-fécondation). Ceci a été possible grâce à la constitution de deux groupes de morphologie basés sur un seuil de FT à 4 % (recommandations OMS) et d'une **analyse de corrélation entre le pourcentage de formes typiques avec le taux de fécondation**. De plus, nous avons cherché à déterminer si la morphologie pouvait constituer un **marqueur prédictif de la réussite de la fécondation** et quel serait le seuil optimal d'une telle prédiction grâce à l'utilisation d'une courbe ROC.

Secondairement, nous avons analysé le lien potentiel entre morphologie et étapes post fécondation (qualité embryonnaire à J2, capacité des embryons transférés à s'implanter et à aboutir à une naissance vivante).

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le rôle important mais non absolu de la morphologie dans la fécondation en FIVc, et son impact sur le nombre d'embryons obtenus. En revanche, ce travail n'a pas montré d'influence de la morphologie sur la qualité des embryons obtenus à J2, ni sur leur évolution après transfert *in vivo*.

Objectif principal

Sources de biais potentiels

L'une des manières d'étudier le rôle de la morphologie est de comparer les résultats de deux groupes semblables idéalement en tous points, excepté sur le plan de la morphologie. **Dans notre étude, ces deux groupes étaient similaires pour la consommation de tabac, l'IMC, et la fréquence de varicocèle et cryptorchidie, bien que ces paramètres aient été décrits pour être associés à la tératozoospermie (36–41).**

En revanche, **le groupe TS présentait une concentration et une mobilité spermatiques amoindries**. L'association de la tératozoospermie et de l'oligozoospermie et/ou de l'asthénozoospermie est fréquemment rencontrée dans la littérature (28,42–44). Elle est donc susceptible d'induire un biais dans l'analyse puisqu'elle compromet la comparabilité des groupes. **Ce biais est finalement limité dans notre étude par le contrôle du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés par puits, qui est constant pour toutes les tentatives de FIVc.**

Le groupe TS était constitué d'une population d'hommes et de femmes plus jeunes que le groupe contrôle. Cela peut sembler surprenant au premier abord du fait que la littérature montre une association entre tératozoospermie et augmentation de l'âge de

l'homme (45,46). Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans notre étude ces hommes et ces femmes plus jeunes ont été sélectionnés par la tératozoospermie : si cette dernière avait été absente, des grossesses auraient pu être obtenues naturellement ou par IUI et sans nécessiter de prise en charge en FIVc. Cette différence d'âge peut aussi constituer un biais : une meilleure qualité ovocytaire associée aux femmes plus jeunes (47) offre de meilleures chances de fécondation (48,49). Malgré cela, **l'impact délétère de la morphologie a tout de même été mis en évidence puisque les taux de fécondation normale et le taux de polyspermie étaient significativement plus faibles dans le groupe TS.**

Taux de fécondation

En accord avec nos résultats, une diminution significative du taux de fécondation en cas de morphologie anormale est retrouvée dans la majorité des publications (cf tableau N°XVI).

Tableau XVI : comparaison des résultats de la littérature portant sur le lien entre la morphologie des spermatozoïdes avec le taux de fécondation et/ou la fréquence des échecs de fécondation

Auteur, année (référence)	Effectif	Impact significatif de la morphologie sur la fécondation
Alleysson, 2022	582	oui
Zhou, 2021 (50)	2202	non
Chen, 2020 (51)	3155	oui
Zhu, 2019 (52)	375	oui
Faduola, 2018 (53)	526	oui
Li, 2014 (54)	3922	oui
Zhu, 2013 (55)	2124	oui
Ghirelli-Filho, 2012 (56)	244	non
Keegan, 2007 (57)	454	non
Grow, 1994 (43)	2798	oui
Krüger, 1988 (10)	45	oui

Cependant, une minorité d'articles n'observe pas cette diminution. Une première étude ne trouvant pas de différence significative inclut un groupe probablement trop restreint (n = 27) de patients ayant une tératozoospermie pour pouvoir mettre en évidence une différence (56). Une deuxième étude, avec des groupes comparables aux nôtres (n = 454 dont 55 % de TS), ne montre pas de différence du taux de fécondation, que ce soit entre les groupes de morphologie, ou pour les différentes valeurs de FT (57). Enfin, une troisième étude portant sur une grande population (n = 2202) n'observe pas non plus de différence de taux de fécondation (totale) ni de taux de fécondation normale entre leurs groupes TS et contrôle (50). La raison de la discordance entre ces deux études et la nôtre réside peut-être

dans leurs critères d'inclusion. En effet, plus d'un tiers de leur population est constitué de patients réalisant une deuxième tentative. Nous pouvons supposer que si la deuxième tentative est réalisée en FIVc, la première a été un succès en termes de fécondation (dans le cas contraire la prise en charge aurait consisté à faire une ICSI). Ainsi, les échecs de fécondation dus à la morphologie anormale sont moins probables lors de la deuxième tentative de FIVc dans ces études. Pour limiter ce biais de sélection dans notre étude, nous avons décidé d'inclure uniquement les tentatives de rang 1. Cependant, il persiste le **biais lié à la nature rétrospective** de notre étude.

Taux de fécondation et TZI

Lorsque nous nous intéressons au taux de fécondation moyen selon le TZI, nous avons observé une **baisse significative du taux de fécondation lorsque le TZI était supérieur ou égal à 1,27**, sans différence de TZI moyen selon les différentes issues de la fécondation (cela peut s'expliquer éventuellement par le faible effectif du groupe d'échec et pauci-fécondation). Ces résultats corroborent les conclusions émises par l'OMS (4) sur la base d'études *in vivo* : **il existe une différence significative de TZI entre une population d'hommes fertiles et une population d'hommes infertiles, sans permettre de les différencier sur ce seul critère**. Ceci explique certainement pourquoi l'OMS ne fournit pas de valeur de référence pour le TZI. Plusieurs valeurs sont proposées dans la littérature mais elles émanent majoritairement d'études analysant la fertilité *in vivo* et non *in vitro* (9,58). Au-delà du TZI, une équipe s'est intéressée aux catégories d'anomalies qui permettent son calcul : elle observe une corrélation entre le taux de fécondation et les anomalies de la tête ou de l'acrosome, mais pas avec les anomalies des autres parties du spermatozoïde (59).

Echec et pauci-fécondation

En parallèle à la baisse du taux de fécondation, nos résultats montraient une **hausse significative du taux d'échec de fécondation** mais seulement une tendance à la hausse du taux de pauci-fécondation en cas de morphologie anormale. Cette observation est un **argument en faveur du rôle que joue la morphologie des spermatozoïdes dans la réussite de la fécondation**, et donc naturellement dans le **nombre d'embryons obtenus à J2**. Selon le consensus de Vienne, l'échec ou la pauci-fécondation peuvent être indicatifs d'une dysfonction des spermatozoïdes, d'un nombre insuffisant de spermatozoïdes mobiles inséminés, ou d'un échec d'activation de l'ovocyte (34). Les différences observées ne semblent pas attribuables à un problème féminin (femmes plus jeunes dans le groupe TS). Par ailleurs, le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés était le même pour toutes les tentatives de FIVc. Ainsi, nous pouvons supposer que la différence de fécondation est probablement imputable à une dysfonction des spermatozoïdes, et notamment à leur morphologie qui nous a permis de constituer les groupes.

Hypothèses explicatives ?

Certains auteurs ont cherché à expliquer par **quels mécanismes une morphologie anormale pouvait aboutir à un taux de fécondation amoindri**. Les spermatozoïdes de forme anormale seraient **moins rapides** (42,60), se **lieraient moins à la zone pellucide** (61–63) et **fusionneraient moins avec l'oolemme** (64,65). Grâce au test « *sperm penetration assay* », Coetzee et son équipe ont montré que les spermatozoïdes anormaux pénétraient moins bien dans les ovocytes de hamsters, et que ce test était corrélé aux résultats de fécondation en FIV humaine (66). Pour pallier ces problématiques, il a été proposé d'augmenter le nombre de spermatozoïdes inséminés en cas de tératozoospermie (67). Cependant, un nombre trop important de spermatozoïdes pourrait s'avérer délétère pour la fécondation (68) et le développement de l'embryon notamment à cause des radicaux libres générés (69).

Contribution de la morphologie spermatique ?

Afin de préciser **dans quelle mesure la morphologie intervient dans le taux de fécondation**, nous avons réalisé une régression linéaire simple entre le pourcentage de FT et le taux de fécondation. Il en résulte une liaison positive fortement significative ($p < 0,0001$) mais très faiblement explicative. En effet, avec un coefficient de détermination r^2 égal à 0,035, le nombre de FT n'explique que 3,5 % du taux de fécondation. Ces résultats sont similaires à ceux de Zhu 2013 dans lesquels $r^2 = 0,003$ ($p = 0,01$) (55). **A elle seule, la valeur de FT n'explique donc qu'une très faible part du taux de fécondation**, bien qu'elle soit considérée comme le paramètre le plus discriminant entre les hommes fertiles et infertiles *in vivo* (28). Elle a été le paramètre le plus souvent prédictif des résultats de fécondation *in vitro* dans la revue de Coetzee 1998 (70) et dans l'étude récente de Chen et al. (51). **L'hypothèse qu'un ensemble de facteurs et non un facteur unique soit plus prédictif du potentiel fécondant du sperme a été émise** (71). Ainsi, une analyse multivariée montre que la mobilité, le nombre de spermatozoïdes par éjaculat et la morphologie sont tous les trois isolément prédictifs du taux de fécondation, mais que la prédiction est meilleure en combinant les trois paramètres (55). De plus, Harris et son équipe montrent **qu'une faible concentration et une faible mobilité des spermatozoïdes sont associées à un risque accru d'échec de fécondation en FIVc** (72). Dans notre étude, cette association a été retrouvée au cours de la comparaison du groupe « échec et pauci-fécondation » avec le groupe « fécondation normale » : en plus de la morphologie, la concentration et la mobilité étaient significativement différentes entre les deux groupes. Ce biais potentiel dans l'analyse du rôle de la morphologie a motivé notre choix d'affiner secondairement notre analyse à l'aide de **deux sous-groupes (normozoospermie et tératozoospermie isolée) afin de neutraliser les effets de la concentration et de la mobilité du spermogramme de départ**. Nous avons alors observé une **hausse de la fréquence des échecs et des pauci-fécondations en cas de morphologie anormale**, comme c'est le cas dans d'autres études (73,74).

Marqueur prédictif et recherche d'un seuil optimal ?

Ainsi, nous pouvons supposer que la catégorisation des prélèvements en morphologie normale ou anormale pourrait nous permettre d'estimer à l'avance le risque de fécondation anormale. A cette fin, les performances analytiques de la **morphologie en tant que marqueur prédictif de l'issue de fécondation** ainsi que le **seuil optimal de FT à fixer** ont été déterminés dans notre étude grâce à une courbe ROC. Il en résulte un **seuil strictement supérieur à 3 % de FT pour prédire une bonne fécondation**, ce qui coïncide avec le seuil de normalité de l'OMS défini comme étant supérieur ou égal à 4 %. Ce seuil correspond au 5^{ème} percentile des valeurs de FT retrouvées dans un grand échantillon d'hommes ayant fait preuve de leur fertilité en moins de 12 mois dans une étude multicentrique (25). Cela avait déjà été mis en évidence par Menkveld et al. en 2001 pour différencier les hommes fertiles des hommes subfertiles (9). En revanche, les **performances analytiques associées à ce seuil sont assez faibles**. Si la sensibilité reste acceptable à 75 %, la spécificité n'est que de 48 %. Il en résulte une valeur prédictive positive très faible (15,5 %). Cela signifie que seulement 15,5 % des patients ayant un diagnostic de tératozoospermie auront une mauvaise fécondation en FIVc et constitue donc un **argument médiocre pour modifier la prise en charge de tous les patients présentant une tératozoospermie**. Certains auteurs recommandent de réaliser une ICSI pour tous les patients ayant une tératozoospermie car cette technique améliore le taux de fécondation et diminue la fréquence des échecs de fécondation (55,75). Cependant il n'a pas été mis en évidence de hausse du taux de grossesse associé (55,75) (ce qui constitue pourtant l'objectif de la prise en charge en AMP). L'intérêt de l'ICSI dans ce cas est controversé (76) car il s'agit d'une technique invasive pour l'ovocyte. Ainsi, certaines équipes ont décidé de ne plus prendre en compte la morphologie pour décider entre FIVc et ICSI, ce qui leur a permis de diminuer le nombre d'ICSI sans diminuer leur taux de naissance vivante par ovocyte prélevé (77). Ceci explique probablement pourquoi seulement la moitié des cliniciens et des biologistes interrogés dans une étude utilisent le taux de FT dans leur choix de technique d'AMP (78).

Le faible coefficient de corrélation ainsi que les faibles performances analytiques du seuil de 3 % de formes typiques à prédire l'issue de la fécondation peuvent en partie être expliqués par **plusieurs facteurs**. Tout d'abord, nous pouvons supposer que le faible échantillon de 200 spermatozoïdes observés lors d'un spermocytogramme ne sont pas représentatif des millions de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. De plus, l'évaluation porte sur le sperme brut tandis que les spermatozoïdes inséminés ont subi une préparation préalable susceptible de modifier le pourcentage de FT. En effet, Scott et al. ont montré une augmentation significative du pourcentage de FT après préparation du sperme (79) (en parallèle à la diminution des anomalies de toutes les parties des spermatozoïdes et du TZI (44)). Yue et al. (44) a quantifié cette augmentation entre 7,7 % et 11,3 %, mais elle varie en fonction de la technique utilisée (80). Enfin, l'évaluation de la morphologie n'a pas été réalisée le jour même de la FIVc dans notre étude pour des raisons pratiques d'organisation : quelques semaines peuvent s'être écoulées entre ces deux événements. Ce délai est à prendre en considération car il a été observé une variation de la morphologie en fonction de

la saison (81–83). L'organisation du laboratoire de FIV est prévue de la sorte car il serait chronophage de refaire un spermocytogramme manuel à chaque tentative de FIVc. Ceci pourrait néanmoins être possible en cas d'automatisation ou d'évaluation simplifiée et rapide de la morphologie. Malgré cela, l'hypothèse que la morphologie soit insuffisante pour prédire l'issue de fécondation ne peut être écartée. En effet, le taux de fécondation global du groupe de patients avec une tératozoospermie reste acceptable (> 60 %).

Objectifs secondaires

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à d'autres **critères de jugement biologiques et cliniques**.

Qualité embryonnaire à J2

Le critère de qualité embryonnaire à J2 ne s'est pas révélé significativement différent entre les deux groupes de morphologie, que ce soient en termes de taux d'embryons « top qualité » ou « fragmentés ». C'est également le cas dans l'étude de Zhu et al. et Terriou et al. (52,84) tandis que certaines études ont mis en évidence une diminution de la qualité embryonnaire à J3 lorsqu'il y a une tératozoospermie (50,54). Nous pouvons supposer que cette différence est faible et donc significative seulement dans les études ayant un effectif très important ($n > 2000$ dans ces deux dernières études (50,54) (**cf tableau XVII**). D'autres auteurs n'observent pas de différence de qualité en ICSI en fonction de la morphologie puisque le taux de blastocyste et de congélation est le même, mise à part une cinétique modifiée avec une compaction retardée lorsque le pourcentage de FT est entre 0 et 2 % (85). Certains vont plus loin dans l'analyse et relient la moins bonne qualité embryonnaire avec les anomalies du spermatozoïde, notamment nucléaires (extra-acrosomiques) où siège l'information génétique paternelle (86). Malgré un caryotype somatique normal, les anomalies des paramètres spermatiques pourraient être associées à des anomalies chromosomiques des spermatozoïdes (87) et à une fragmentation plus importante de l'ADN (88) potentiellement transmissible à l'embryon (89) et source de fausse couche (87). Cependant, d'autres recherches sont nécessaires afin de confirmer ou non cette hypothèse.

Tableau XVII : comparaison des résultats de la littérature portant sur le lien entre la morphologie des spermatozoïdes et la qualité embryonnaire à J2, le taux de grossesse et le taux de naissance

Auteur, année (référence)	Effectif	Liaison qualité embryonnaire	Liaison taux de grossesse/naissance
Alleysson, 2022	582	NS	NS/NS
Zhou, 2021 (50)	2202	S	NS/NS
Chen, 2020 (51)	3155	ND	NS/NS
Zhu, 2019 (52)	375	NS	NS/NS
Faduola, 2018 (53)	526	ND	ND
Li, 2014 (54)	3922	S	NS/NS
Zhu, 2013 (55)	2124	ND	ND/ND
Ghirelli-Filho, 2012 (56)	244	ND	NS/NS
Keegan, 2007 (57)	454	ND	NS/NS
Yue, 1995 (44)	197	ND	S/ S (mais effet inverse observé)
Grow, 1994 (43)	2798	ND	NS tout confondu S (si appariement)
Krüger, 1988 (10)	45	ND	NS

Issues cliniques

Le transfert embryonnaire est un passage incontournable avant l'évaluation de l'issue clinique. **Or le taux de transfert et le nombre d'embryons transférés sont peu comparables entre les études, car ils dépendent des stratégies et des critères de transfert propres à chaque centre.** Dans notre étude, le moindre nombre d'embryons transférés dans le groupe TS peut s'expliquer par une proportion moins importante (bien que non significative) de femmes âgées de plus de 37 ans dans ce groupe. En effet, dans notre centre, un âge ≥ 37 ans constitue un argument en faveur d'un transfert de deux embryons plutôt qu'un transfert mono-embryonnaire.

Concernant l'implantation et l'évolution de la grossesse, nos résultats ne montraient pas d'impact de la tératozoospermie puisque les critères cliniques étaient similaires entre les deux groupes. Une tendance non significative à de meilleurs résultats dans le groupe de morphologie anormale est peut-être due à l'âge plus faible des femmes de ce groupe. En effet, les caractéristiques de la population féminine ont une forte influence sur ces critères car l'obtention d'une grossesse et son évolution constituent un processus complexe dépendant de multiples facteurs. Pour illustrer ceci, une étude qui ne retrouvait initialement pas de différence de taux de grossesse et de taux d'implantation dans le groupe de tératozoospermie a finalement mis en évidence le contraire en réalisant une analyse des couples appariés selon les paramètres féminins (43). Dans la littérature, le taux de grossesse, le taux de naissance par transfert et le taux d'implantation sont le plus souvent similaires

entre les groupes de morphologie (50,52,54–56) (**cf tableau XVII**). Les études mettant en évidence une baisse du taux de grossesse associées à une morphologie anormale sont souvent constituées de faibles effectifs (90,91). De manière surprenante, une étude trouve paradoxalement une augmentation du taux de grossesse et de naissance en cas de tératozoospermie (44). Cependant il s'agit là d'une étude sur un très petit effectif ($n = 21$ pour le groupe tératozoospermie), ce qui n'est peut-être pas représentatif de la population de patients avec une morphologie spermatique anormale. Plus raisonnablement, **une méta-analyse de 2011 ne trouve pas de lien entre le taux de grossesse clinique par cycle et la tératozoospermie isolée, qu'il s'agisse d'une prise en charge en FIVc ou en ICSI** (92).

Concernant le taux de fausses couches, il n'était pas augmenté par la tératozoospermie dans notre étude. C'est également la conclusion de la majorité des publications (43,50–52). Cependant, ce paramètre est difficile à interpréter car son incidence est faible et il dépend de nombreux paramètres, notamment féminins.

Difficultés à comparer les études entre elles

Les **discordances** observées entre les résultats des différentes études ont probablement une origine **multifactorielle**.

Tout d'abord, les études portent sur des populations très hétérogènes, tant en termes de zones géographiques, que de critères d'inclusion et de tailles d'échantillons. Les caractéristiques de la population masculine peuvent avoir un impact sur la qualité spermatique, alors que les caractéristiques de la population féminine (âge, réserve ovarienne, réponse à la stimulation) peuvent avoir une forte influence sur les issues biologiques et cliniques de la FIVc.

Ensuite, les protocoles de stimulation et les procédures de FIVc sont centre-dépendants. Il existe donc une grande variabilité dans la préparation du sperme avant la FIVc, le nombre de spermatozoïdes inséminés, les milieux de fécondation et de culture utilisés, la stratégie de transfert, etc.

Par ailleurs, les indicateurs utilisés pour mesurer l'impact de la morphologie n'ont pas toujours la même définition, et cette dernière n'est pas systématiquement précisée dans les études. Par exemple, le taux de fécondation, qui constitue l'indicateur principal de notre étude, n'a pas de définition consensuelle au niveau international. La littérature comporte donc de nombreuses variantes, tant au niveau du numérateur (2PN, ≥ 2 PN, prise en compte du nombre de GP ou non) que du dénominateur (prise en compte de la totalité des COC inséminés ou uniquement des ovocytes matures). Notre choix de rapporter le numérateur au nombre d'ovocytes matures a été motivé par la volonté de limiter l'impact des ovocytes immatures non fécondables au moment de l'insémination et ainsi mettre en exergue la capacité fécondante du sperme. Les différences de définitions sont aussi observées pour les autres indicateurs. Ainsi, le taux de grossesse peut inclure les grossesses biochimiques ou cliniques, et les exprimer par transfert ou de manière cumulée par tentative en incluant les transferts frais et congelés. Ces disparités concernent donc de nombreux indicateurs et concourent à diminuer la comparabilité des résultats de la littérature entre eux.

Enfin, une part importante de l'inconstance des conclusions est due à l'évaluation même de la morphologie des spermatozoïdes. En effet, elle est considérée comme le paramètre le plus variable du spermogramme-spermocytogramme. Ceci est illustré dans une étude portant sur 121 laboratoires pendant 15 ans dans laquelle le coefficient de variation de la morphologie atteint 79 %, et est bien supérieur à ceux de la numération et de la mobilité (19 % et maximum 37 % respectivement) (93). Cet ordre de grandeur élevé est retrouvé par une autre équipe (94). Cette variabilité, qui altère la fiabilité des résultats, trouve sa source à différents niveaux.

(i) La **variabilité inter-laboratoire**, qui est grandement imputable au manque de standardisation (95,96). Malgré les recommandations de l'OMS, de nombreuses différences portent sur la préparation, coloration, le mode de lecture (manuel ou automatique) et la classification utilisés par les laboratoires (97). Une enquête récente, interrogeant 225 biologistes et cliniciens, a fait état des pratiques en cours en France en 2016 (78).

- Dans cette enquête, il a été recensé pas moins de 6 colorations différentes. Pourtant, la coloration est connue pour avoir un impact sur la morphologie des spermatozoïdes (98,99) notamment en modifiant la taille de la tête en fonction de leur osmolarité (100). Ainsi, la coloration Diff-Quik est associée à un nombre de FT plus important que celle de Papanicolaou (64,65). Cette dernière est considérée comme la coloration de référence par certains auteurs (101) et par l'OMS. La coloration de Shorr est utilisable bien que non validée avec les critères stricts, et est considérée comme similaire à celle de Papanicolaou pour le pourcentage de FT (4). Dans notre étude, elle nous a permis de retrouver le même seuil de FT que l'OMS, ce qui constitue plutôt un argument en faveur d'une reproductibilité acceptable.
- La préparation et le mode de lecture ne sont pas non plus uniformisés. L'évaluation peut se faire sur du sperme seulement liquéfié ou alors lavé. Certains laboratoires procèdent à une lecture manuelle tandis qu'une minorité utilise l'analyse automatisée (2,5 à 15 % selon les études (78,96)). Ces deux facteurs peuvent également affecter le résultat rendu (102).
- L'enquête souligne également une très grande disparité dans l'interprétation des lames. En effet, seulement 29 % des laboratoires font l'analyse sur 200 spermatozoïdes, 27 % les classent selon les critères stricts et 21 % utilisent le seuil à 4 %. Ainsi, plus des trois quarts des laboratoires ne suivent pas les recommandations émises par l'OMS pour l'évaluation de la morphologie. Ils utilisent la classification de David avec des seuils variant de 4 à 30 %. La coexistence de plusieurs classifications et de plusieurs seuils pour définir la tératozoospermie participe à la variabilité inter-laboratoire.
- Enfin, le volume d'activité des laboratoires impacte leur fiabilité : un laboratoire ayant une forte activité aura tendance à rendre des résultats plus fiables qu'un laboratoire avec une faible activité (94).

(ii) **Variabilité inter-opérateur.** Au sein d'un même laboratoire, les opérateurs peuvent rendre des résultats différents à partir d'une lame identique. Ceci peut être apprécié par le coefficient de variation du nombre de FT qui est retrouvé faible (4 %) dans certaines études (103) et beaucoup plus important (40 %) dans d'autres (104). L'accord entre deux résultats de pourcentage de FT rendus peut aussi être mesuré grâce au coefficient de corrélation entre deux observateurs qui doit être le plus proche possible de 100 % pour conclure à une bonne reproductibilité. Il a été évalué entre 65 et 87 % dans une étude comparant 4 observateurs (7). Concernant la proportion d'anomalies rencontrées, les études s'accordent à montrer que les coefficients de variation sont très disparates en fonction du type d'anomalie étudiée, et tendent à être plus élevés pour la tête et la pièce intermédiaire (103,104). Ces données révèlent le caractère **subjectif** de l'évaluation de la morphologie.

(iii) **Variabilité intra-opérateur.** Au cours de sa pratique, l'évaluateur acquiert de l'expérience qui modifie son interprétation de la morphologie (94). Les opérateurs les plus expérimentés sont les plus proches des valeurs de référence tandis que ceux ne réalisant pas cette analyse en routine ont tendance à sous-estimer le nombre d'anomalies (104). Certains auteurs jugent cette variation intra-individuelle acceptable car relativement faible (7,105) bien qu'étudiée sur un laps de temps court (une semaine d'intervalle). En méthode automatisée, la répétabilité semble aussi acceptable (106).

(iv) **Variabilité des normes.** L'évolution des classifications avec l'adoption des critères stricts a conduit à une diminution des seuils de référence. Or, il a été montré que la variabilité dépendait de la classification utilisée (107,108) et augmentait pour les petites valeurs (7,105).

Afin de **contrôler et limiter la variabilité de l'évaluation de la morphologie**, de nombreux auteurs appellent à l'homogénéisation des pratiques (78) (préparation, coloration, classification, techniques de lecture), à établir des programmes de maintien de compétences réguliers (94,109,110) avec coopération internationale (58). Le constat d'une **tendance à l'amélioration** au cours du temps (93), avec l'augmentation de l'utilisation de la coloration de Papanicolaou, l'adoption des recommandations de l'OMS et la réalisation de contrôles de qualité externes par certains organismes tels que Biologie Prospective est encourageant.

V. Conclusion

L'analyse de la morphologie des spermatozoïdes est initialement un examen de première intention dans l'identification d'une infertilité d'origine masculine, notamment en raison du lien rapporté avec la probabilité de conception *in vivo*. *In vitro*, le rapport entre la morphologie des spermatozoïdes et leur capacité à féconder un ovocyte fait l'objet d'une littérature abondante. En effet, la fécondation occupant une place centrale au cours d'une tentative de FIV, la prédiction de sa réussite constitue un challenge pour les laboratoires pratiquant l'AMP. Le rôle de la morphologie des spermatozoïdes dans cette étape cruciale, de même que la manière de l'évaluer et la définition d'un spermatozoïde normal suscitent un débat depuis plus de 70 ans, comme en attestent les modifications des recommandations de l'OMS au cours du temps.

Cette étude rétrospective avait pour objectif de mesurer l'impact de la morphologie sur les résultats de FIVc avec les méthodes (de préparation, d'évaluation) encore en vigueur actuellement au sein de notre laboratoire. Elle a permis de mettre en évidence qu'une morphologie anormale était associée à une diminution du taux de fécondation et donc à une augmentation du risque d'échec de fécondation. Cependant, la morphologie n'explique qu'une petite part de cet événement, ce qui en fait un marqueur prédictif avec de faibles performances analytiques. Aucun effet sur le développement embryonnaire après fécondation n'a été observé dans notre étude. L'inconstance des résultats entre les différentes publications de la littérature permet de souligner le caractère variable de l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes.

Ces constatations amènent à se questionner sur la fiabilité et la pertinence de ce paramètre au regard des moyens mis en œuvre pour l'évaluer. En effet, la réalisation des spermocytogrammes est chronophage, et nécessite des contrôles de qualité internes et externes en plus d'une formation régulière. Afin de limiter ces inconvénients, l'automatisation de la technique permettrait de réduire le temps de l'analyse et la subjectivité de l'évaluation.

La morphologie des spermatozoïdes étant insuffisante pour prédire la réussite de la fécondation, la recherche de marqueurs complémentaires semble nécessaire pour adapter au mieux la prise en charge des patients. Cette recherche est justifiée par la physiologie de la fécondation qui met en jeu de nombreuses étapes qui ne peuvent pas être évaluées uniquement par un spermocytogramme. Par ailleurs, l'insuffisance de performance de tests fonctionnels proposés il y a plus de 30 ans (test de réaction acrosomique, hamster test...) met bien en évidence la difficulté à appréhender la complexité de ce processus. Une analyse fine de la morphologie (MSOME : *Motile Sperm Organelle Morphology Examination*) a fait l'objet d'études plus récentes sans avancée significative pour le moment (111). Enfin, il ne

faut probablement pas oublier que l'ovocyte peut dans une certaine limite compenser une altération spermatique (112) ; le résultat d'une fécondation réussie étant le fruit d'une rencontre complémentaire et coopérative entre un spermatozoïde et un ovocyte...

BIBLIOGRAPHIE

1. inserm-rapportthematique-troublesfertilité-2012.pdf [Internet]. [cité 6 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/wp-content/uploads/2017-11/inserm-rapportthematique-troublesfertilité-2012.pdf>
2. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl*. juill 1991;6(6):811-6.
3. Agence de la biomédecine [Internet]. [cité 6 janv 2022]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/principaux-chiffres-de-lactivite>
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2021 [cité 6 janv 2022]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208>
5. pierrotb. AUTOUR DU SPERMATOZOÏDE [Internet]. pierrotDCDL.over-blog.com. [cité 13 janv 2022]. Disponible sur: <http://pierrotdcdl.over-blog.com/2017/11/autour-du-spermatozoide.html>
6. Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung C-H, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis*. *Int J Androl*. 1993;16(6):362-9.
7. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod Oxf Engl*. juill 1990;5(5):586-92.
8. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. déc 1986;46(6):1118-23.
9. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, 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 Oxf Engl*. juin 2001;16(6):1165-71.
10. Kruger TF, Haque D, Acosta AA, Pleban P, Swanson RJ, Simmons KF, et al. Correlation between sperm morphology, acrosin, and fertilization in an IVF program. *Arch Androl*. 1988;20(3):237-41.
11. Menkveld R, Holleboom CAG, Rhemrev JPT. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl*. janv 2011;13(1):59-68.
12. Schéma Fécondation [Internet]. [cité 13 janv 2022]. Disponible sur: <http://infirmi.e-monsite.com/pages/biologie-1/schema-fecondation.html>

13. Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah A, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2 déc 2014;12:121.
14. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 1 juin 2011;26(6):1270-83.
15. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. juin 1999;11(3):307-11.
16. Votre FIV, fécondation in vitro à Clermont-Ferrand - Centre d'AMP CERES [Internet]. PMA Clermont-Ferrand. [cité 6 janv 2022]. Disponible sur: <https://pma-clermont-ferrand.fr/fiv-fecondation-in-vitro-deroulement-clermont-ferrand-prix-definition/>
17. MacLEOD J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertil Steril*. oct 1951;2(5):394-414.
18. Eliasson R. Standards for investigation of human semen Untersuchungsstandards für das menschliche Sperma La standardisation de l'analyse du sperme humain. *Andrologia*. 1971;3(2):49-64.
19. Page EW, Houlding F. The clinical interpretation of 1000 semen analyses among applicants for sterility studies. *Fertil Steril*. avr 1951;2(2):140-51.
20. Mortimer D, Leslie EE, Kelly RW, Templeton AA. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*. mars 1982;64(2):391-9.
21. Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil*. janv 1992;94(1):71-84.
22. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*. oct 1988;11(5):379-94.
23. Organisation WH. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press; 1999. 150 p.
24. World Health Organization, éditeur. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p.
25. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. juin 2010;16(3):231-45.
26. Blanchard M, Haguenoer K, Apert A, Poret H, Barthélémy C, Royère D, 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*. avr 2011;34(2):145-52.

27. 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*. oct 2003;9(5):405-28.
28. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 8 nov 2001;345(19):1388-93.
29. Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum Reprod Oxf Engl*. janv 2001;16(1):110-4.
30. Check JH, Bollendorf A, Press M, Blue T. Standard sperm morphology as a predictor of male fertility potential. *Arch Androl*. févr 1992;28(1):39-41.
31. Kovac JR, Smith RP, Cajipe M, Lamb DJ, Lipshultz LI. Men with a complete absence of normal sperm morphology exhibit high rates of success without assisted reproduction. *Asian J Androl*. févr 2017;19(1):39-42.
32. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*. sept 2017;5(5):845-62.
33. Matson PL. External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Hum Reprod Oxf Engl*. mars 1995;10(3):620-5.
34. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address: coticchio.biogenesi@grupposandonato.it. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online*. nov 2017;35(5):494-510.
35. Ferraretti AP, Gianaroli L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Hum Reprod Oxf Engl*. sept 2014;29(9):1842-5.
36. Bundhun PK, Janoo G, Bhurtu A, Teeluck AR, Soogund MZS, Pursun M, et al. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 8 janv 2019;19:36.
37. Macdonald AA, Stewart AW, Farquhar CM. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics. *Hum Reprod Oxf Engl*. déc 2013;28(12):3178-87.
38. Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, et al. Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertil Steril*. oct 2016;106(5):1070-5.
39. Efficacy of varicocele surgery in primary infertile patients with isolated teratozoospermia. A retrospective analysis - PubMed [Internet]. [cité 14 févr 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33118228/>

40. Mieuisset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Effects of artificial cryptorchidism on sperm morphology. *Fertil Steril.* janv 1987;47(1):150-5.
41. Cryptorchidism and semen quality: a TEM and molecular study - PubMed [Internet]. [cité 14 févr 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16988323/>
42. Zollner U, Schleyer M, Steck T. Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl.* oct 1996;11(10):2155-61.
43. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF, et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril.* sept 1994;62(3):559-67.
44. Yue Z, Meng FJ, Jorgensen N, Ziebe S, Andersen AN. Andrology: Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1 juill 1995;10(7):1781-5.
45. Girsh E, Katz N, Genkin L, Girtler O, Bocker J, Bezdin S, et al. Male age influences oocyte-donor program results. *J Assist Reprod Genet.* avr 2008;25(4):137-43.
46. van den Hoven L, Hendriks JCM, Verbeet JGM, Westphal JR, Wetzels AMM. Status of sperm morphology assessment: an evaluation of methodology and clinical value. *Fertil Steril.* janv 2015;103(1):53-8.
47. Moghadam ARE, Moghadam MT, Hemadi M, Saki G. Oocyte quality and aging. *JBRA Assist Reprod.* 17 janv 2022;26(1):105-22.
48. Sobek A, Tkadlec E, Klaskova E, Prochazka M. Cytoplasmic Transfer Improves Human Egg Fertilization and Embryo Quality: an Evaluation of Sibling Oocytes in Women with Low Oocyte Quality. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* mai 2021;28(5):1362-9.
49. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Clinical Assisted Reproduction: Cumulus Cells Apoptosis as an Indicator to Predict the Quality of Oocytes and the Outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.* sept 2001;18(9):490-8.
50. Zhou W-J, Huang C, Jiang S-H, Ji X-R, Gong F, Fan L-Q, et al. Influence of sperm morphology on pregnancy outcome and offspring in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a matched case-control study. *Asian J Androl.* août 2021;23(4):421-8.
51. Chen L, Li D, Ni X, Zhu L, Zhang N, Fang J, et al. Effects of the normal sperm morphology rate on the clinical and neonatal outcomes of conventional IVF cycles. *Andrologia.* juin 2020;52(5):e13568.
52. Zhu D-L, Zhang H-G, Wang R-X, Jiang Y-T, Liu R-Z. Re-evaluation of the value of sperm morphology in classical in vitro fertilization in a Northeastern Chinese population. *J Int Med Res.* sept 2019;47(9):4134-42.

53. Paul F, Obajimi GO, Kolade CO. Is semen analysis without strict criteria misleading decisions in IVF? A prospective systematic study. *Int J Reprod Biomed.* juill 2018;16(7):459-62.
54. Li B, Ma Y, Huang J, Xiao X, Li L, Liu C, et al. Probing the Effect of Human Normal Sperm Morphology Rate on Cycle Outcomes and Assisted Reproductive Methods Selection. *PLoS ONE.* 20 nov 2014;9(11):e113392.
55. Zhu Y, Wu Q, Zhou X-J, Xin C, Ling G, Lu G. ICSI improves fertilization in isolated teratozoospermic men: a study with strictly controlled external factors and WHO-5 standard. *Syst Biol Reprod Med.* févr 2013;59(1):21-6.
56. Ghirelli-Filho M, Mizrahi FE, Pompeo ACL, Glina S. Influence of strict sperm morphology on the results of classic in vitro fertilization. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* août 2012;38(4):519-28.
57. Keegan BR, Barton S, Sanchez X, Berkeley AS, Krey LC, Grifo J. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* déc 2007;88(6):1583-8.
58. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl.* janv 2010;12(1):47-58.
59. Jedrzejczak P, Pawelczyk L, Taszarek-Hauke G, Kotwicka M, Warchoń W, Kurpisz M. Predictive value of selected sperm parameters for classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization. *Andrologia.* juin 2005;37(2-3):72-82.
60. Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, Acosta AA. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *J Androl.* oct 1990;11(5):446-52.
61. Franken DR, Kruger TF, Menkveld R, Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD. Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. *Fertil Steril.* sept 1990;54(3):497-503.
62. Oehninger S, Franken D, Kruger T, Toner JP, Acosta AA, Hodgen GD. Hemizona assay: sperm defect analysis, a diagnostic method for assessment of human sperm-oocyte interactions, and predictive value for fertilization outcome. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;626:111-24.
63. Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril.* déc 1992;58(6):1178-84.
64. Acosta AA, Oehninger S, Morshedi M, Swanson RJ, Scott R, Irianni F. Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor. *Obstet Gynecol Surv.* janv 1989;44(1):1-18.
65. Liu DY, Baker HW. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril.* sept 1992;58(3):465-83.
66. Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, Swanson RJ, Lombard CJ, Acosta AA. Usefulness of sperm penetration assay in fertility predictions. *Arch Androl.* 1989;23(3):207-12.

67. Oehninger S, Acosta AA, Morshedi M, Veeck L, Swanson RJ, Simmons K, et al. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril.* août 1988;50(2):283-7.
68. Mahadevan MM, Trounson AO. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* sept 1984;42(3):400-5.
69. Protection des gamètes et de l'embryon contre le stress oxydatif en procréation médicale assistée – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. [cité 2 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/protection-des-gametes-et-de-lembrion-contre-le-stress-oxydatif-en-procreation-medecale-assistee/>
70. Coetzee K. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 1 janv 1998;4(1):73-82.
71. Haugen TB, Egeland T, Magnus Ø. Semen Parameters in Norwegian Fertile Men. *J Androl.* 2006;27(1):66-71.
72. Harris AL, Vanegas JC, Hariton E, Bortoletto P, Palmor M, Humphries LA, et al. Semen parameters on the day of oocyte retrieval predict low fertilization during conventional insemination IVF cycles. *J Assist Reprod Genet.* févr 2019;36(2):291-8.
73. Yang YS, Chen SU, Ho HN, Chen HF, Chao KH, Lin HR, et al. Correlation between sperm morphology using strict criteria in original semen and swim-up inseminate and human in vitro fertilization. *Arch Androl.* avr 1995;34(2):105-13.
74. Ron-el R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril.* févr 1991;55(2):338-44.
75. Kihaila PE, Misumi J, Hirotsuru K, Kumasako Y, Kisanga RE, Utsunomiya T. Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle. *Int J Androl.* févr 2003;26(1):57-62.
76. Kohn TP, Kohn JR, Lamb DJ. Role of Sperm Morphology in Deciding Between Various Assisted Reproduction Technologies. *Eur Urol Focus.* 1 mai 2018;4(3):311-3.
77. Lundin K. L'impact de l'analyse de la morphologie du sperme sur le résultat de la FIV. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* 1 déc 2007;36:69-73.
78. Gatimel N, Mansoux L, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Continued existence of significant disparities in the technical practices of sperm morphology assessment and the clinical implications: results of a French questionnaire. *Fertil Steril.* févr 2017;107(2):365-372.e3.
79. Scott RT, Oehninger SC, Menkveld R, Veeck LL, Acosta AA. Critical assessment of sperm morphology before and after double wash swim-up preparation for in vitro fertilization. *Arch Androl.* 1989;23(2):125-9.

80. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, et al. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril.* avr 1998;69(4):722-6.
81. Ozelci R, Yilmaz S, Dilbaz B, Akpınar F, Akdag Cırık D, Dilbaz S, et al. Seasonal variation of human sperm cells among 4,422 semen samples: A retrospective study in Turkey. *Syst Biol Reprod Med.* déc 2016;62(6):379-86.
82. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Har-Vardi I. Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *Am J Obstet Gynecol.* mai 2013;208(5):406.e1-6.
83. Xie M, Utzinger KS, Blickenstorfer K, Leeners B. Diurnal and seasonal changes in semen quality of men in subfertile partnerships. *Chronobiol Int.* sept 2018;35(10):1375-84.
84. Terriou P, Giorgetti C, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Teratozoospermia influences fertilization rate in vitro but not embryo quality. *Hum Reprod Oxf Engl.* mai 1997;12(5):1069-72.
85. Berger DS, AbdelHafez F, Russell H, Goldfarb J, Desai N. Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 22 mars 2011;9:37.
86. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril.* nov 1993;60(5):888-92.
87. Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online.* mai 2003;6(3):310-7.
88. Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le Roy C, Gueganic N, et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online.* févr 2011;22(2):148-54.
89. Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, Sertyel S, et al. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reprod Biomed Online.* juin 2006;12(6):752-61.
90. Ombelet W, Fourie FL, Vandeput H, Bosmans E, Cox A, Janssen M, et al. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 1994;9(8):1479-84.
91. Kobayashi T, Jinno M, Sugimura K, Nozawa S, Sugiyama T, Iida E. Sperm morphological assessment based on strict criteria and in-vitro fertilization outcome. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 1991;6(7):983-6.
92. Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, Muller CH, Walsh TJ. 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.* 1 mars 2011;95(3):1141-5.

93. Punjabi U, Wyns C, Mahmoud A, Vernelen K, China B, Verheyen G. Fifteen years of Belgian experience with external quality assessment of semen analysis. *Andrology*. nov 2016;4(6):1084-93.
94. Filimberti E, Degl'Innocenti S, Borsotti M, Quercioli M, Piomboni P, Natali I, et al. High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology*. mai 2013;1(3):401-7.
95. Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl*. oct 2002;25(5):306-11.
96. Keel BA, Quinn P, Schmidt CF, Serafy NT, Serafy NT, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod Oxf Engl*. mars 2000;15(3):680-6.
97. Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, 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*. déc 1997;20(6):367-72.
98. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*. févr 1997;29(1):1-7.
99. Natali I, Muratori M, Sarli V, Vannuccini M, Cipriani S, Niccoli L, et al. Scoring human sperm morphology using Testsimplerts and Diff-Quik slides. *Fertil Steril*. avr 2013;99(5):1227-1232.e2.
100. Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod Oxf Engl*. juin 2010;25(6):1369-82.
101. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl*. avr 2001;22(2):192-205.
102. Barroso G, Mercan R, Ozgur K, Morshedi M, Kolm P, Coetzee 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 Oxf Engl*. août 1999;14(8):2036-40.
103. Wang Y, Yang J, Jia Y, Xiong C, Meng T, Guan H, et al. Variability in the morphologic assessment of human sperm: use of the strict criteria recommended by the World Health Organization in 2010. *Fertil Steril*. avr 2014;101(4):945-9.
104. Eustache F, Auger J. Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod Oxf Engl*. mai 2003;18(5):1018-22.
105. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Maes M, Punjabi U, et al. Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl*. oct 1998;41(2):103-14.
106. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*. mai 1999;31(3):163-8.

107. Barratt CL, Naeeni M, Clements S, Cooke ID. Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 1995;10(3):587-93.
108. Menkveld R, Kruger TF. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl.* déc 1995;18 Suppl 2:36-42.
109. Franken DR, Kruger TF. Lessons learned from a sperm morphology quality control programme. *Andrologia.* déc 2006;38(6):225-9.
110. Yao K-S, Zhang X-Z, Wu Y. Assessment of sperm morphology without quality control may be meaningless for clinicians. *Asian J Androl.* juill 2010;12(4):607-8.
111. Setti AS, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A, Aoki T, Borges E. Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reprod Biomed Online.* oct 2013;27(4):338-52.
112. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1 nov 1999;284(6):696-704.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Elise ALLEYSSON

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : **21911135**


N° Thèse : **17**

Nom et Prénom : **ALLEYSSON Elise**

Sujet : **Impact de la morphologie des spermatozoïdes sur la fécondation en FIV classique :
expérience au CHRU de Tours**

Tours, le : **22/07/2022**

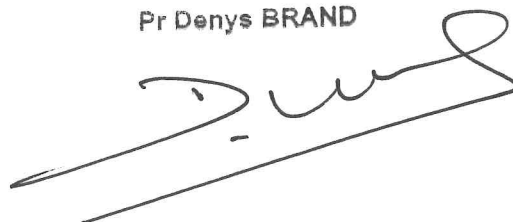
Le(s) Directeur(s) de Thèse :


Pr Fabrice GUYOT
Médecine et Biologie de la Reproduction
Centre Olympe de Goerges
CHRU de Tours - Hôpital de la Motte
37044 TOURS CEDEX 02 FRANCE

**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



ALLEYSSON Elise

N° 17

TITRE DE LA THÈSE

Impact de la morphologie des spermatozoïdes sur la fécondation en FIV classique :
expérience au CHRU de Tours

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Introduction : Le rôle de la morphologie des spermatozoïdes dans la fécondation fait encore l'objet d'un débat dans la littérature. L'objectif de ce travail est de déterminer dans quelle mesure la morphologie des spermatozoïdes influence les résultats de fécondation en FIV classique.

Matériel et méthodes : Cette étude rétrospective (2017 et 2020) portant sur 582 cycles de rang 1 en FIV classique au CHRU de Tours a comparé le taux de fécondation (totale et normale), le taux de polyspermie, la fréquence des échecs et pauci-fécondations, la qualité embryonnaire à J2 et le devenir clinique des embryons (grossesses, fausses-couches, naissances, naissances multiples, implantation) entre deux groupes de morphologie : « tératozoospermie » (<4% de formes typiques) et « contrôle » (≥4% de formes typiques). Elle a évalué également la corrélation entre le taux de formes typiques et le taux de fécondation ainsi que les performances analytiques de la morphologie comme marqueur prédictif de la réussite de la fécondation.

Résultats : Dans le groupe « tératozoospermie », le taux de fécondation (totale et normale), le taux de polyspermie et le nombre d'embryons obtenus à J2 est significativement plus faible tandis que le taux d'échec de fécondation est plus important que dans le groupe « contrôle » ($p < 0,05$). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la qualité embryonnaire à J2 ou pour le devenir clinique des embryons. Par contre, il existe une faible corrélation entre le taux de formes typiques et le taux de fécondation ($r^2 = 0,035$; $p < 0,0001$). Avec un seuil optimal à 3%, les performances analytiques sont les suivantes : sensibilité = 75% ; spécificité = 48% ; valeur prédictive positive = 15% ; valeur prédictive négative = 44%.

Discussion : La morphologie des spermatozoïdes a un impact sur la fécondation mais sa valeur prédictive en tant que paramètre isolé est limitée donc insuffisante, notamment à cause de la variabilité de son évaluation. La morphologie ne semble pas jouer de rôle majeur dans les étapes suivant la fécondation.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Fécondation, Fécondation In Vitro, Morphologie, Spermatozoïdes, Tératozoospermie.

JURY

PRÉSIDENTE : Pr Claire Pouplard (pharmacien) - Professeur des Universités - Praticien hospitalier et Chef de service - Service d'Hématologie Hémostase - CHRU Tours

MEMBRES :

Dr Cynthia Frapsauce (pharmacien) - Praticien hospitalier - Service de Médecine et Biologie de la Reproduction - CHRU Tours

Dr Laurent Corcia (pharmacien) - Praticien hospitalier et Responsable unité de Biologie - Service de Médecine et Biologie de la reproduction - CHR Orléans

Directeur de thèse : Pr Fabrice GUERIF (pharmacien) - Professeur des Universités - Praticien hospitalier et Chef de service - Service de Médecine et Biologie de la Reproduction - CHRU Tours

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 27 avril 2022 - Faculté de Pharmacie de Tours