

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahlab de Blida I  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de biologie des populations organiques  
Option : physiologie et reproduction animal**



**Mémoire de fin de cycle En vue de l'obtention  
Du diplôme MASTER 2**

***Intérêt des paramètres cinétiques  
spermatiques (CASA) liée à l'hyperactivation  
des spermatozoïdes après capacitation in  
vitro***

**Présenté par : ZEKRAOUI NAIMA**

***Soutenu publiquement le 29/09/2020 devant le jury compose de :***

<b><i>President :</i></b>	<b><i>Mr.BESSAAD M.A</i></b>	<b><i>Maitre de conférences B</i></b>	<b><i>USDB</i></b>
<b><i>Examinatrice :</i></b>	<b><i>M. KANANE.A</i></b>	<b><i>Maitre de conférences B</i></b>	<b><i>USDB</i></b>
<b><i>Promotrice</i></b>	<b><i>M.BENAZOUZ. F</i></b>	<b><i>Maitre de conférences A</i></b>	<b><i>USDB</i></b>
<b><i>Co- promoter</i></b>	<b><i>Dr ERICH .S</i></b>	<b><i>Spécialiste en gynéco- obstétrique</i></b>	<b><i>CHU DE BLIDA</i></b>

***Année universitaires 2019-2020***

# *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à vous remercier mon Dieu le tout puissant pour tous ces dons accumulés tout au*

*Long de notre vie et de je avoir permis, aujourd'hui, la réalisation de mon*

*Projet de master, encore un rêve qui se réalise grâce au Dieu.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Mr .BESSAAD M.A**, d'avoir accepté de*

*Président le jury.*

*Je remercie, également **M. KANANE.A**, d'avoir accepté*

*D'examiner mon travail.*

*Je tiens à exprimer mes sincères considérations et remerciements à ma*

*Promotrice **M.BENAZOUZ. F**, pour ses précieux conseils, son amitié, son aide, son*

*Orientation, sa gentillesse et sa générosité .Qu'il veuille bien agréer notre*

*Profonde et éternelle gratitude.*

*Je tiens à présenter nos remerciements à mon Co-promoteur **Dr ERICH.S***

*Pour accepter d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur*

*Scientifique et pragmatisme.*

*Je tiens également à remercier **Dalila** pour ses encouragements et son amitié envers moi.*

*Je tiens également à remercier **M.DOUKARA.A et M.KAID** Qui ont veillé au bon*

*Déroulement de mon étude en Master.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*À mes très chers parents qui m'ont fourni au quotidien un soutien  
Et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma  
Gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous*

*Garde pour nous.*

*À mes sœurs et mon frère*

*Que dieu vous protège*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet*

*Soit possible, je vous dis merci.*

# Sommaire

Introduction.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique .....	
I.1 Appareil génital masculin.....	4
I.1.1 phases de Spermatogenèse .....	5
I.1.1.1 phase proliférative .....	5
I.1.1.2 phase méiotique.....	6
I.1.1.3 spermiogenèse.....	6
I.1.2 spermiation.....	7
I.1.3 Structure générale du spermatozoïde.....	7
I.1.4 Modifications moléculaires du spermatozoïde.....	10
I.1.4.1 Au niveau de l'épididyme .....	10
I.1.4.2 Au des voies génitales féminines.....	10
I.1.4.3 Capacitation.....	11
I.1.2.4 Hyperactivation du mouvement flagellaire.....	13
I.1.2.5 Reconnaissance et la liaison à la zone pellucide ovocytaire.....	14
I.1.2.6 La Réaction acrosomique (RA).....	15
I.1.2.7 Fécondation.....	15
I.2 Analyse du sperme .....	16
I.2.1 Spermogramme.....	16
I.2.2 Spermocytogramme .....	16
I.2.3 L'analyse informatique du Sperme (CASA) .....	16
I.3 Procréation Médicale Assisté(PMA) .....	20
I.3.1 Fécondation in vitro classique (FIVETE).....	20
I.3.2 Fécondation assisté(ICS).....	20
I.3.3 Recueil ovocytaire au cours du cycle spontané ou induit.....	22
I.3.4 Ponction folliculaire .....	22
I.3.5 Sélection et capacitation des spermatozoïdes.....	22
I.3.6 Traitement des ovocytes.....	24

I.3.7 Observation des embryons.....	24
I.3.8Transfert embryonnaire.....	24
Partie II : Etude Analytique synthèse d'articles scientifiques .....	25
II.1. Matériels et les méthodes:.....	27
II.1.1 population étudiée.....	27
II.2.2 Sperme frais.....	28
II.2.3 Capacitat.....	28
II.1.4 analyse informatique du Sperme (CASA).....	28
Partie III : discussion.....	
Discussion.....	30
Conclusion.....	37
Références bibliographiques.....	38

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie de l'appareil génital masculin ( <b>Hamilton 2019</b> ).....	4
<b>F6figure2</b> : La spermatogenèse ( <b>Hamilton 2019</b> ).....	5
<b>Figure 3</b> : Schéma d'un spermatozoïde humain ( <b>Hamilton 2019</b> ).....	9
<b>Figure 4</b> : Résumé biochimique de la capacitation. ( <b>Dessin: c vetopsy .Fr</b> ).....	13
<b>Figure 5</b> :Trajectoires de spermatozoïdes capacités mobiles non hyperactivés et hyperactivés ( <b>Mortimer et al. 2000</b> ).....	14
<b>Figure 6</b> : schéma représente les étapes de la fécondation. ( <b>Kawa et al.2010</b> ) .....	16
<b>Figure 7</b> : ( <b>CASA: Computerzed Assisted Sperm Analysis</b> ) ( <b>Mortimer2000, OMS 2010</b> ).....	18
<b>Figure 8</b> : Lames BIRR Biosciences 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B ( <b>Hamilton 2019</b> ).....	18
<b>Figure 9</b> : Lame Leja® 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B ( <b>Hamilton 2019</b> ).....	18
<b>Figure 10</b> : terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA ( <b>manuel de l'OMS 2010</b> ).....	19
<b>Figure 11</b> : schéma de fécondation in vitro (ICSI).....	21

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Méthodes de sélection des spermatozoïdes .....	<b>24</b>
---	-----------

## Liste des Abréviations

**CASA:** Computerised Assisted Sperm Analysis

**M.C:** Milieu Capacitant

**AMP :** Assistance Médicale à la Procréation

**FIV :** Fécondation In Vitro

**TMS :** Test de Migration –Survie

**ICSI :** Injection Intra Cytoplasmique De Sperme

**IAC :** Insémination Artificielle avec sperme de Conjoint

**CHU :** Centre Hospitalier Universitaire

**RA :** Réaction Acrosomique

**OATS :** Oligo AsthénO Térato Spermie

**FIVETE:** Fécondation In Vitro Et Transfert Embryonnaire

**VCL:** Velocity Curvilinear ou vitesse curvilinéaire

**VSL:** Velocity Straight Line ou vitesse de progression linéaire

**VAP:** Velocity Average Pathway

**ALH:** Amplitude of Lateral Head displacemen ou amplitude de déplacement lateral de la tête

**BCF:** Beat Cross Frequency

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**Ca+:** Calcium

**HCO<sub>3</sub>:** Bicarbonate

**PR :** Mobilité Progressive

**NP :** Non progressif

**IM :** Spermatozoïdes immoles

**ERO :** Espèces Réactives d'Oxygène

**TF :** Taux de Fécondation

**PVP :** poly-vinyl-pyrrolidone

## Résumé

La présente étude a pour intérêt d'étudier de manière (N =40) objective, à l'aide d'une analyse informatisé (Computerised-Assisted-Sperm-Analysis : **CASA**) des certains paramètres cinétiques spermatiques liée à l'hyper activation des spermatozoïdes humains après la capacitation in vitro ainsi dans le but d'utiliser ce système **CASA** en routine dans le laboratoire d'aide médicale à la procréation (**AMP**).

Il s'agit d'une étude prospective, Les prélèvements spermatiques proviennent des hommes inclus dans un programme **d'AMP (FIV) ou(ICSI)**, La capacitation des spermatozoïdes est possible in vitro lorsqu'ils sont incubés dans un milieu de culture qu'on appelle « milieu capacitant » ou par lavage- centrifugation

La capacitation du spermatozoïde au cours de laquelle le spermatozoïde subit des changements protéiques et Lipidiques et devient hyperactive. Avant leur capacitation, les spermatozoïdes présentent une Mobilité linéaire.

Après la capacitation, les spermatozoïdes acquièrent une mobilité beaucoup moins linéaire avec des Mouvements de flagelles plus amples. Cette mobilité facilite la traversée de la zone pellucide particulièrement Élastique chez les mammifères.

Plusieurs études ont démontré que la mesure les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes mobiles progressifs par les systèmes **CASA** sont liés de manière significative aux taux de fécondation in vitro et in vivo.

En effet, il a été montré que la **VCL** et la **VSL**, le pourcentage de Spermatozoïdes progressifs rapides **l'ALH** et la **VAP** sont les paramètres qui peuvent prédire le succès ou non de la fécondation in vitro.

**Les Mots Clés : Spermatozoïde, Capacitation, Milieu Capacitant, CASA, Spermogramme, AMP**

## ملخص :

الفائدة من هذه الدراسة هي الدراسة بطريقة موضوعية ( $N = 40$ ) ، باستخدام التحليل المحوسب (بمساعدة الحاسوب ، تحليل الحيوانات المنوية (CASA): لبعض المعلمات الحركية للحيوانات المنوية المرتبطة بالتنشيط المفرط للحيوانات المنوية. الحيوانات المنوية البشرية بعد تكثيفها في المختبر أيضاً لغرض استخدام نظام CASA هذا بشكل روتيني في مختبر الإنجاب بمساعدة طبية.(AMP)

هذه دراسة مستقبلية ، عينات الحيوانات المنوية مأخوذة من رجال مدرجين في برنامج (AMP (IVF أو (ICSI) ، وقدرة الحيوانات المنوية ممكنة في المختبر عندما يتم تحضينها في وسط زراعي يطلق المرء على "وسط مكثف" أو عن طريق الطرد المركزي للغسيل

تكثيف الحيوانات المنوية التي تخضع خلالها الحيوانات المنوية لتغيرات البروتين والدهون وتصبح مفرطة النشاط. قبل التكاثر ، تظهر الحيوانات المنوية حركة خطية.

بعد السعة ، يكتسب الحيوان المنوي حركة خطية أقل بكثير مع حركات سوط أوسع. يسهل هذا التنقل عبور المنطقة الشفافة المرنة بشكل خاص في الثدييات.

أظهرت العديد من الدراسات أن قياس خصائص الحركة التقدمية للحيوانات المنوية بواسطة أنظمة CASA يرتبط بشكل كبير بمعدلات الإخصاب في المختبر والحي.

في الواقع ، لقد ثبت أن VCL و VSL ، والنسبة المئوية للحيوانات المنوية التقدمية السريعة ، و ALH و VAP هي العوامل التي يمكن أن تتنبأ بنجاح أو عدم نجاح الإخصاب في المختبر.

الكلمات المفتاحية: الحيوانات المنوية ، السعة ، الوسيط المسبب ، CASA ، مخطط الحيوانات المنوية ، AMP

## Summary

The present study has for interest to study in an objective way (N = 40), using a computerized analysis (Computerized-Assisted-Sperm-Analysis: CASA) of certain spermatid kinetic parameters linked to the hyper activation of human sperm after capacitation in vitro as well for the purpose of using this CASA system routinely in the medically assisted reproduction laboratory (AMP).

This is a prospective study, The sperm samples come from men included in an AMP (IVF) or (ICSI) program, The capacitation of spermatozoa is possible in vitro when they are incubated in a culture medium that 'one calls "capacitating medium" or by washing-centrifugation

The capacitation of the sperm during which the sperm undergoes protein and lipid changes and becomes overactive. Before capacitation, the spermatozoa exhibit linear mobility.

After capacitation, the sperm acquire much less linear mobility with larger flagella movements. This mobility facilitates the crossing of the zona pellucida which is particularly elastic in mammals.

Several studies have demonstrated that measurement of progressive motile sperm movement characteristics by CASA systems are significantly related to in vitro and in vivo fertilization rates.

Indeed, it has been shown that the VCL and the VSL, the percentage of rapid progressive spermatozoa, the ALH and the VAP are the parameters which can predict the success or not of the in vitro fertilization.

Keywords: Sperm, Capacitation, Capacitating medium, CASA, Spermogram, AMP

# Introduction

---

## Introduction

La fécondation humaine implique une succession d'étapes aboutissant à l'activation de l'ovocyte et à l'initiation de l'embryogenèse. Le chemin jusqu'à l'ovocyte est long et il s'impose donc aux spermatozoïdes, d'être mobiles et fécondants. Au terme d'un parcours de près de 3 000 fois leur taille, les spermatozoïdes, ayant franchi le col et les voies génitales féminines, atteignent finalement l'ovocyte. Le spermatozoïde, alors capacite, doit pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire, reconnaître et se lier à la zone pellucide de l'ovocyte, réaliser sa réaction acrosomique et forer la zone pellucide. Parvenu dans l'espace perivitellin, il s'arrimera à la membrane plasmique ovocytaire. Les membranes spermatiques et ovocytaire fusionneront et le contenu du spermatozoïde s'intégrera alors au cytoplasme ovocytaire. L'ADN très condensé contenu dans la tête spermatique devra être décondensé pour former le pronucléus male.

On peut estimer qu'à l'heure actuelle, un facteur causal masculin est impliqué chez la moitié des couples souffrant d'infertilité, et que cela concerne environ un homme sur 20. Pour évaluer les capacités migratoires et fécondantes du spermatozoïde (**yanigimach, 1988**) le biologiste dispose du spermogramme, auquel peuvent s'ajouter des tests dits fonctionnels qui explorent chacune des étapes de la préparation du spermatozoïde à la fécondation, ainsi que ses qualités intrinsèques. Ces tests évaluent donc en partie le pouvoir fécondant du sperme, certains de ces tests sont tombés dans l'oubli, ou sont peu utilisés en routine. En effet, l'ICSI permet de contourner les premières étapes de la fécondation. Mais cette démarche court-circuite les schémas de réflexion qui tentent d'apprécier les capacités fécondantes des spermatozoïdes en vue d'adapter la prise en charge en AMP. En tant que professionnels de l'AMP, il faut s'imposer une réflexion adaptée et tenir compte des capacités des spermatozoïdes à se déplacer, à féconder à initier le développement d'un embryon. . Comprendre, le spermatozoïde et évaluer ses fonctions devrait permettre de choisir la technique d'AMP la plus adéquate, d'éviter les échecs de la première tentative, de limiter les indications de l'ICSI aux seuls cas nécessaires, et éventuellement d'orienter certains patients vers d'autres alternatives que l'AMP.

Parmi ces tests fonctionnels spécialisés du sperme nous avons le système d'analyse videomicrographique (système CASA pour *computer sperm analysis*) permettent une mesure automatisée, rapide, fine et objective (**Geyter et al ., 1998**).

Sachant que Le témoin de la capacitation est l'acquisition par le spermatozoïde d'un mouvement dit hyperactif, d'une grande vitesse, associée à des mouvements céphaliques latéraux de grande amplitude, et à des mouvements flagellaires importants et asymétriques.

## Introduction

---

Qui semble faciliter le détachement des spermatozoïdes de l'épithélium tubaire et la pénétration ultérieure de la zone pellucide. Notons que seuls les spermatozoïdes capables pourront pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire en conservant un acrosome intact.

En se référant à l'ensemble de réflexions précédentes nous nous sommes intéressés à l'intérêt du système casa dans la confirmation de la capacitation des spermatozoïdes in vitro et l'acquisition du mouvement hyper actif.

## *Partie I : Synthèse bibliographique*

## I.1.Appareil génital masculin

L'anatomie du tractus génital masculin a une grande influence sur la fertilité masculine car son intégrité est essentielle à l'émission des spermatozoïdes produits dans les testicules jusque au vagin.

L'appareil génital masculin est composé de plusieurs structures visibles (**figure1**)

- **Testicules** : sont des organes pairs, symétriques, Est une glande amphicrine dont composante exocrine a Pour but la production du gamète mâle et la partie Endocrine, la synthèse des hormones masculines,Température de 34°C optimale pour la spermatogenèse (**Moreno et Alvarado 2006;Valbuena et al.2008; Berruti et Paiardi2011**).

La capsule conjonctive, l'albuginée, recouvrant les testicules 'invagine et définit 200à300 lobules par testicule.Chaque lobule comprend 3 à 4 tubes séminifères d'une longueur de 50 cm et un diamètre de 150µm. Ces tubes Contournés possèdent une extrémité borgne et se jettent dans le rete"testis, puis dans les cônes Efférents (10à12partesticule) avant de rejoindre l'épididyme. L'épithélium des tubes séminifères est le siège de la spermatogénèse avec Les cellules de la lignée germinale et la cellule de Sertoli.

- **Epididymes** recouvrent la partie postérieure des testicules et correspondent à la partie initiale des conduits permettant l'excrétion du sperme.

- **Voies excrétrices** : représentées par les canaux déférents qui se poursuivent par les canaux éjaculateurs qui traversent la prostate pour se jeter dans l'urètre.

- **Glandes annexes** : constituées des vésicules séminales, de la prostate et des glandes de Cowper (ou glandes bulbo-urétrales).

- **Pénis** : formé par 2 corps caverneux et 1 corps spongieux et traversé par l'urètre.

(Hamilton 2019)

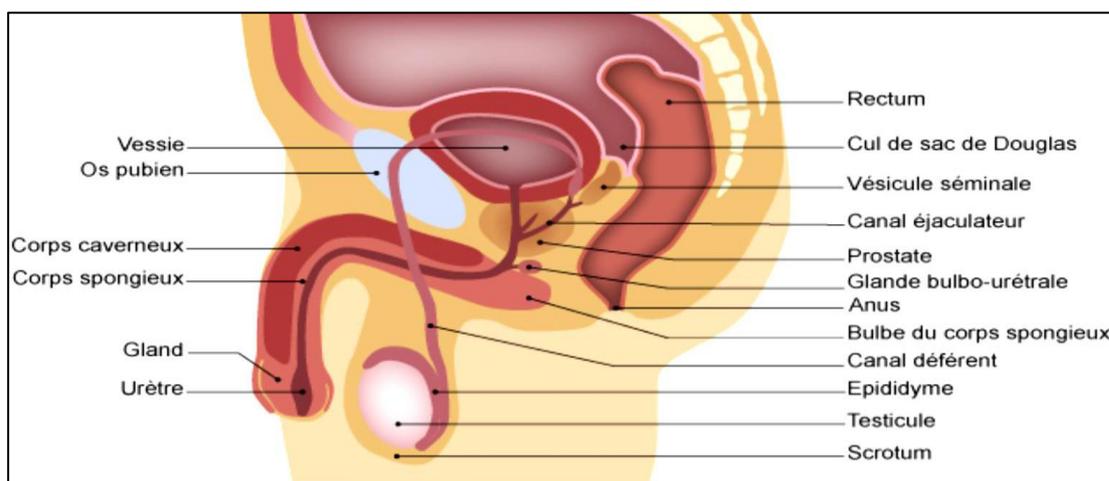


Figure 1 : Anatomie de l'appareil génital masculin (Hamilton 2019)

Chez l'homme la puberté, intervient entre 12 et 18 ans, elle est considérée comme une phase transitoire entre l'enfance et l'âge adulte.

### I.1.1 Phases de Spermatogenèse

- La spermatogenèse : est un processus de division et de différenciation des cellules souches germinales mâles en spermatozoïdes (gamètes mâles matures) (Saito et al.2000;Beardsley2002;O'Donnell et al.2011), elle se déroule Dans les testicules, et plus précisément dans la paroi des tubes séminifères des testicules.

La durée de la spermatogenèse est d'environ 74 jours chez l'homme.

La spermatogenèse démarre à la puberté sous l'effet des hormones gonadotropes (GnRH, LH, FSH) et des androgènes (testostérone). Elle dure 74 jours chez l'homme adulte et se divise en 3 phases : proliférative, méiotique et de différenciation.

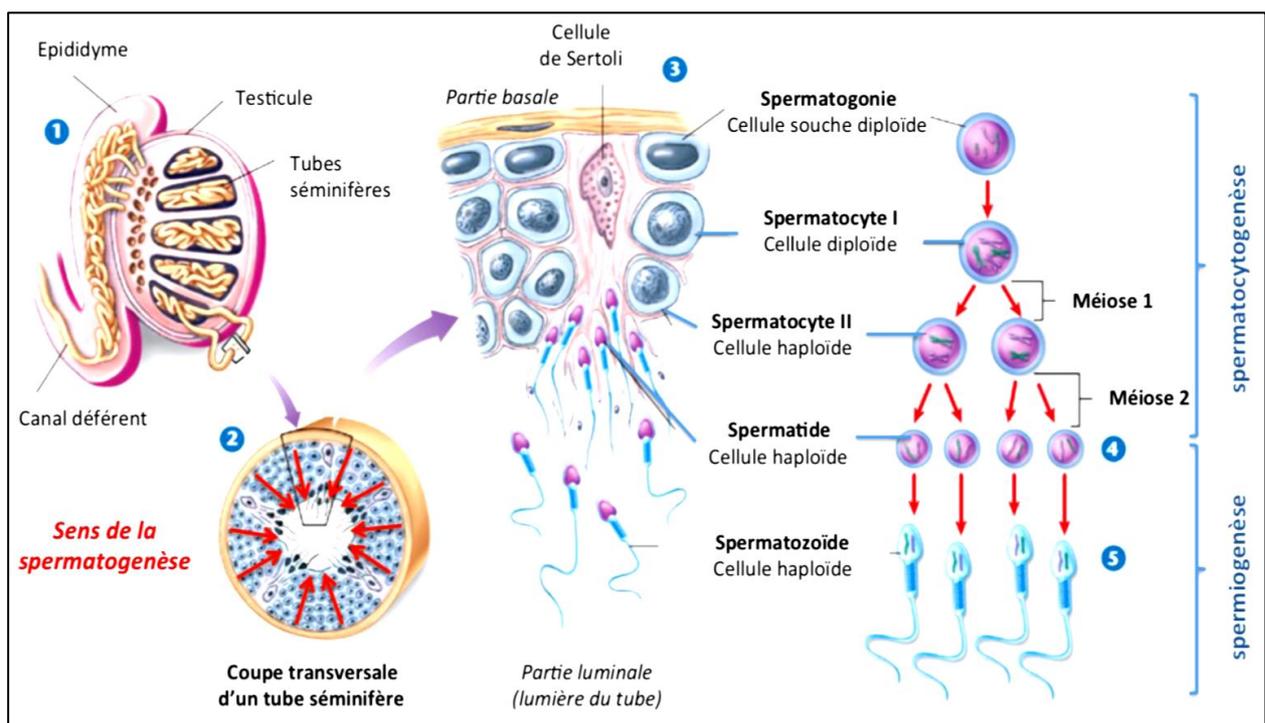


Figure 2 : La spermatogenèse (Hamilton 2019)

#### I.1.1.1 Phase proliférative

Sous l'effet des hormones gonadotropes, la spermatogonie de type Ad se multiplie par division hémiplastique pour donner une spermatogonie de type Ad, assurant le renouvellement du stock, et une spermatogonie de type AP. Cette dernière se divise de façon hétéroplastique pour donner deux spermatogonies de type B.

Celles-ci deviennent des spermatocytes I compétents pour entrer en méiose. Cette phase proliférative dure 16 jours. Les ponts cytoplasmiques existant entre la cellule mère et la

---

cellule fille persistent tout le long de la spermatogenèse. Les cellules germinales évoluent alors en lignées synchrones et issues du même clone.

### I.1.1.2 Phase méiotique

La méiose est un processus propre à la gamétogenèse. L'appariement des chromosomes homologues marque le début de la méiose (prophase) et est caractéristique du stade leptotène. Le stade zygotène voit se mettre en place le complexe synaptonémal .

Les échanges de portions chromosomiques ou crossing-over sont associés au stade pachytène .Au stade diplotène, le complexe synaptonémal se dissocie .Le stade diacinèse marque la fin de la prophase I de méiose. Les chromosomes se placent sur le fuseau méiotique. Cette prophase dure 22 jours sur les 24 jours que dure la 1ère phase de méiose chez l'homme et est caractéristique du spermatocyte I (diploïde).

La métaphase I voit la plaque équatoriale se mettre en place. Pendant l'anaphase, les chromosomes migrent le long du fuseau. Les deux lots de chromosomes entourés de leurs enveloppes nucléaires sont constitués pendant l'anaphase I. La 1ère division de méiose dite« équationnelle »conduit à la production de deux cellules filles, les spermatocytes II. Le spermatocyte II est une cellule haploïde dont la durée de vie n'est que de quelques Heures .ces derniers possèdent 23chromosomes dupliqués et abordent rapidement la deuxième division de méiose dite (réductionnelle) qui aboutit à la production de 2 spermatides rondes (haploïde)

### I.1.1.3 Phase de différenciation : la Spermiogenèse

Suite à la deuxième division méiotique, le spermatocyte II devient une spermatide ronde et entame progressivement sa différenciation pour devenir une spermatide allongée. Cette phase de différenciation cellulaire, appelée spermiogenèse, dure 23 jours et induit des changements cytologiques profonds Elle comporte plusieurs phases :

\* **Hyper compaction de la chromatine** : la chromatine se condense progressivement et le noyau apparait compact. Les histones sont partiellement remplacées par des protéines de transition puis par des nucléoprotéines, les protamines. Ces dernières présentent de nombreux ponts disulfures permettant une condensation importante de la chromatine. **(De Mateo et al.2009;2010).**

\* **Formation de l'acrosome** : l'acrosome est formé par la fusion des vésicules golgiennes. Il contient des enzymes qui seront libérées lors de la fécondation. Parmi elles, les enzymes hydrolytiques digéreront les différentes enveloppes de l'ovocyte lors de la fécondation (hyaluronidase, proacrosine). (**Moreno et Alvarado 2006;Valbuena et al.2008; Berruti et Paiardi 2011**).

\* A La formation du flagelle : le flagelle est élaboré à partir du centriole distal à la partie postérieure de la tête. Le réseau microtubulaire est composé de 9 doublets de microtubules et d'un doublet central. Ces microtubules sont associés à des bras de dynéine dont l'activité module le mouvement spermatique.

Dès les pièces intermédiaire et principale, les fibres denses recouvrent l'axonème. Dans la pièce principale, la gaine fibreuse entoure les microtubules et régule la mobilité spermatique (**Lie et al.2010; Konno et al.2012;Sperry et al.2012**).

### **I.1.2. Spermiation**

La spermiation est le processus par lequel la spermatide allongée quitte l'épithélium séminifère. Le corps résiduel est phagocyté par la cellule de Sertoli et les jonctions cellule de Sertoli, spermatides allongées sont peu à peu éliminées. Le cytoplasme de la cellule de Sertoli se rétracte libérant alors le spermatozoïde immature dans le fluide testiculaire. Ce processus est sous le contrôle de l'hormone folliculo stimulante (FSH) et de la testostérone (**Saito et al.2000;Beardsley2002;O'Donnell et al.2011**).

### **I.1.3 Structure du spermatozoïde**

Le spermatozoïde humain est une cellule hautement spécialisée. Le spermatozoïde se compose d'une tête et d'un flagelle (**figure3**), la tête se divise en deux parties : l'acrosome, vésicule fondamentale à la fécondation, et le noyau dont la chromatine est hypercompactée, le flagelle, moteur de la mobilité, comporte 3 parties : les pièces intermédiaire, principale et terminale. La pièce connectrice fait le lien entre et l'axonème, présente sur toute la longueur du flagelle. Dans les pièces intermédiaire et principale, les fibres denses entourent l'axonème. La pièce intermédiaire comprend l'hélice mitochondriale. Dans la pièce principale, l'axonème est recouvert d'une gaine fibreuse. Le cytosquelette se désorganise progressivement dans la pièce terminale.

**a) Tête du spermatozoïde**

La tête spermatique mesure environ 4-5  $\mu\text{m}$  de long et 3  $\mu\text{m}$  de large. Elle est quasiment dépourvue de cytoplasme et est constituée de 2 éléments principaux : le noyau et l'acrosome.

Le noyau haploïde possède une chromatine très condensée, ce qui permet de protéger le génome du spermatozoïde lors de son long transit, d'abord dans le tractus génital masculin puis dans le tractus génital féminin.

La tête renferme également l'acrosome : il s'agit d'une grande vésicule dérivant de l'appareil de Golgi contenant de nombreux enzymes et constitue une sorte de coiffe au niveau de la partie antérieure du noyau spermatique. Cet acrosome a un rôle fondamental lors de la fécondation par la libération de son contenu enzymatique permettant la lyse de la zone pellucide de l'ovocyte et l'apparition ou la modification de récepteurs et protéines jouant un rôle dans la fixation et la fusion avec l'ovocyte : ce phénomène s'appelle la réaction acrosomique.

Le contenu enzymatique hydrolitique est libéré et digère la zone pellucide de l'ovocyte. La membrane plasmique interne ainsi exposée comporte les récepteurs, ligands et enzymes qui permettent la fusion des gamètes mâle et femelle. Parmi les enzymes acrosomiales, la proacrosine et la hyaluronidase.

**b) Cou**

Le cou du spermatozoïde contient 2 éléments : la pièce connective et le centriole proximal. La pièce connective est composée de 9 colonnes segmentées en forme d'entonnoir.

Ces colonnes segmentées se prolongent ensuite par les fibres denses au sein du flagelle. Le centriole proximal quant à lui est formé de 9 triplets de microtubules disposés en cercle avec un axe de  $90^\circ$  par rapport à l'axe du flagelle. Ce centriole proximal est impliqué dans la formation du fuseau mitotique de première division lors de la fécondation.

**c) Flagelle**

Le flagelle est constitué de fibres et de microtubules, c'est l'élément moteur du spermatozoïde puisqu'il lui permet d'avoir une mobilité indispensable pour sa rencontre avec l'ovocyte. Il est constitué de 3 parties : pièce intermédiaire (4-5  $\mu\text{m}$ ), pièce principale (45-50  $\mu\text{m}$ ) et pièce terminale (1-2  $\mu\text{m}$ ).

La structure du flagelle est organisée autour de l'axonème avec la présence de structures péri-axonémales (sauf au niveau de la pièce terminale).

L'axonème est formé au centre des colonnes segmentées à partir du centriole distal.

Les différentes structures péri-axonémales sont :

- **Manchon mitochondrial** ou gaine de mitochondries :

La pièce intermédiaire contient une zone riche en mitochondries suite à leur migration lors de la spermiogenèse. Ces mitochondries sont indispensables à la mobilité du spermatozoïde car elles apportent l'énergie nécessaire à la mobilité du flagelle grâce à l'hydrolyse de l'ATP.

- **Fibres denses** : elles prolongent les colonnes segmentées et correspondent à des densifications protéiques en regard des doublets périphériques. Elles sont présentes dans la pièce intermédiaire et la pièce principale. - Gaine fibreuse : elle n'est présente que dans la pièce principale.

- **Colonnes longitudinales** : correspondent à un épaississement de la gaine fibreuse se confondant avec les fibres denses en regard des microtubules 3 et 8 (plan du doublet central).

La pièce terminale du flagelle quant à elle ne contient pas de structures péri-axonémales. - Axonème et structures péri-axonémales sur coupes transversales du flagelle (**Kazuo Inaba, 2011 ; Bisson JP et David, 1975**)

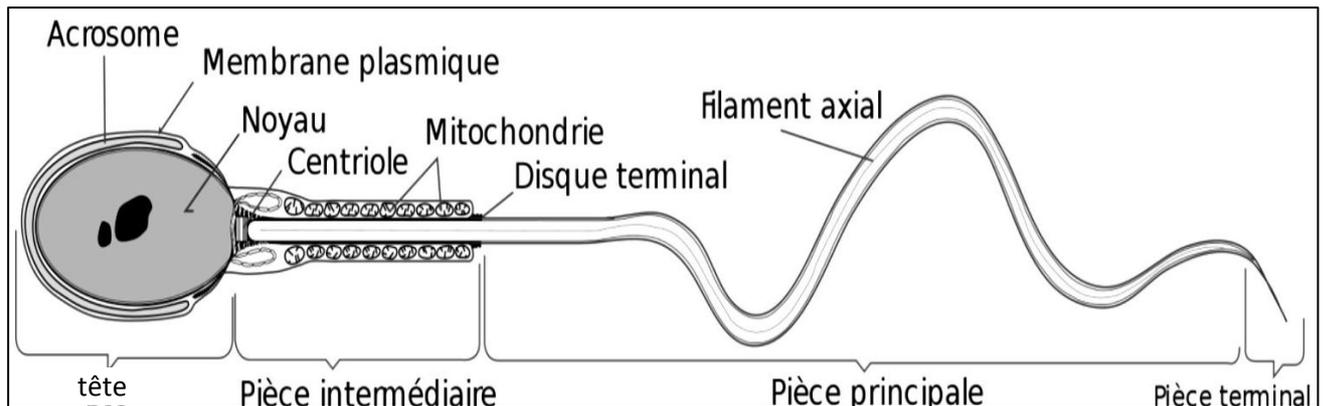


Figure 3 - Schéma d'un spermatozoïde humain (Marie Allimant ,2010)

Le plasma séminal est la résultante des sécrétions testiculaires, épидидymaires et des glandes annexes : la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Littré et de Cowper. Les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme et seront introduits dans le plasma séminal pour composer le sperme. A l'éjaculation, le sperme est émis en 3 fractions.

La 1ère fraction contient les sécrétions prostatiques et des glandes de Cowper. La 2ème fraction comporte les sécrétions épидидymaires, testiculaires et les spermatozoïdes. La 3ème fraction inclut les sécrétions des vésicules séminales.

### **I. 1.4. Modifications moléculaires et biochimiques du spermatozoïde**

A la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et est incapable de féconder un ovocyte. Il acquiert ses fonctions durant sa maturation dans l'épididyme et pendant la capacitation dans les voies génitales féminines.

#### **I.1.4.1 Au niveau épидидymaire**

Suite à l'étape de spermiation, les spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubes séminifères vont cheminer vers les tubes droits (1 tube droit par lobule testiculaire) puis le rete testis (Système canalaire). Ce cheminement des spermatozoïdes ne se fait pas grâce à leur mobilité propre mais grâce aux contractions de ces tubes séminifères puis des structures canalaire ultérieures conductrices des spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes testiculaires présentent une morphologie complète mais sont cependant à ce stade immobiles et non féconds.

Les spermatozoïdes vont ensuite gagner les épидидymes au niveau des cônes efférents. Ces cônes efférents se poursuivent par le canal épидидymaire, un canal extrêmement contourné faisant plusieurs mètres de long, qui se situe à l'extérieur du testicule à sa face dorsale.

On identifie 3 différentes parties au niveau de l'épididyme : la tête, le corps, et la queue. Les spermatozoïdes vont subir un phénomène de stockage et de maturation dans les épидидymes.

Cette maturation épидидymaire comprend des modifications de la membrane plasmique, des modifications chromatiniennes et cytoplasmiques ainsi que l'acquisition du pouvoir fécondant (mobilité et interaction gamétique). Ils acquièrent en effet leur mobilité dans le corps de l'épididyme.

Puis l'inhibition transitoire de leur pouvoir fécondant a lieu dans la queue de l'épididyme. Grâce à des facteurs décapacitants qui sont des molécules se fixent sur la membrane plasmique du spermatozoïde afin de la stabiliser et d'éviter une capacitation précoce. Parmi ces facteurs, les protéines de la famille CRISP bloquent les canaux ioniques et ainsi la capacitation, Ces glycoprotéines sont retirées de la membrane plasmique de spermatozoïde lors de son passage dans les voies génitales féminines (**Roberts et al.2007**).

#### **I.1.4.2 Au niveau des voies Génitales féminines**

Le mucus cervical est un maillage fait de longues chaînes glycoprotéines réunies par des ponts disulfures. En phase pré ovulatoire, ces chaînes s'orientent parallèlement à l'axe du canal cervical formant un filet à mailles larges permettant de « guider » les spermatozoïdes. Une glaire cervicale (endocol) de bonne qualité représente aussi un excellent milieu de

---

survie pour les spermatozoïdes permettant le relargage régulier de spermatozoïdes vers le corps utérin, in vitro la qualité de la glaire et le comportement des spermatozoïdes dans la glaire cervical s'apprécie par le test de Huhner et le test de pénétration croisée (**Griffith et Grime 1990**)

#### I.1.4.3 Capacitation

La capacitation est l'ensemble des modifications biochimiques et structurales, membranaires et cytoplasmiques se déroulant dans le tractus génital féminin qui permettent aux spermatozoïdes, d'acquies leur pouvoir fécondant. (**Hamilton 2019**)

Le phénomène de capacitation résulte dans un premier temps de la suppression des facteurs décapitant contenus dans le plasma séminal ou fixés sur les spermatozoïdes lors de la traversée de la glaire cervicale, puis de l'action de facteurs capacitant sécrétés par les voies génitales féminines.

La capacitation est aujourd'hui définie comme permettant aux spermatozoïdes

de subir l'hyperactivation qui est caractérisée par un mouvement flagellaire très rapide, asymétrique et avec une grande amplitude, de se lier à la zone pellucide, d'enclencher la réaction de l'acrosome, pour finalement fusionner avec l'ovocyte ((**Yanagimachi, 1994 ; Austin, 1992 ; Honda et al, 2002 ; Olson et al, 2011**),

C'est donc une étape de maturation indispensable à la fécondation. Elle est réversible : les spermatozoïdes capités peuvent être « dé capités » (**Bi et al. 2009**) s'ils sont incubés dans le plasma séminal.

La totalité des processus qui rentrent en jeu dans ce phénomène n'est pas connue, mais certains mécanismes ont été décryptés. Ils sont ici rassemblés en 4 grandes parties :

- **Des modifications membranaires** avec des réorganisations de phospholipides accompagnées d'un efflux de cholestérol induit par l'albumine et les lipoprotéines présentes dans le tractus génital femelle (**Gadella et al., 2008 ; Lin et Kan, 1996**) ;
- **Des modifications ioniques intracellulaires et membranaires** avec hyperpolarisation de la membrane plasmique, augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et augmentation du pH interne (**Arnoult et al., 1999**) ;
- **Un réarrangement des protéines de la membrane plasmique** accompagné de phosphorylations des protéines qui permettent la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide et de certaines protéines impliquées dans l'exocytose de la vésicule acrosomiale ;
- **Une hyperactivation flagellaire** (**Navarro et al. 2008**).

Ce phénomène permet d'augmenter la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte. Durant la capacitation, l'asymétrie des phospholipides et l'exposition des phosphatidylsérines facilitent l'adhésion cellulaire (**Gadella et al.2008 ; Nixon et Aitken 2009 ; Flesch et Gadella2000;Gadella et Harrison 2000**).

\* **Les ions bicarbonates et la voie AMPc** : de nombreuses études ont montré que la capacitation est un phénomène  $\text{HCO}_3^-$  dépendant (**Wuttke et al.2001**). A l'ovulation, le pH de la trompe est alcalin et la concentration des ions bicarbonates est à son maximum. L'entrée des ions bicarbonates via le transporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  stimule la fluidité membranaire et l'activité de l'adénylate cyclase.

Ce dernier synthétise l'AMPc qui active la PKA. Cette kinase phosphoryle les protéines cibles telles que les AKAPs dans le flagelle et mène à l'hyperactivation du mouvement (**Turner et al.1999;Luconi et al.2004**).La phosphorylation conduit également à un remodelage des protéines de la tête ce qui permet la reconnaissance ovocyte(ZP3) A spermatozoïde (**Asquith et al.2004**).

\* **Le calcium** : il module l'activité de kinases et ainsi la phosphorylation des protéines cibles (**Baldi et al. 1996**).L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire est régulée par une  $\text{Ca}^{2+}$ AATPase dépendante de la calmoduline et augmente durant la capacitation. Toutefois, l'entrée de calcium ne suffit pas et la mobilisation des réserves calciques acrosomale et mitochondriale est requise pour l'hyperactivation du flagelle (**Costello et al.2009**).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette capacitation sont, en résumé, des phénomènes de modifications des lipides membranaires (réorganisation des phospholipides, redistribution du cholestérol et efflux de cholestérol) induisant une augmentation de la fluidité membranaire et une déstabilisation membranaire. Ceci entraîne une mobilisation des protéines membranaires .il s'ensuit une externalisation de récepteurs spermatiques qui permettront la fixation à la zone pellucide ovocytaire. Des zones membranaires fusiogènes apparaissent et une modification de l'activité des canaux ioniques entraîne une augmentation de la perméabilité aux ions calcium. Ces deux derniers événements préparent le spermatozoïde à la prochaine étape qu'est la réaction acrosomique .Dans le spermatozoïde qui se capacite, l'influx massif de calcium intracellulaire a pour effet d'augmenter l'activité adénylate –cyclase et de diminuer l'activité des phosphodiésterases , d'où une élévation du taux d'AMPcyclique(AMPc) dans le spermatozoïde , ce qui augmente sa mobilité .l'AMPc active en effet des protéines –kinases permettant la phosphorylation de nombreuses protéines spermatiques notamment flagellaires .le témoin de la capacitation est l'acquisition

par le spermatozoïde d'un mouvement dit hyperactif (Oehninger S, Franken DR, Sayed E et al. 2000 )

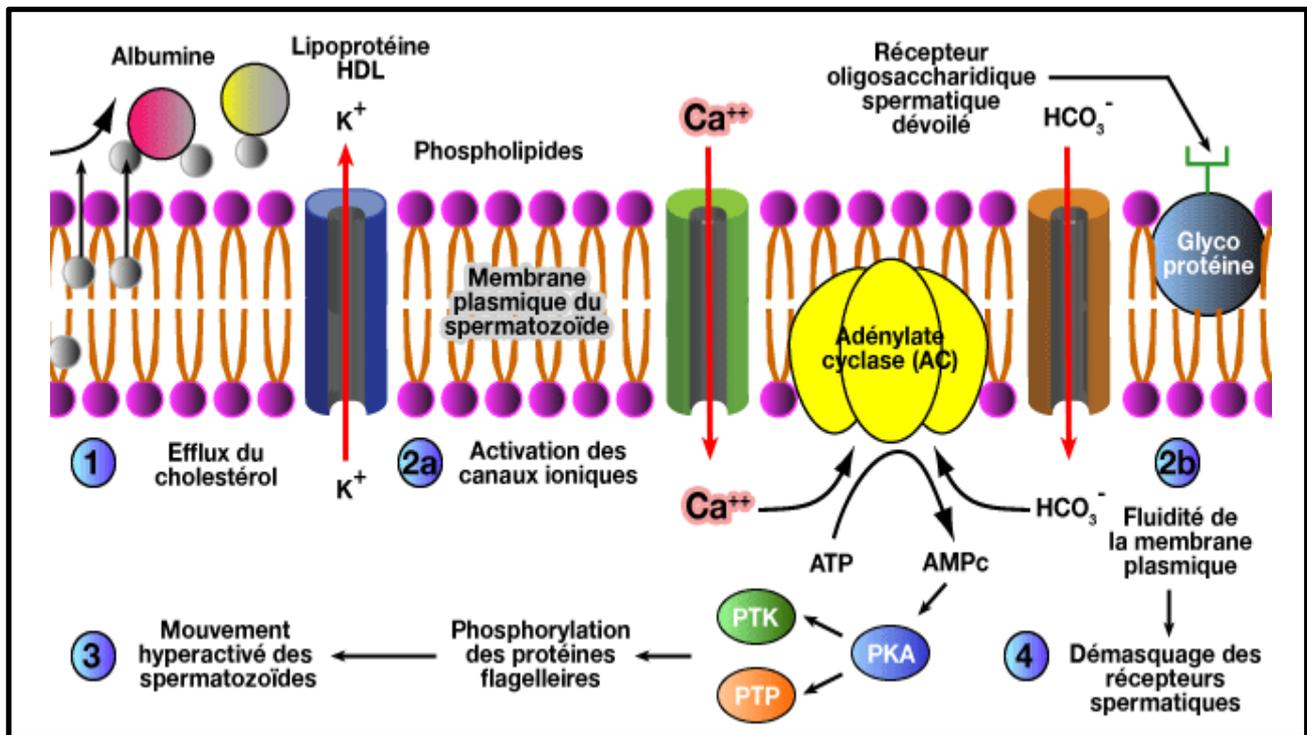


Figure 4: Résumé biochimique de la capacitation (Dessin: c vetopsy .Fr)

#### I.1.4.4 L'Hyperactivation du mouvement flagellaire

Le mouvement hyperactif est déterminant pour la progression du spermatozoïde dans le tractus génital féminin mais aussi au sein du complexe cumulo-ovocytaire afin de pouvoir pénétrer la zone pellucide et féconder l'ovocyte (Mortimer et al. 2015) à travers :

- Le développement des forces nécessaires pour détacher des spermatozoïdes ayant adhéré au revêtement épithélial,
- La facilitation des échanges des métabolites et des autres facteurs stimulants par une agitation du fluide réalisant le microenvironnement local du spermatozoïde,
- La prévention du piégeage des spermatozoïdes dans les portions étroites et contournées du tractus par une migration facilitée
- L'augmentation de la probabilité de rencontre avec le complexe cumulus-ovocyte par un volume balayé plus important et,
- La pénétration au travers de la masse du cumulus et de la zone pellucide par une poussée accrue au niveau de la tête du spermatozoïde

Il existe deux types d'hyperactivation du spermatozoïde : progressive et non progressive (Figure 5). Le mouvement hyperactif non progressif décrit un trajet qualifié classiquement « en étoile » et ne s'exprime que de manière transitoire pour un spermatozoïde donné, entre des phases où le mouvement est progressif (Jouannet et al. 1995).

La particularité de ce mouvement est une grande vélocité, associée à des mouvements céphaliques latéraux de Grande amplitude, et à des mouvements flagellaires importants et asymétriques, cette mobilité hyperactive semble faciliter le détachement des spermatozoïdes de l'épithélium tubaire et la pénétration ultérieure de la zone pellucide, Notons que seuls les spermatozoïdes capités pourront pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire en conservant un acrosome intact

Des systèmes d'analyse vidéomicrographique (système CASA pour computer sperm analysis) permettent une mesure automatisée, rapide, fine et objective de cette mobilité spermatique, un logiciel permet de retracer la trajectoire suivie par la tête des spermatozoïdes (Oehninger S, Franken DR, Sayed E et al. 2000 )

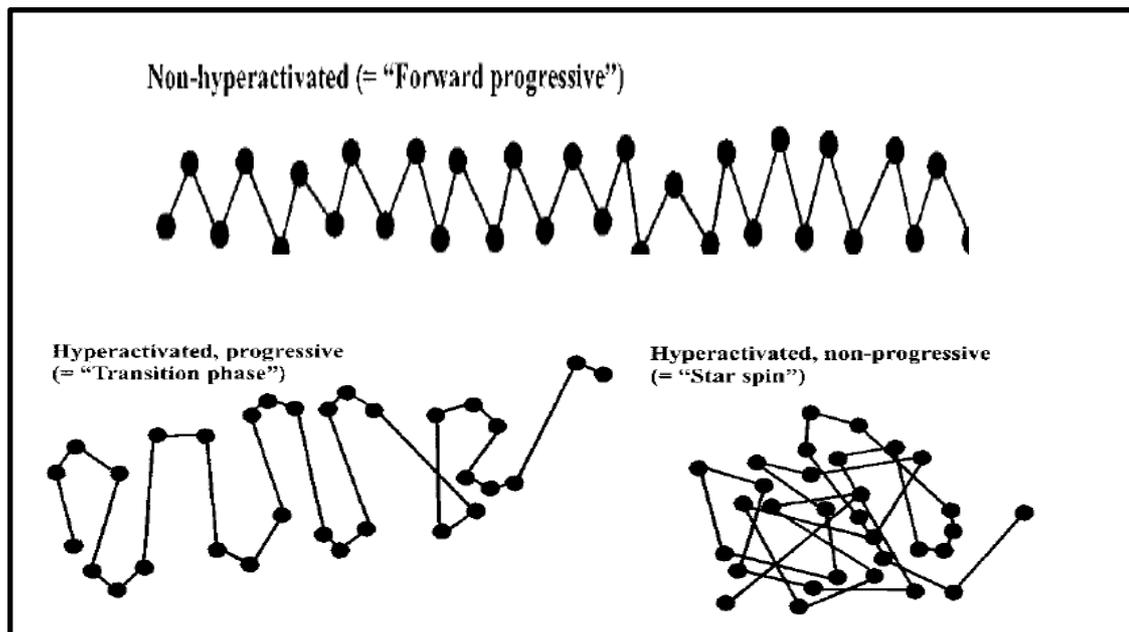


Figure 5: Trajectoires de spermatozoïdes capités mobiles non hyperactivés et hyperactivés (Mortimer et al. 2000).

#### I.1.4.5. Reconnaissance et la liaison à la zone pellucide ovocytaire

Parvenus en nombre restreint jusqu'au contact de l'ovocyte, les spermatozoïdes entrent à nouveau en concurrence pour reconnaître et se lier à la zone pellucide ovocytaire, la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide est un processus spécifique d'espèce,

Les protéines de membrane qui seront responsables de la reconnaissance et de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovocyte II deviennent fonctionnelles

La liaison entre des récepteurs spécifiques situés à la surface du spermatozoïde et une protéine de la zone pellucide, la protéine ZP3

---

La liaison du spermatozoïde à la ZP3 va également activer des récepteurs spermatiques et déclencher des voies enzymatiques impliquées dans la réaction acrosomique (**Patrat et al., 2000**).

Un **hemi-zona assay** est utilisé pour la capacité de fixation de la population spermatique étudiée à une population de spermatozoïdes témoins ayant prouvé leur fécondance (**Arslan M, et al. (2006)**)

#### **I.1.4.6 La Réaction acrosomique (RA)**

Le spermatozoïde qui est capable peut entreprendre la réaction de l'acrosome pour être en mesure de féconder l'ovocyte. La réaction de l'acrosome consiste en la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane externe de l'acrosome, conduisant à la formation de vésicules se dispersant progressivement avec libération concomitante du contenu acrosomial, cette réaction se caractérise par un influx d'ions calcium et un efflux de protons à travers la membrane plasmique périacrosomique.

Dans les conditions physiologiques, seuls les spermatozoïdes capables peuvent faire leur réaction acrosomique.

Une fois la réaction acrosomique achevée, le spermatozoïde n'est alors recouvert en avant que par la membrane acrosomique interne qui peut ainsi être exposée à l'ovocyte. (**Esteves et al., 2007**)

Le **Hamster -test** permet donc d'évaluer les capacités fusionnelles des spermatozoïdes (**Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP 1990, Oehninger S, Franken DR, Sayed E et al. 2000**)

#### **I.1.4.7 Fécondation**

La fécondation humaine implique une succession d'étapes paléontologiques aboutissant à l'activation de l'ovocyte et l'initiation de l'embryogénèse, le chemin jusqu'à l'ovocyte est long et semé d'embûches et il s'impose donc aux spermatozoïdes, d'être mobiles et fécondants, au terme d'un parcours de près de 3000 fois leur taille, les spermatozoïdes, ayant franchi le col et « escaladé » les voies génitales féminines, atteignent finalement le sommet des trompes de Fallope et gagnent l'ampoule tubaire, le spermatozoïde, alors capable, doit pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire, reconnaître et se lier à la zone pellucide de l'ovocyte, réaliser sa réaction acrosomique et forcer la zone pellucide, parvenu dans l'espace péri-vitellin, il s'arrimera à la membrane plasmique ovocytaire, les membranes spermatique et ovocytaire fusionnent et le contenu du spermatozoïde s'intégrera alors au cytoplasme ovocytaire, l'ADN très condensé contenu dans la tête spermatique devra être décondensé pour former

le pronucléus male, Ainsi , le spermatozoïde élu aura franchi de nombreux obstacles pour apporter au but , ce qui 'il aura jusqu'alors protégé, la moitié du patrimoine génétique du futur zygote(**Griffith et Grime 1990**)

L'ovocyte fécondé est nommé zygote, Les deux noyaux se placent l'un au contact de l'autre. Chaque noyau entre en prophase : les chromosomes apparaissent et le fuseau de division s'organise. Après destruction des enveloppes nucléaires, les chromosomes se placent sur le fuseau et forment la plaque équatoriale.

Selon le dogme classique, (**Evans et Florman, 2002**) la séquence des événements menant à la fécondation est décrite comme suite :

d'abord la liaison avec la zone pellucide ;, ensuite la réaction de l'acrosome, suivie de la fusion de la membrane de l'oolème et de la surface du spermatozoïde , l'injection du génome paternel

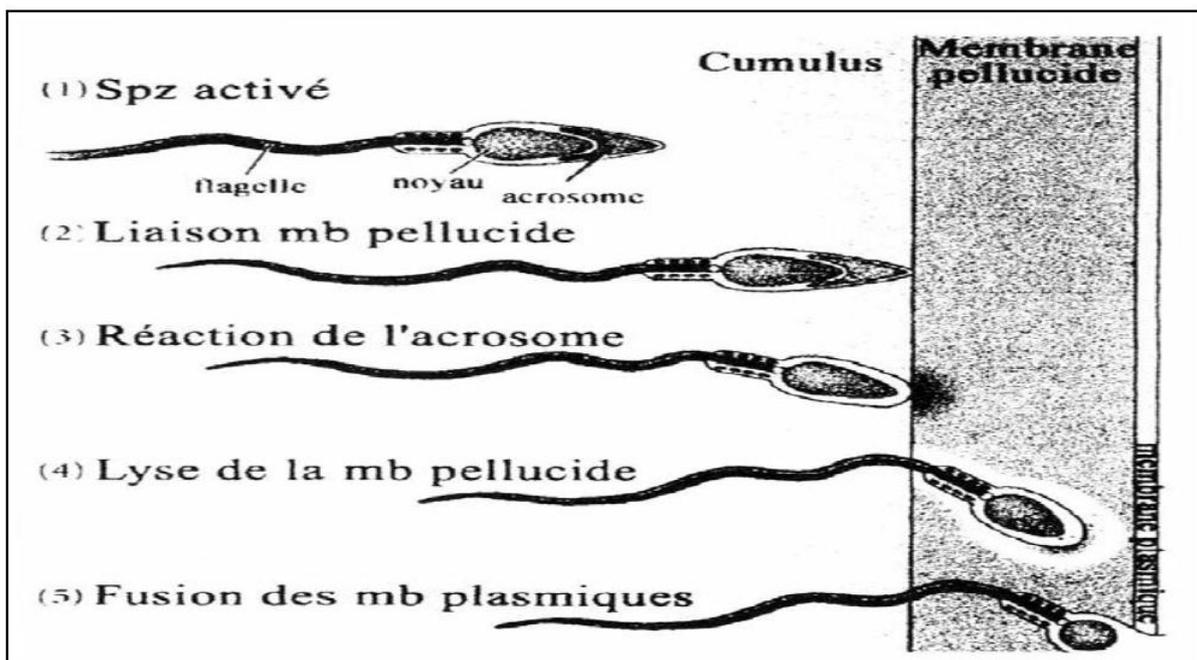


Figure 6 : schéma représente les étapes de la fécondation. (Kawa et al.2010)

## I.2 Analyse du sperme

Spermogramme-spermocytogramme est l'examen de premier intention pour évaluer la qualité du sperme dont l'organisation mondiale pour la santé (OMS) a défini les limites basses de références (WHO 2010)

### I.2.1 Le spermogramme

Le spermogramme est l'étude du sperme frais éjaculé. Après un délai d'abstinence sexuelle de 3 à 5 jours, après liquéfaction, divers paramètres sont caractérisés (WHO 2010)

- **Volume** : témoin du bon fonctionnement des glandes annexes

- **Ph**

**Viscosité** : résultante des sécrétions prostatiques et vésicules séminales

**Vitalité** : renseigne sur le nombre de spermatozoïde vivants et morts par une coloration vitale (éosine-nigrosine)

La numération des spermatozoïdes et les cellules rondes

- **Mobilité**

La mobilité est un paramètre essentiel pour l'évaluation de la fécondance du spermatozoïde, la mobilité du spermatozoïde présente différents profils. Apprécie au microscope optique, elle est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles (Grizard et Jimenez 1997), une évaluation qualitative est réalisée en différenciant les spermatozoïdes se déplaçant activement suivant une trajectoire linéaire ou aléatoire (mobilité progressive PR), ne progressant que très faiblement (non progressif NP) et les spermatozoïdes immobiles (IM) (WHO 2010). Des systèmes d'analyses assistés par ordinateur (système CASA) garantissent une mesure automatique et objective, ces systèmes CASA permettent de détecter des anomalies de mobilité imperceptibles en microscope. Toutefois, peu de laboratoires sont aujourd'hui équipés

**I.2.2 Spermocytogramme.** La morphologie du spermatozoïde est considérée comme l'un des facteurs clés de réussite de la fécondation.

### I.2.3 Analyse informatique du Sperme (CASA : Computerized Assisted SperAnalysis)

Le système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif relié à un logiciel informatique par l'intermédiaire d'une caméra permettant la digitalisation des images, c'est-à-dire la transformation des images capturées par la caméra en images numériques (Mortimer 2000 ; OMS 2010).

Cette méthode informatisée permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (Pena, 2004).

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux : la mobilité massale et individuelle, les mouvements lents, moyens et rapides, la fréquence des battements des flagelles...Ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur capacitation sont reconnus à leur mouvement hyperactive

Cette méthode permet l'analyse d'un grand nombre de spermatozoïdes en un temps limité. Cependant, cette méthode coûte chère et elle nécessite une standardisation des appareils Avant leur utilisation (**Rijsselaere et al., 2005**)



Figure 7: le système CASA HT CEROS II Clinical(Mortimer 2000 ,OMS 2010)

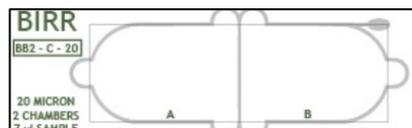


Figure 8 :Lames BIRR Biosciences 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B

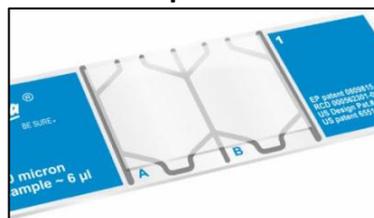


Figure 9 : Lame Leja® 20 µm avec 2 chambres de comptage A et B

### Il calculer plusieurs paramètres de mobilité à savoir

\*la motilité totale **TMOT** : ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.

\*le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (**PMOT**) : ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une **VAP < 50 µm/seconde** et une linéarité (**VSL/VAP**) supérieure à 75%

\*le pourcentage des spermatozoïdes statiques : il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse

\*les mouvements rapides, moyens et lents des spermatozoïdes

\* les différentes vitesses de progression :

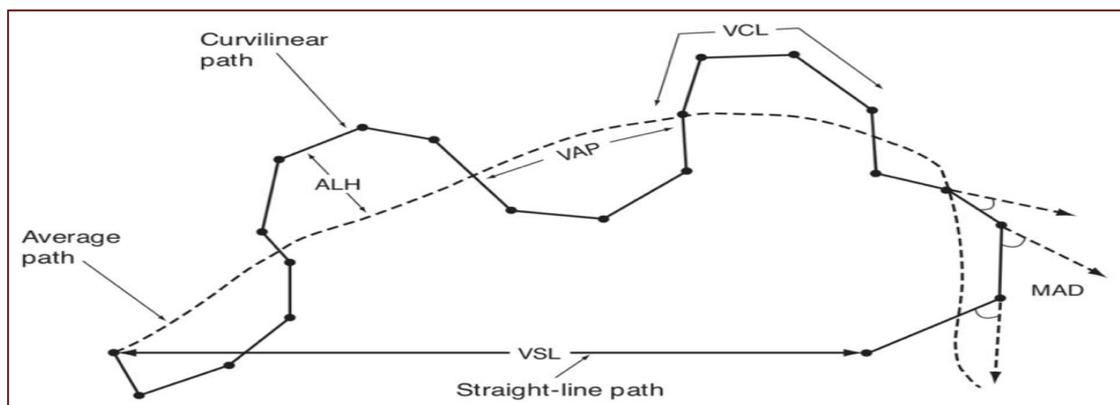
- **VCL** (velocity curvilinear) : cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné

- **VSL** (velocity straight line) : cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée sur spermatozoïdes, indépendamment de son trajet

-**VAP**(velocity average pathway) : cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet

**ALH** : amplitude of lateral Head displacement : ce paramètre correspond à la distance, en µm balayé par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement

-**BCF** beat cross frequency : il mesure en Hezz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps)



**Figure 10 : terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (OMS 2010)**

---

### I.3 Procréation Médicale Assisté (PMA)

Techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont l'ensemble des techniques médicales et biologiques qui comportent la manipulation des gamètes, avec ou sans fécondation in vitro (FIV), dans le but d'obtenir une grossesse chez un couple qui sans cela risquerait de demeurer infécond

Ces techniques peuvent aussi s'appliquer dans le cas de risques importants de transmission à l'enfant de maladies graves et incurables de façon à ne transférer que les embryons qui en seraient indemnes **(Ezekiel et al. 2003)**

#### I.3.1 Fécondation in vitro classique (FIVETE)

Dans la fécondation in vitro (FIV) dite « classique », la confrontation entre gamètes mâles et femelles est assurée en dehors de l'appareil génital féminin, par insémination simple « in vitro », la FIV réalise en dehors de l'organisme ce qui se fait normalement dans la trompe de la femme : capacitation de l'ovocyte mature par le pavillon tubaire , transport des spermatozoïdes jusqu'à l'endroit où doit avoir lieu la fécondation , en général l'ampoule tubaire ( achèvement de leur capacitation en cours de route), fécondation , transport de l'œuf jusqu'à la cavité utérine où doit avoir lieu son implantation , tout en assurant les conditions nécessaires aux premières segmentations embryonnaires.**(potter,1970)**

FIV classique (insémination des spermatozoïdes dans l'ovocyte) : Chaque ovocyte est mis en présence d'un nombre suffisant de spermatozoïdes mobiles préparés avant d'être replacé à 37 dans un incubateur, tout en veillant au respect de conditions physico-chimiques précises : température, composition du milieu, os molarité, ph)

\*Les principales indications en sont :

La stérilité tubaire

L'endométrieose

Les stérilités dites « idiopathiques »

Les troubles de l'ovulation en seconde intention

Les échecs d'IAD (FIV-D)

#### I.3.2 Fécondation assisté (ICSI)

Les indications de FIV couplée à une technique de micro- injection (ICSI) se sont rapidement diversifiées. Il s'agit alors d'injecter directement par intervention humaine un spermatozoïde dans chaque ovocyte mature recueilli. **(potter, 1970)**

Aucun test ne permet de prévoir de façon certaine la fécondance d'un sperme. Les biologistes apprécient la faisabilité d'une tentative en faisant un test de préparation du sperme, ce qui leur permet de juger du nombre

De spermatozoïde dont ils pourront disposer lors de la tentative. Plusieurs recueils successifs du sperme sont parfois proposés au patient :

- Sur sperme éjaculé, qu'il y ait authentique OligoAsthénospermie (OATS) ou que le sperme soit dit « normal » mais :
  - avec stigmates d'une auto-immunisation
  - avec échec de fécondation en FIV classique
- \*dans le cadre d'une azoospermie, que celle-ci soit
  - excrétoire
  - sécrétoire



**Figure 11: schéma de fécondation in vitro par l'injection cytoplasmique du sperme intracellulaire**

### **I.3.3 Recueil ovocytaire au cours du cycle spontané ou induit**

Différentes méthodes sont utilisées pour préparer les ovaires au recueil ovocytaire : le cycle Natural, l'induction de l'ovulation par citrate de clomiphène , Le recueil d'un ovocyte lors d'un cycle Natural requiert un monitoring de l'ovulation extrêmement précis afin de détecter le pic pré ovulatoire de LH et réaliser la ponction ovarien, avant la rupture folliculaire. Le prélèvement ovocytaire et peut être décidé soit à partir du pic spontané de LH (il faut alors accepter de réaliser la ponction folliculaire et la FIV à toutes les heures du jour et de nuit), soit à partir d'une injection déclenchant d'HCG dès que les diamètres du follicule atteint 18mm de diamètre avec une sécrétion ostrogénique supérieure à 150pg/ml (la ponction est alors réalisée 35 heures après l'injection d'HCG

Les cycles induits par le citrate de clomiphène permettent le développement de 1à3 follicules. Le taux de grossesses cliniques par cycle est d'environ 10%. le monitoring de l'ovulation a les mêmes impératifs que celui des cycles spontanés .Compte tenu des faibles taux de réussite et de la difficulté du suivi de ce type , les cycles spontanés et induits sont , actuellement ,très peu utilisés pour préparer les ovaires au recueil ovocytaire

### **I.3.4 Ponction folliculaire**

Aux débuts de la FIV, les prélèvements folliculaires se faisaient par cœlioscopie, progressivement les méthodes de prélèvement en ambulatoire sous contrôle échographique se sont développées et sont devenues la méthode standard et unique de prélèvement, le plus souvent la ponction est effectuée par voie vaginale, la sonde vaginale d'échographie étant munie d'un guide qui permet le passage d'une aiguille de prélèvement de calibre suffisant (**Henkel et Schill 2003**)

Notamment il faut être vigilant sur la façon dont la salle d'opération est stérilisée et sur l'emploi des agents antiseptiques, le liquide folliculaire ainsi recueilli est immédiatement transmis au biologiste qui compte les complexes cumulo-ovocytaires

### **I.3.5 Sélection et capacitation des spermatozoïdes**

Le jour de la ponction folliculaire, le conjoint réalise un prélèvement de sperme .dans certains cas particuliers, l'équipe médicale s'est assurée d'une réserve suffisante de gamètes mâles par autoconservation à la stimulation folliculaire

La sélection des spermatozoïdes peut être réalisée in vitro par différents méthodes .Cette sélection permet d'enrichir la préparation en spermatozoïdes mobiles et normaux et d'optimiser ainsi les chances de fécondation

---

Un test de sélection des spermatozoïdes peut compléter le spermogramme afin d'estimer la qualité de préparation enrichie en spermatozoïdes mobiles et normaux. Ainsi, la méthode de sélection des spermatozoïdes doit répondre à plusieurs critères **(Henkel et Schill 2003)** :

Différentes méthodes de sélection ont été développées et sont résumées dans le **tableau 2**

**\*la migration ascendante** : le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles de traverser, depuis le fond du tube vers la partie supérieure, un milieu capacitant, ce milieu comporte de l'albumine, protéine de captation de cholestérol ; du pyruvate, substrat énergétique, et de glucose. Cette méthode de sélection présente les avantages d'être facile à réaliser et permet l'obtention d'une fraction pure enrichie en spermatozoïdes mobiles. Toutefois, les spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de la chromatine ne sont pas éliminés, le rendement obtenu est également moindre qu'avec la méthode de sélection par gradient de densité. Ainsi, cette approche est réservée aux spermatozoïdes normaux avec une forte mobilité progressive. **(Henkel et Schill 2003)**

**\*Le gradient de densité** : le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles et normaux à migrer aux travers d'un gradient de macromolécules. Ce milieu contient de la silice recouverte de silane et dont l'osmolarité est ajustée avec des polysucres. Il présente l'avantage d'être peu toxique, après centrifugation, le gradient présente plusieurs phases. Les phases supérieures contiennent le plasma séminal, les cellules rondes et les spermatozoïdes morts ou anormaux, les spermatozoïdes les plus normaux morphologiquement sont

Dans le culot **(De Mateo et al .2010)**

Méthode	Avantages	Inconvénients
<b>Migration ascendante :</b> Migration des spermatozoïdes mobiles dans un milieu capacitant	Fraction enrichie en spermatozoïdes mobiles facile et peu onéreuse	Faible rendement Espèces réactives de l'oxygène Nombreux spermatozoïdes Avec un défaut de condensation de la chromatine
<b>Migration par sédimentation :</b> Migration ascendante puis sédimentation	Fraction enrichie en spermatozoïdes mobiles peu d'ERO	Faible rendement
<b>Gradient de densité :</b> Migration des spermatozoïdes au travers d'un gradient de macromolécules	Fraction enrichie en spermatozoïdes normaux Bon rendement Peu d'ERO Elimination des cellules rondes	Méthode plus longue (temps) et onéreuse

**Tableau 1 : Méthodes de sélection des spermatozoïdes**

Après préparation selon les techniques déjà décrites, les spermatozoïdes sont placés dans une solution de poly-vinyl-pyrrolidone (**PVP**) qui les immobilise par sa viscosité

Le spermatozoïde retenu est chargé dans la micropipette après cassure de son flagelle afin de lui enlever toute mobilité. Il est ensuite introduit dans le cytoplasme d'un ovocyte décoronisé.

### **I.3.6 Traitement des ovocytes**

Une des conséquences de la stimulation est l'hétérogénéité de la cohorte ovocytaire. Tous les degrés de maturation peuvent être constatés. Dans la pratique actuelle, tous les ovocytes sont mis en fécondation en **FIV** et seuls les ovocytes jugés matures après décoronisation sont micro-injectés en **ICSI**

### **I.3.7 Observation des embryons**

L'observation des zygotes peut avoir lieu 20 à 24 heures après la fécondation in vitro. L'examen détaillé des zygotes est de vérifier la réalité de la fécondation et d'en détecter d'éventuelles anomalies

L'examen des embryons se fait en principe 40 à 48 heures après l'insémination, cet examen, outre l'intérêt théorique qu'il peut présenter, est très utile au choix des embryons à transférer

### **I.3.8 Transfert embryonnaire**

C'est la dernière étape du processus de la fécondation in vitro, elle pourrait paraître la plus facile car sur le plan gynécologique le geste du transfert embryonnaire est le plus souvent sans difficulté, mais il doit être préparé et réalisé avec attention pour éviter qu'un transfert embryonnaire inadéquat soit la cause de l'échec finale de toutes les étapes antérieures. Il a lieu actuellement dans la majorité de cas à 48h de la ponction. Il peut être aussi plus tardif à cinq ou six jours, au stade blastocyste, mais ceci nécessite l'utilisation d'autres milieux de culture.

Le transfert a lieu en ambulatoire, le plus souvent au laboratoire de fécondation in vitro lui-même afin d'éviter toute manipulation inutile et tout transport embryonnaire qui pourrait intervenir négativement sur ses capacités de développement

## **Partie II : Etude analytique synthèses d'articles scientifiques**

Le but de notre étude analytique consiste à évaluer certains paramètres cinétiques spermatique liée à l'hyperactivation des spermatozoïdes humains après capacitation in vitro analysées en critères stricts par une mesure automatique et objective( système **CASA**) sur nos tentatives de **FIV** sur l'année **2020**.

Nous avons essayé de déterminer un seuil au-dessus duquel l'hyperactivité spermatique obtenue après la capacitation in vitro a une bonne valeur prédictive positive sur les taux de fécondation (**TF**) in vitro

Ainsi l'intérêt du système **CASA** dans la détection des anomalies de mobilité imperceptibles en microscope optique

Il s'agit d'une étude prospective, Les prélèvements proviennent provient des hommes inclus dans un programme **d'AMP (FIV,)**

## **II.1 Matériels et les méthodes :**

### **II.1.1 population étudiée**

- Elle rassemble l'ensemble des tentatives réalisées en FIV classique une partie de l'année 2020 au laboratoire d'AMP du CHU de Pernet. L'ensemble des tentatives comprend les FIV classiques consécutives (n=80) avec le sperme du conjoint frais quel que soit l'indication de la FIV

Les critères de non inclusion dans notre étude étaient les tentatives avec sperme de donneur, avec spermatozoïdes préalablement congelés, recueillis dans les urines ou prélevés chirurgicalement et enfin avec des auto-anticorps anti-spermatozoïdes.

Pour la méthode semi automatisé Les mêmes conditions pré-analytiques avant tout examen de sperme doivent être respectées

- Instructions à transmettre au patient lors de la prise de rendez-vous :

\* Hyperhydratation : boire 2 litres d'eau par jour les 2 jours précédant l'examen

\*Délai d'abstinence sexuelle entre 2 et 7 jours à respecter

Antécédents familiaux

- Instructions claires orales et écrites sur le recueil de sperme : importance du lavage des mains, de la toilette des parties génitales au savon puis avec un antiseptique (Dakin)
- Recueil par masturbation au laboratoire dans un réceptacle gradué identifié
- Tracer l'heure du recueil et placer le réceptacle à l'étuve à 37°C pendant 20 à 30 minutes pour liquéfaction.

L'analyse commence par les caractéristiques physico-chimiques de l'éjaculat : la mesure du volume (pipette graduée), la mesure du pH par bandelette colorimétrique ainsi qu'une estimation de la viscosité.

Pour la validation de méthode, deux types d'échantillons: ont été utilisés

### **II.1.2 Sperme frais**

### **II.1.3 Capacitat** : sperme après préparation par test de migration-survie (TMS)

La préparation du sperme est nécessaire avant toute technique d'aide médicale à la procréation afin de sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles mais aussi séparer les spermatozoïdes du liquide séminal. En effet, des inhibiteurs de la fécondance (facteurs décapacitants) des spermatozoïdes sont présents dans ce liquide et la préparation du sperme va permettre de les éliminer pour obtenir une « capacitation in vitro ».

**En raison de la pandémie mondiale, Corona 19, je n'ai pas pu terminer cette phase d'essai**

## **Partie III : discussion**

---

**Discussion**

Le but principal de notre étude prospective était d'évaluer certains paramètres cinétiques spermatique liée à l'hyper activation des spermatozoïdes humains après la capacitation in vitro dans un milieu capacitant à l'aide d'une analyse informatisée(**CASA**), ainsi que la validation de la méthode de mesure de la mobilité des spermatozoïdes par le système **CASA** qui est une méthode semi-automatisée dans l'objectif est d'utiliser ce système **CASA** en routine dans le laboratoire d'aide médicale à la procréation (**AMP**).

\*La procréation médicalement assistée(**PMA**), aussi appelée assistance médicale à la procréation (**AMP**), est un ensemble de pratiques cliniques et biologiques dans lesquelles la médecine intervient afin de permettre à un couple de procréer lorsque celui-ci ne peut pas le faire de manière « naturelle », il existe plusieurs techniques d'assistance médicale à la procréation parmi les techniques la plus principale c'est la fécondation in vitro .

\*La fécondation in vitro (**FIV**), (qui met en contact des ovules et des spermatozoïdes hors de l'utérus (en général, pour augmenter les chances de succès, on ré-implante dans l'utérus trois ou quatre œufs fécondés),et la fécondation par micro injection ou fécondation in vitro avec **ICSI** (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), similaire à la FIV, sauf que cette fois, on injecte directement, à l'aide d'une micro pipette, un seul spermatozoïde dans l'ovule (pratique privilégiée lorsque le géniteur produit un trop faible nombre de spermatozoïdes (**Ezekiel,1970**))

\*La mise en œuvre d'une AMP nécessite la réalisation préalable d'un test de migration survie ainsi que le précise le texte du "**Guide de Bonnes Pratiques de l'AMP**" (**J.O. 1999**), Ce test permettra de déterminer la meilleure méthode de préparation des spermatozoïdes pour le patient concernée conditionnera le choix d'une AMP. Bien sûr, ce choix ne reposant pas uniquement sur le résultat du test de migration-survie, d'autres investigations diagnostiques peuvent s'envisager.

Les techniques de préparation du sperme in vitro en vue d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont basées sur une séparation des spermatozoïdes à partir du liquide séminal (le lavage), éliminer les débris cellulaires , les cellules (telles que les leucocytes) ainsi

---

que les spermatozoïdes morts accompagnée d'une sélection d'une sous-population considérée comme la plus fécondante, car constituée de gamètes en majorité mobiles et morphologiquement normaux, et dans certaine mesure d'amorcer la capacitation.

\*La capacitation des spermatozoïdes est une étape indispensable à la fécondation chez tous les mammifères (**AUSTIN, 1967**) elle correspondant aux modifications cellulaires et moléculaires subies par le spermatozoïde dans les voies génitales femelles qui le préparent à subir la réaction acrosomique (RA) (**YANAGIMACHI, 1981**) d'une façon générale, la capacitation entraîne des modifications importantes parmi les quelles

**Les modifications membranaires du spermatozoïde** : pendant la maturation épидидymaire et au cours de l'éjaculation, des protéines issues de l'épididyme et des glandes annexes se fixent au glycocalyx des spermatozoïdes et inhibent leur pouvoir fécondant en stabilisant la membrane (**SIDHU et GURAYA, 1987**)

Au cours de la capacitation, trois types de changements sont en cause selon la nature de la liaison de ces protéines avec la membrane plasmique

Des protéines liées au glycocalyx par des liaisons non covalentes sont relarguées dans les voies génitales féminines (**VILARROYA et SCHOLLER, 1987**)

Des protéines de structure ou d'origine épидидymaire incorporées dans la membrane subissent une perte de résidus glucidiques confirmée par la disparition progressive, au cours de la capacitation, de lectines fixées à la surface du spermatozoïde (**KOEHLER JK, 1981**)

Des protéines peuvent migrer et se redistribuer localement pour créer des zones fluides, pauvres en protéines, qui sont les futurs points de fusion, lors de la RA, entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe (**SUZUKI, ANAGIMACHI, 1989**). selon le modèle proposé par Davis et al. (**DAVIS, BYRNE, HUNGUND, 1979**), la déstabilisation de la membrane du spermatozoïde serait liée à la diminution du rapport cholestérol / phospholipides associée à une augmentation de la perméabilité au Ca<sup>+</sup>

**Changement de motilité** : le phénomène de capacitation s'accompagne d'une transformation des paramètres du déplacement des spermatozoïdes en un mouvement non linéaire, caractérisé par un battement flagellaire de forme asymétrique et de forte amplitude. Ce mouvement particulier des spermatozoïdes capités est appelé « hyper

activation » (**YANAGIMACHI , 1981**), l'entrée de  $Ca^{++}$  dans la cellule, liée à la déstabilisation de la membrane, permettrait l'activation d'une adénylcyclase- $Ca^{++}$ dépendante.

L'augmentation du taux d'AMPc alors observée serait responsable de la phosphorylation de la tubuline et du changement de motilité(**SIDHU et GURAYA ,1989**) ,lors de leur transit dans les voies génitales féminines , la progression des spermatozoïdes est assurée par des battements flagellaires symétriques avec une fréquence importante et une faible amplitude , lors qu'ils parviennent au voisinage de l'ovocyte , les spermatozoïdes capités présentent alors cette mobilité hyperactive et faiblement progressive , chez l'homme , à la différence d'autres Mammifères , la proportion de spermatozoïdes hyperactives est faible et voisine de 20%(**HAMAMAH, (1995)**

\*In vitro la capacitation peut être réalisée artificiellement grâce à des milieux capacitants ,

Le milieu capacitant à une composition qui permet de recréer un environnement semblable à celui retrouvé dans le tractus génital femelle. Il contient généralement une source d'énergie (glucose, pyruvate, lactate), du  $Ca^{2+}$ , du  $HCO_3^-$ , un facteur capacitant, tel l'héparine, ainsi qu'un accepteur de cholestérol, tel que l'albumine de sérum ti].

Les spermatozoïdes peuvent être capités à des températures variantes entre 37°C et 38°C. la technique la plus simple la séparation des spermatozoïdes du liquide séminal, soit par lavage-centrifugation douce ou à l'aide d'un gradient discontinu de densité de type pure –sperm\*(Nidacon Interational),Goteborg, suède). (**Boitrelle et al 2004**)

\*la migration ascendante, qui peut s'effectuer à partir du sperme (consiste à déposer le sperme sous le milieu de migration et à laisser migrer les spermatozoïdes pendant une heure à 37°C(**CHAN et al 1998**) ou à partir d'un culot de spermatozoïdes obtenus après un ou deux lavages centrifugation(est utilisé depuis longtemps en FIV(**MAHADEVAN et BAKER 1984**) et s'est largement répandue ,après la centrifugation , le surnageant est éliminé et 1ml de milieu approprié est déposé au –dessus du culot spermatique la durée de la migration est de 30minutes à une heure selon la qualité du sperme

---

Lavage –centrifugation de spermatozoïdes non sélectionnés, cette méthode très simple consiste à diluer le sperme dans un milieu adéquat et de le centrifuger pendant 10 minutes à 300 ou 600g(**DE VOS ,1997**), Divers composés ont été utilisés pour la constitution des gradients de densité à l'heure actuelle sont employés la silice colloïdale et le iodixanol ,le « **PURESPERM** » (**NidaCon,Goteborg,Suède**) ou « **L'ISOLATE** »(**Irvine Scientific,Santa Ana,CA,USA**), qui sont également des solutions de silice colloïdale recouverte de silane et agréés pour un usage humain(**MATHIEU ,1999**) .

\*L'augmentation de l'hyper activation d'un milieu de culture à l'autre a donc deux impacts : l'un diagnostic et l'autre thérapeutique, la validité diagnostique intrinsèque de la cinétique spermatique d'hyper activation est donc indissociable des conditions de préparation, un sperme possède des critères favorables si l'amélioration des caractéristiques cinétiques après l'incubation est plus de 25% par rapport à celle observées dans le plasma séminale, L'importance du milieu de capacitation dans la capacitation complète les données de kraemer et al(**kraemer,1998**) concernant la température, le profondeur des chambres de lecture et les paramètres de l'analyseur.( **Benon et Linet, 2005**)

\* l'intérêt de la capacitation a été observé après L'étude du test de fixation des spermatozoïdes à la ZP qui a montré que l'interaction spermatozoïdes /ovocytes est corrélée positivement avec les paramètres de la motilité analysée par vidéo micrographie assistée par ordinateur : la VCL, la VSL et l'ALH,La performance du test nécessite une maturation épидидyme préalable des spermatozoïdes en particulier l'ontogenèse des sites spermatiques de reconnaissance pour la ZP, une altération de cette étape de maturation abouti à des échecs de reconnaissance et de fixation à la ZP . Le test peut prédire le résultat de la FIV et orienter vers la bonne technique d'assistance médicale à la procréation(**AMP**) (**J.j2012**)

\* L'installation du système CASA Hamilton Thorne CEROS II Clinical® au sein du laboratoire d'AMP au niveau du secteur de spermologie thérapeutique a pour objectif de standardiser la mesure de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes tout en diminuant la variabilité intra et inter-opérateurs ainsi que la possibilité d'analyse fine du mouvement spermatique grâce aux paramètres cinétiques, le CASA a su démontrer son efficacité pour obtenir avec précision une concentration spermatique finale du capacitat pour FIV ou ICSI satisfaisante car comprise dans les limites acceptables fixées, les spermatozoïdes

---

hyperactives sont ceux répondant aux critères suivants :ALH5 $\mu$ m,VCL100 $\mu$ m/s, LIN(VSL/VCL)60%pour un spermatozoïde ait la force propulsive suffisante pour franchir les différentes barrières le séparant de l'ovocyte ,on estime que l'ALH ne doit pas être inférieur à2 $\mu$ m et que la VSL ne doit pas être inférieur à 25 $\mu$ m /s .

Pour l'analyse de la mobilité spermatique, les différences étaient principalement expliquées par une surestimation de la mobilité en méthode manuelle liée au fait que l'estimation dépend de la concentration, de la rapidité du balayage visuel de l'opérateur, de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes, de la tendance de l'œil humain à être attiré par les spermatozoïdes rapidement progressifs sous-estimant alors les mobiles sur place et les immobiles (**Davis Katz 1992 ; Tomlinson et al. 2010**).

D'autre part les résultats obtenus par les systèmes CASA étaient plus exacts et objectifs que ceux obtenus par la méthode manuelle (**Garrett et al. 2003**).

Les avantages de la méthode CASA sont une meilleure réponse aux exigences qualité du COFRAC grâce à une standardisation et une objectivité des résultats ainsi qu'une meilleure précision en comparaison à une méthode manuelle subjective et d'une forte variabilité.

De plus, cette méthode est plus rapide en permettant l'analyse simultanée de la concentration et de la mobilité

Spermatique. Une traçabilité améliorée des résultats est possible grâce à l'enregistrement informatique des résultats ainsi que des séquences vidéo correspondantes pouvant être ré analysées à distance, ce qui n'est pas possible avec la méthode manuelle en raison de l'impossibilité de renouveler l'analyse d'un échantillon de sperme frais au-delà d'une heure suivant le recueil..

La méthode CASA a su démontrer, en plus de ses bonnes performances, sa concordance avec la méthode manuelle permettant alors son utilisation en routine pour l'analyse des paramètres spermatiques.

Le système CASA se présente alors comme une option pratique pour l'étude de l'hyperactivation du spermatozoïde. Bien que la relation entre hyperactivation des spermatozoïdes et taux de fécondation ne soit pas

Clairement identifiée, l'évaluation des caractéristiques dynamiques du spermatozoïde hyperactivé grâce au

Système CASA pourrait permettre de prédire l'aptitude du spermatozoïde à la fécondation in vivo et in vitro ainsi qu'orienter la prise en charge de l'infertilité (**Mortimer et al. 2000**).

Ainsi, l'évaluation de l'hyperactivation pourrait être intéressante mais cela nécessite certaines condi

tions à respecter telles que la fréquence d'acquisition (**Lu et al. 2014**) ou encore la profondeur de chambre

(20  $\mu\text{m}$ ) par exemple, De plus, certaines difficultés persistent à ce jour dans

L'établissement des algorithmes permettant l'analyse de cette hyperactivation (**Mortimer et al. 2015**).

Plusieurs études ont démontré que la mesure de la concentration et les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes mobiles progressifs par les systèmes CASA sont liés de manière significative aux taux de fécondation in vitro et in vivo, ainsi que le délai nécessaire pour concevoir (**Liu et al. 1991a ; Barratt et al. 1993 ; Irvine et al. 1994 ; Krause 1995 ; Donnelly et al. 1998 ; Larsen et al. 2000 ; Garrett et al. 2003 ; Shibahara et al. 2004 ; Fréour et al. 2010**).

En effet, il a été montré que la VCL (**Hirano et al. 2001; Li et al. 2003; Shibahara et al. 2004**), la VSL (**Liu et al. 1991; Hirano et al. 2001; Li et al. 2003; Ren et al. 2004**), le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides (**Hirano et al. 2001; Shibahara et al. 2004**), l'ALH (**Hirano et al. 2001; Fréour et al. 2010**), la LIN

(**Liu et al. 1991**) et la VAP (**Liu et al. 1991; Li et al. 2003**) sont les paramètres qui peuvent prédire le succès ou non de la fécondation in vitro.

L'augmentation modérée mais actuelle de l'utilisation des systèmes CASA en routine dans les laboratoires d'aide médicale à la procréation pourrait alors permettre d'intégrer ces paramètres cinétiques en routine et ainsi évaluer l'impact de leur utilisation sur les résultats de FIV dans l'objectif d'améliorer et de mieux adapter la prise en charge des couples. (**Hamilton ,2019**).

\* La motilité est considérée hyperactive lorsque l'ALH et la VCL dépassent des limites seuils préétablies et que la LIN diminue, La particularité de ce mouvement est une grande vitesse, associée à des mouvements céphaliques latéraux de grande amplitude, et à des mouvements flagellaires importants et asymétriques .

\* prédire que les paramètres cinétiques spermatiques (Le déplacement latéral de la tête (ALH), la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse linéaire (VSL) et la linéarité (LIN : VSL/VCL) liée à l'hyperactivation dans un milieu capacitant augmente de manière significative l'ALH, la VSL avec une augmentation moins importante VSL, Ceci semble donc bien caractériser une

augmentation significative du nombre de spermatozoïdes hyperactives et donc ,la capacitation in vitro à une éventuelle valeur prédictive sur les résultats de technique de la procréation médicale assistée **(FIV,ICSI)**

## Conclusion

---

### La conclusion

Le but principal de notre étude analytique était d'évaluer les certains paramètres cinétiques spermatique liée à l'hyper Activation des spermatozoïdes humains après l'activation in vitro à l'aide d'une analyse informatisée(**CASA**),

La validité diagnostique de la cinétique de l'hyper activation est indissociable des conditions de préparation, Une préparation standardisée est le pendant d'une évaluation et validation scientifique de cette technique

En thérapeutique, s'il semble souhaitable d'obtenir des caractéristiques cinétiques plus élevées, les résultats, devront être validés par les tests cliniques

Des systèmes d'analyses assistés par ordinateur (**système CASA**) garantissent une mesure automatique et objective, ces systèmes **CASA** permettent de détecter des anomalies de mobilité imperceptibles en microscope.

Cette analyse du mouvement dans le plasma séminal est informative dans les stérilités inexplicables ou en cas d'échec inattendu en FIV au regard du Spermogramme, Cependant, elle néglige l'hyper activation et extrapole des informations sur une réaction qui N'a pas encore eu lieu, Après lavage –sélection et l'incubation dans un milieu capacitant, l'apparition d'un pourcentage de gamètes hyperactives est une information complémentaire qui pourrait ainsi refléter l'aptitude des spermatozoïdes à pénétrer la zone pellucide .

## Références bibliographiques

---

### Références Bibliographiques

1. **Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP (1990)** Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile men *Int J Androl* 13:452-62.
2. **AUSTIN CR.** Capacitation of spermatozoa. *Int J Fertil* 1967 ;12:25-31.
3. **Austin, C.R. 1992.** Capacitation and its sequelae. *Reprod Fertil Dev* .4:459-499.
4. **Arnoult, C., I.G.Kazam, P.E .Visconti , G.S.Kopf , M. Villaz ,and H.M .Florman. ,1999:**Control of the low voltage –activated calcium channel of mouse sperm by egg
5. **Arslan M, Morshedi M, Arslan EO et al (2006)** Predictive value of the hemizona assay for pregnancy outcome in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination . *Fertil Steril* 85:1697-707.
6. **Asquith KI.** Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition . *J Cell Sci* .2004. Jul 15 ;117(16) :3645-57.
7. **Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G .** Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction :role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways . *Front Biosci* . 1996.1:189-205.
8. **Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID.** Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril* . 1993 Sep;60(3):520–5.
9. **Bi, Y., W.M. Xu, H.Y. Wong, H .Zhu, Z.M .Zhou, H.C. Chan, and J.H. Sha., 2009 . :** NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian J Androl* .11:229-239.
10. **Beardsley A .** Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats . *Biol Reprod* .2002 Oct 30; 68(4):1299-307.
11. **Berruti G Paiardi C.** Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*.2011 Apr 1; 1(2):95-8.
12. **Burkman L J .** Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic spermatozoa populations. *Arch Androl* 1984; 13: 153-65.
13. **CHAN S.Y.W., CHAN Y.M., TUCKER M J.:** Comparison of characteristics of human spermatozoa selected by the multiple tube swim-up and simple discontinuous percoll gradient centrifugation. *Andrologia*, 1991, 23:213-21.

## Références bibliographiques

---

- 14 .Costello S,Michelangeli F,Nash K,Lefievre L,Morris J,Machado-Oliveira G,Barratt C,kirkman –Brown J,Publicover S.**Ca<sup>2+</sup>-stores in sperm:their identities and fuctions. *Reproduction* .2009 Aug 24;138(3):425-37.
- 15.DAVIS BK., BYRNE R., HUNGUND B.:** Studies on the mechanism of capacitation . II. Evidence for lipidtransfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257-266.
- 16.Davis RO, Katz DF.** Standardization and Comparability of CASA Instruments. *J Androl.* 1992 Jan- Feb;13(1):81–6.
- 17.De Geyter C, De Geyter M, Koppers B, Nieschlag E .**Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod*1998; 13:2517-20.
- 18.De Mateo S, Gàzquez C ,Guimerà M,Balasz J ,Meistrich ML,Ballescà JL,Oliva R** protamine 2 precursors(Pre-P2),protamine1 to protamine 2 ratio(p1/p2), and assisted reproduction outcome.*Fertil Steril.*2009 Mar;91(3) :715-22.
- 19.De Mateo S,Ramos L, Van der Vlag J,de Boer P,Oliva R.**Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation .*Int J Androl.*2010Jun 20;34(3):256-67.
- 20.DE VOS A., NAGY Z.P., VAN DE VELDE H.,JORIS H.,BOCKEN G.,VAN STERIRTEGHEM A :** Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection .*Hum. Reprod.*, 1997,12:1980-1984.
- 21.DODSON W.C.,MOESSNER J., MILER J.et al :** A randomized comparison of the methods of sperm preparation for intra-utérine insemination. *Fertil. Steril* .,1998,70:574-575.
- 22.Donnely ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W.** In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril.* 1998 Aug; 70(2):305–14.
- 23.Esteves SC ,Sharma RK , Thomas AJ, Agarwal A(2007)** Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimes by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test .*Int Bras J Urol* 33:364-74.
- 24.Flesch,F.M.,and B.M.Gadella.,2000:**Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization .*Biochim Biophys Acta.*1469:197-235.
- 25. Gadella BM , Tsai P-S, Boerke A ,Brewis IA.**Sperm head membrane reorganization during capacitation .*Int J Dev Biol.*2008;52(5-6):473-80.

## Références bibliographiques

---

- 26. Gadella, B.M., and R.A. Harrison ., 2000.** The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the sperm plasma membrane .Development .127:2407-2420
- 27. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HWG.** Automated semen analysis: “zonapellucida preferred” sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. Hum Reprod. 2003 Aug; 18(8):1643–9
- 28. Griffith CS, Grime DA 1990** The validity of the postcoital test .Am J Obstet Gynecol 162:615-20.
- 29. GRIZARD, G; JIMENEZ, C.** Les examens du sperme dans l’exploration de la fertilité masculine. Progrès en Urologie, 1997, 7, 496-504.
- 30. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C et al.** Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. J Assist Reprod Genet. 2001 Apr; 18(4):213–8.
- 31. Honda ,A., J. Siruntawinetti et T. Baba .2002 .** Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. Hum Reprod Update .8:405-412.
- 32. Inaba K. Sperm flagella:** comparative and phylogenetic perspectives of protein components .Mol Hum Reprod .2011 Jul 14; 17(8):524-38.
- 33. Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA, Masterton A, Taylor A. Andrology:** A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. Hum Reprod. 1994 Dec; 9(12):2324–34.
- 34. Jouannet P, Serres C.** Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. Médecin/sciences. 1995; 4(11):555–62.
- 34. KOEHLER JK:** Lectins as probes of the spermatozoon surface . Arch Androl 1981; 6: 197-217.
- 35. Konno A, Setou M , Ikegami K .** Ciliary and flagellar structure and function-their regulations by posttranslational modifications of axonemal tu .1 st ed. International review of cell and molecular biology. Elsevier Inc; 2012. PP.133-70.

## Références bibliographiques

---

- 36. kraemer M,Fillon C,Martin-Pont B,Auger J .**Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis ,Hum Reprod 1998;13:6119.
- 37.Krause W.** Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. Hum Reprod. 1995Oct;10(Suppl1):60–6.
- 38.Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al.** Computer-Assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. Hum Reprod. 2000 Jul;15(7):1562–7.
- 39. Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY.**Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. Philos trans R Soc Lond , B, Biol Sci.2010 May 27;365(1546):1581-92
- 40.Lin ,Y.,and F.W.Kan.,1996:**Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation .Biol Reprod .55:1133-1146
- 41. Liu DY, Clarke GN, Baker WG.** Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates In Vitro. J Androl. 1991 Jul-Aug; 12(4):2319.
- 42. Li L, Ning Y, Yin H, Sun Z.** The application of computer assisted sperm analysis on in vitro fertilization. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2003 Jan;34(1):112–4, 154.
- 43.Luconi M.**Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-Kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein Kinase A.J Cell Sci.2004 Mar 1;(7):1235-46.
- 44.Lu JC, Huang YF, Lü NQ.** Computer-aided sperm analysis: past, present and future. Andrologia. 2014 May;46(4):329-38.
- 45.MAHADEVAN M.,BAKER G:** Assesment and preparation of semen for in vitro fertilization in wood C., Trounson A. Eds . Clinical in vitro fertilization. Springer Verlag .Berlin, 1984,p.83-97.
- 46. Moreno RD, Alvarado CP.**The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence.Mol Reprod Dev.2006; 73(11):1430-4.
- 47.Mortimer D Courtot AM,Giovangrandi Y et al.**Human spermatozoa motility after migration into, and incubation in,synthetic media.Gamete Res 1984;9: 131-44.

## Références bibliographiques

---

- 48. Mortimer ST.** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals' .Hum Reprod Update 1997; 3:403-39.
- 49. Mortimer ST.** CASA – Practical Aspects. J Androl. 2000 Jul-Aug;21(4):515–24.
- 50. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D.** The future of computer-aided sperm analysis. Asian J Androl.2015 Jul-Aug;17(4):545–53.
- 51. Navarro, B.,Y.Kirichok ,J.J.Chung, and D.E. Clapham.,2008:** Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa.Int J Dev Biol.52:607-613.
- 52. O'Donnell L,Nicholls PK,O'Bryan MK, Mclachlan RI, Stanton PG.** Spermiation: The process of sperm release .Spermatogenesis .2011 Jan 1;1(1):14-35.
- 53.Oehninger S,Franken DR,Sayed E,Barroso G, Kolm P.**Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVE therapy: A meta-analysis .Hum ReprodUpdate 2000;6 160-8.
- 54.Oehninger S,Franken DR,Sayed E et al.(2000 )**Sperm fuction assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy :a meta-analysis.Human Repro-duction Update 6:160-8
- 55. Olson,S .D .,L.J.Fauci , and S.S. Saurez .2011.**Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation . Mol Hum Reprod .17:500-510.
- 56. PEÑA MARTINEZ, A.I.**Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.  
Animal Reproduction Science, 2004, **82-83**, 209-224.
- 57. Ren SS, Sun GH, Ku CH, Chen DC.** Comparison of four methods for sperm preparation for IUI. Arch Androl. 2004 May-Jun;50(3):139–43.
- 58. Roberts Kp, Johnston DS, Nolan MA , Wooters JL , Waxmonsky NC , Piehl LB , Ensrud – Bowlin K , Hamilton D.**Structure and function of epididymal protein cysteine 6rich secretory protein -1. Asian J Androl .2007 Jul;9(4)508-14
- 59. RUSSEL L.D., ROGER S.T:** Improvement in the quality and fertilization potential of a human sperm population using the rise technique. Androl .,1987,8:25-33.
- 60.Saito K,O' Donnell L, Mclachlan RI,Robertson DM.** Spermiation Failure Is a Major contributor to Early Spermatogenic Suppression Caused by hormone withdrawal in adult rats\*.Endocrinology.2000 Aug;141(8):2779-85

## Références bibliographiques

---

- 61. SIDHU KS, GURAYA SS**, Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa .Int Rev Cytol 1989 ; 118:231-280.
- 62. Shibahara H, Naito S, Hasegawa A, Mitso M, Shigeta M, koyama** Evaluation of sperm fertilizing ability using the sperm Quality Analyser. Into J Androl 1997; 20: 112-7.
- 63. Shibahara H, Mitsuo M, Inoue M , Hasegawa A, Shigeta M , koyama K.** Relationship between human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection and the zona – free hamster egg penetration test .Hum Reprod 1998;13: 1928 -32.
- 64. Shibahara H, Hamada Y , Hasegawa A, Wakimoto E, Toji H, Shigeta M, et al.** Relationship between the sperm motility index assessed by the sperm quality Analyzer and the outcome on intracytoplasmic sperm injection Assist Reprod Genet 1999;16 : 540-5.
- 65. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A et al.** Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. Int J Androl. 2004 Apr;27(2):63–8.
- 66. Sperry AO.** The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell .Biology of the Cell .2012 Mar 14; 104(5): 297-305.
- 67. SUZUKI F., ANAGIMACHI R:** Changes in the distribution of intra –membrane particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster .Garnet Rcs 1989; 23:335-347.
- 68. Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, Newton T, Hopkisson J, Jayaprakasan K, et al.** Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. Fertil Steril. 2010 Apr;93(6):1911–20.
- 69. Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL, Moss SB.** Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-Hakap82 and hAKAP82. Mol Hum Reprod .1999 Sep;5(9):816-24.
- 70. Valbuena G, Hernandez F, Madrid JF, Sàez FJ.** Acrosome biosynthesis in spermatocytes and spermatids Revealed by HPA Lectin cytochemistry. Anat Rec.2008 Sep; 291(9):1097-105.
- 71. VILIARROYA S., SCHOLLER R.:** Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and the induction of acrosome reaction in vitro .J Reprod Fertil 1987; 80:545-562.
- 72. Yanigimachi R.** The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J Reprod Fertil 1970; 23: 193-6.

## Références bibliographiques

---

**73. YANAGIMACHI R,:** Mechanisms of fertilization in mammals . In: Fertilization and embryonic development in vitro. Mastroianni L, Biggers JD eds, New –York, Plenum Press,1981,81-187.

**74.Yanigimachi R.** Mamalian fertilization .The physiology of reproduction 1988; 135.

**75.Yanagimachi ,R .1994.** Mammalian fertilization .The physiology of reproduction .5: 189-312.