

Cette étude a porté sur la mise en évidence des anomalies biochimiques, cytologiques et ultra-structurales des spermatozoïdes des hommes stériles bénéficiant d'une IMSI, pratiquée au niveau de la clinique de la procréation médicalement assistée **EL- WALIDAYN** de Sidi Yahia Alger pendant une durée de trois mois, notre étude tente d'analyser le recours à la procréation médicalement assistée (PMA) dans une clinique de PMA Algérienne, faisant face à la stérilité masculine par l'évaluation de cette infertilité et la préparation des patient à la PMA.

II.1 Matériel

II.1.1 Patients

Les couples viennent de toutes les régions d'Algérie. Certains ont recours pour la première fois à cette technique. D'autres arrivent après un échec thérapeutique, consulter de nouveau les médecins de ce centre. Ces personnes appartiennent à des catégories sociales différentes.

A travers cette étude nous avons tenu compte des différents paramètres de l'anamnèse qui englobe : âge, profession, habitat, type de stérilité, durée d'abstinence, antécédents personnels et mode de vie (tabac, chique, alcool). Les couples consultent le centre à partir d'une double orientation ; la première est celle du médecin traitant alors que la deuxième est liée à l'information diffusée par les médias, le réseau familial et le voisinage.

II.1.2.Echantillonnage

La partie expérimentale repose sur différents prélèvements : sanguins et spermatiques afin de déterminer le degré et le type de stérilité.

A. Prélèvements spermatiques

L'étude repose sur 30 prélèvements spermatiques, ces prélèvements ont été analysés selon les critères définis par l'OMS permettant la détermination de la concentration, mobilité et morphologie des spermatozoïdes.

B. Prélèvements Sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés que pour deux patients avérés azoospermiques afin de déterminer le type de stérilité grâce au dosage de la gonadotrophine FSH et de la testostérone.

II.1.3 Matériel non biologique :

Le matériel non biologique est représenté par : la verrerie, les appareillages, les milieux de culture, les réactifs ainsi que les antibiotiques sous forme de disque et les colorants (Voir annexe 1).

II.2. Méthodologie d'étude**II.2.1. Anamnèse**

L'anamnèse est l'ensemble des renseignements que l'on obtient auprès du patient, c'est une étape fondamentale du diagnostic car celle-ci fournit la moitié des éléments d'orientation lorsqu'elle est conduite avec attention.

Pour fournir une anamnèse il faut demander pour chacun des membres du couple:

- L'âge : car la baisse de la fécondité intervient dès 35 ans chez la femme et de façon plus tardive mais néanmoins réelle chez l'homme,
- la profession en prenant en considération l'exposition à la chaleur, aux xénobiotique..., et la position spatiale.
- les antécédents familiaux et les antécédents personnels médicaux, à la recherche d'une maladie chronique (diabète par exemple) ou d'un antécédent de maladie infectieuse traitée (tuberculose ou oreillons par exemple)
- Le mode de vie des patients (tabac, alcool et autres drogues).

II.2.2 Spermogramme

Le spermogramme est l'examen clé qui permet une appréciation quantitative et qualitative du sperme. Il permet une double analyse; évaluation de l'activité sécrétoire à travers la mesure du volume, du pH et de la viscosité et la production gamétique à travers la numération, mobilité et la vitalité du sperme.

A) Condition du recueil du sperme

Le patient reçoit un certain nombre d'informations et d'instructions en ce qui concerne les conditions de recueil de son sperme de manière claire pour assurer le bon déroulement et la précision de l'analyse par la suite à savoir :

Une abstinence sexuelle de 03 jours pour éviter le recueil d'un volume diminué d'éjaculat due a un délai d'abstinence plus court ou un volume contenant un dédoublement de numération avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts due a une abstinence trop longue.

Le sujet doit être informé sur l'importance de la totalité de l'éjaculat, car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat.

Le recueil se fait sur place, dans une chambre au laboratoire, destinée au prélèvement afin de limiter les risques de perte d'une partie de l'éjaculat. Le recueil s'effectue par masturbation dans un réceptacle, à usage unique, stérile avec couvercle.

B) Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet d'évaluer un certain nombre de paramètres selon le protocole suivant :

➤ **Liquéfaction**

Dès sa réception, l'échantillon de sperme est déposé dans une étuve à 37° C pendant 30 minutes pour assurer sa liquéfaction. Au terme de celle-ci, l'examen est réalisé. Une liquéfaction prolongée doit être notée si l'éjaculat ne se liquéfie pas après ce délai

➤ **Couleur**

L'observation de la couleur est faite à l'œil nu, Un sperme normal a un aspect homogène gris opalescent, et peut prendre une couleur brune en cas hémospemie ou jaunâtre qui témoigne une probable infection.

➤ **Odeur**

On utilise notre propre odorat pour déterminer ce paramètre. A l'état normal le sperme a une odeur caractéristique chlorée, alors qu'en cas d'infection l'odeur du sperme peut devenir fétide.

➤ **viscosité**

Elle est évaluée en plongeant une pipette pasteur dans le sperme, en notant la façon dont le sperme s'écoule. Un sperme d'une viscosité normale, s'écoule sous forme de gouttes bien séparées alors qu'un sperme de forte viscosité forme des filaments de plus de 2 cm entre chaque goutte.

➤ **Volume**

Il est estimé à l'aide d'une éprouvette graduée. Un volume normal se situe entre 2 à 6ml, au dessous de 2 ml on note une hypospermie et dessus de 6 ml on parle d'une hyperspermie. En cas d'absence d'éjaculat on note une aspermie

➤ **pH**

Une goutte de sperme est déposée sur une bandelette de papier pH, la couleur de la zone imprégnée est comparée à une échelle de lecture. Le pH est mesuré dans l'heure qui suit l'éjaculat, il est normalement compris entre 7,2 et 8.

C) Examen microscopique

L'analyse microscopique est réalisée, après préparation des échantillons en fonction du paramètre à apprécier, grâce à une observation sous un microscope photonique de type Olympus cx41, aux grossissements 40x.

➤ Vitalité (pourcentage de spermatozoïdes vivants)

La méthode d'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est basée sur l'exclusion d'un colorant vital par les spermatozoïdes vivants, à l'opposé le colorant pénètre les spermatozoïdes morts à membrane altérée.

Elle est évaluée par des colorants comme l'éosine-nigrosine; une goutte de sperme est ajoutée à 2 gouttes d'éosine à 1% et après 30 sec, on ajoute 3 gouttes de nigrosine à 10%. Un frottis est réalisé, on compte 100 spermatozoïdes sur différents champs du frottis et on évalue le pourcentage de ceux qui sont morts " roses " ou vivants " blancs (Figure 13).

- ❖ **Réalisation d'un frottis :** On dépose 10 µl de sperme bien homogénéisée à l'extrémité d'une lame, puis on étale cette goutte en s'aidant d'une autre lame inclinée à 45° par rapport à la première on obtient dans ces conditions un frottis peu épais limitant de possible artefacts de coloration du fond de la préparation et offrant un contraste optimal des spermatozoïdes après coloration. L'éosine-nigrosine est pré- a l'emploi.



Figure 13: Vitalité des spermatozoïdes vue au microscope photonique G100x après coloration eosine-negrosine (Photo originale).

➤ **Mobilité des spermatozoïdes**

Elle est appréciée à l'examen direct sur une goutte de sperme (0,1 ml) entre lame et lamelle (22 x 22 mm), le poids de la lamelle étale l'échantillon permettant une observation optimale à 37°C au faible grossissement, puis au fort grossissement sur 5 à 10 champs choisis au hasard.

La durée et l'intensité de la mobilité sont immédiatement déterminées après dilution à intervalle de 5 min jusqu'à l'immobilisation totale des spermatozoïdes. Cette mobilité est estimée selon l'OMS, en 4 indices d'intensité :

- ❖ **Grade A** (rapide progressive), spermatozoïdes nagent et avancent rapidement en ligne droite mouvement fléchissant supérieur à 25µm/s à 370c.
- ❖ **Grade B** (lente et progressive), des spermatozoïdes nagent en avant, mais soit en une ligne courbe ou tordu, ou lentement (motilité linéaire ou non linéaire).
- ❖ **Grade C** (non progressive), spermatozoïdes déplacent leurs queues, mais ne pas aller de l'avant (motilité local uniquement).
- ❖ **Grade D** (immobiles), spermatozoïdes ne se déplacent pas du tout.

➤ La numération

Elle est appréciée par comptage des spermatozoïdes dans un hémocytomètre (cellules de MAKLER ou autre), après immobilisation par congélation des spermatozoïdes on dépose, au moyen d'une pipette pasteur stérilisée au camping gaz, une goutte de sperme sur la cellule de makler.

- Compter les spermatozoïdes sur 10 carreaux, on obtient ainsi directement la concentration en millions/ ml.
- Calculer la concentration sur 1 éjaculat en multipliant la numération par le volume.
- Compter les cellules rondes sur l'ensemble de la makler : on obtient ainsi directement les résultats en centaine de milliers/ml.
- Confirmer la qualité de la progression : nulle, faible, moyenne, bonne.
- Noter la présence, d'agglutinats spontanés, cet examen est effectué en deux temps : à la 1^{ère} heure et à la 4^{ème} heure dont le but de calculer le pourcentage de spermatozoïde mobile.

❖ **Calcul des cellules rondes (spermatique) :** le principe de la détermination de la concentration en cellules rondes est le même que celui de la concentration des spermatozoïdes. Nous avons compté toutes les cellules autres que les spermatozoïdes qui ayant sédimenté dans la chambre de la cellule de MAKLER avec le même principe de comptage et de calcul pour déterminer la concentration en million /ml. Ce compte est fait dans le même temps que celui des spermatozoïdes.

❖ Calcul d'Agglutination :

Est définie par l'attachement de spermatozoïdes mobiles entre eux, l'agglutination est évaluée sur au moins 10 champs pris au hasard et le degré d'agglutination est notée de 1-3 croix, ainsi que le type d'agglutination soit par la tête, la pièce intermédiaire ou le flagelle ou de manière mixte.

II.2.3 Spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'étude morphologique des spermatozoïdes. Il n'est pas réalisé en pratique courante mais permet d'explorer une fertilité anormale.

L'analyse morphologique des spermatozoïdes " spermocytogramme " est effectuée sur un frottis après fixation et coloré par la coloration de Shorr, (voir annexe) une classification à entrées multiples est nécessaire pour tenir compte de l'existence de plusieurs anomalies sur le même spermatozoïde. La classification française de David répartit les anomalies en 15

groupes différents dont 7 anomalies de la tête, 3 anomalies de la pièce intermédiaire et 5 anomalies flagellaires.

La lecture des lames colorées est faite à l'objectif x 100 à huile d'immersion. La lecture a été faite en queue de frottis sur des champs microscopiques jointifs avec balayage de la lame et des champs si l'échantillon est très concentré, on ne doit pas lire sur un seul champ.

II.2.4 Spermoculture

- **Examen direct** : L'examen direct est fait à l'état frais du sperme entre lame et lamelle pour viser la présence de levures ou de parasites notamment le *Trichomonas Vaginalis*, la coloration de gram permet la recherche de l'existence ou non de diplocoques a gram négatif *Neisseria Gonorrhoeae*, de levure de cocci à gram positif de bacilles à gram négatif.
- **Culture** : Après dilution au un 10^{ème} du sperme dans le sérum physiologique, le prélèvement et ensemencé sur des différents milieux de culture : gélose nutritive, gélose au sang, chapmane et hektoein en milieu aérobie et anaérobies et une gélose Sabouraud pour la recherche de levures (candida).

L'identification des germes se fait sur les propriétés métaboliques (fermentation du glucose hydrolyse de l'arginine ou de l'urée). Dans les cultures monomicrobiennes le germe est identifié et un antibiogramme est réalisé si la concentration est sup ou égale a 10³ UFC/ml.

Une spermoculture négative n'élimine pas une infection surtout s'il y a existence d'une leucocytose.

II.2.5 Dosage hormonal

Les prises des échantillons sanguins ont été effectuées pour les dosages hormonaux. Les prélèvements ont été réalisés avec des tubes héparines de 5ml. Les prélèvements de sang sont centrifugés à 5000 tours pendant 02 minutes. Les plasmas sont ensuite récupérés afin de les dosé, le dosage de testostérone, le FSH, et le LH se fait par la même technique

II.2.6 Biochimie du sperme

Ne se fait qu'à l'étranger pour cela nous n'avons pas pu le réaliser.

II.2.7 Protocole de l'IMSI

L'IMSI ne représente pas une nouvelle technique d'Assistance Médicale à la Procréation mais c'est une évolution de la technique ICSI classique (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) où le spermatozoïde injecté est choisi préalablement sous un microscope inversé à un très fort

grossissement (x6600 au lieu de x400 dans l'ICSI classique). Des études récentes ont montré qu'à de plus forts grossissements (x6600) on pouvait observer des anomalies plus subtiles de la tête du spermatozoïde, notamment la présence de vacuoles qui pourraient avoir une influence négative sur la qualité du gamète et sur la réussite de la technique.

A) Préparation et sélection des spermatozoïdes

Le sperme est recueilli et préparé au laboratoire le jour de la ponction ovarienne. Il peut être nécessaire de demander un second recueil. Dans des situations particulières, des spermatozoïdes préalablement congelés sont utilisés. Les paillettes sont décongelées le jour de la ponction folliculaire afin de récupérer des spermatozoïdes mobiles.

La préparation des spermatozoïdes se fait selon la technique de sélection par gradient de densité :

- Dans un tube stérile de 15 ml à fond conique distribuer au moyen d'une pipette souple à usage unique 1,5 ml de solution de Puresperm à 90 % (ou 80%).
- Puis déposer délicatement, sur la couche précédente 1,5 ml de Puresperm à 45 %. (Ou 40%)
- Sur la deuxième couche, déposer délicatement 1,5 à 2 ml de sperme liquéfié et homogénéisé. Fermer le tube avec son bouchon et centrifuger pendant 15 à 20 minutes à 2800 tours.
- Une fois la centrifugeuse arrêtée, éliminer par aspiration les 2 couches supérieures ainsi que la partie haute de la couche du fond (Puresperm 90%).
- Laver le culot avec l'EBSS on ajoute 6ml et centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 2800 tours
- Éliminer le milieu de culture surnageant et diluer le culot avec 0.3ml d'EBSS ou effectuer un swim-up selon les besoins.

Les spermatozoïdes sont donc prêts à la sélection sous le microscope inversé, on les dépose dans une boîte spéciale en plastique remplie par des différents milieux (**voir annexe 2**).

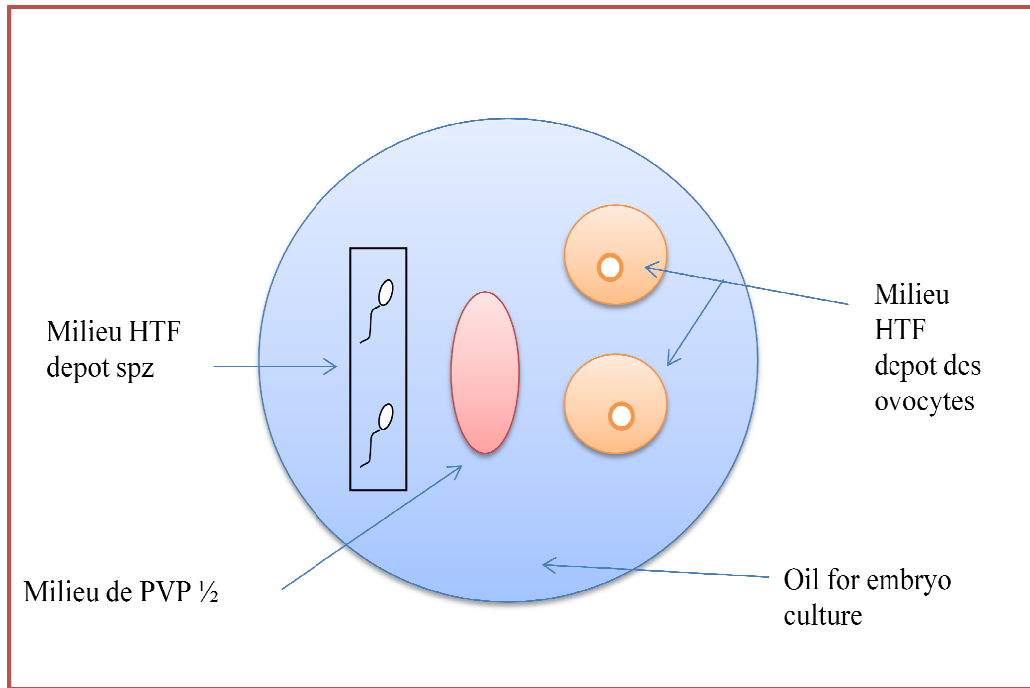


Figure 14: Boite d'IMSI

Après la sélection, se fait la micro injection des ovocytes qui sont déjà préparés.

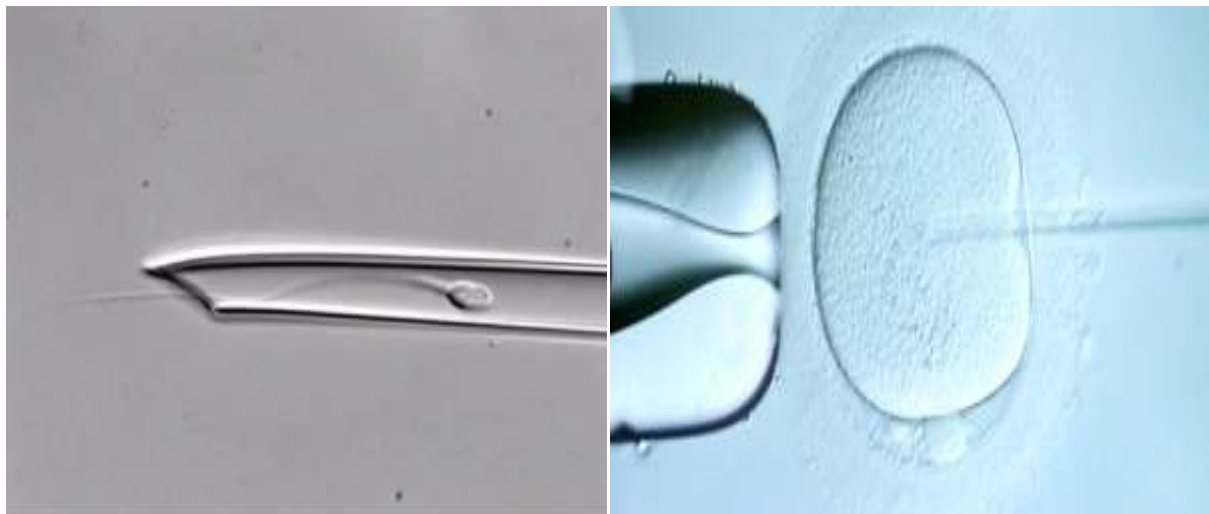


Photo 15 : Micro injection ovocyte- spermatozoïde.