

# Aspects biologiques de la fertilité masculine II



**H. Lucas, A. de Agostini**

Avril 2003

# Introduction

- L 'analyse biologique des spermatozoïdes et du liquide séminal est une étape clé de l 'évaluation de la fertilité masculine
- Ces analyses donnent des indications sur la fonction testiculaire et sur l 'intégrité du tractus génital masculin

# Type d'essais

1. Descriptif : - spermogramme

2. Fonctionnel : - pénétration du mucus cervical (test post-coïtal et test de pénétration in vitro)  
- liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide  
- fusion des spermatozoïdes avec des ovocytes dépel-lucidés de hamster  
- gonflement hypo-osmotique du flagelle

3. Immunologique : - mixed agglutination test (MAR-test)  
- immunobead test.  
- sperm immobilization in cervical mucus

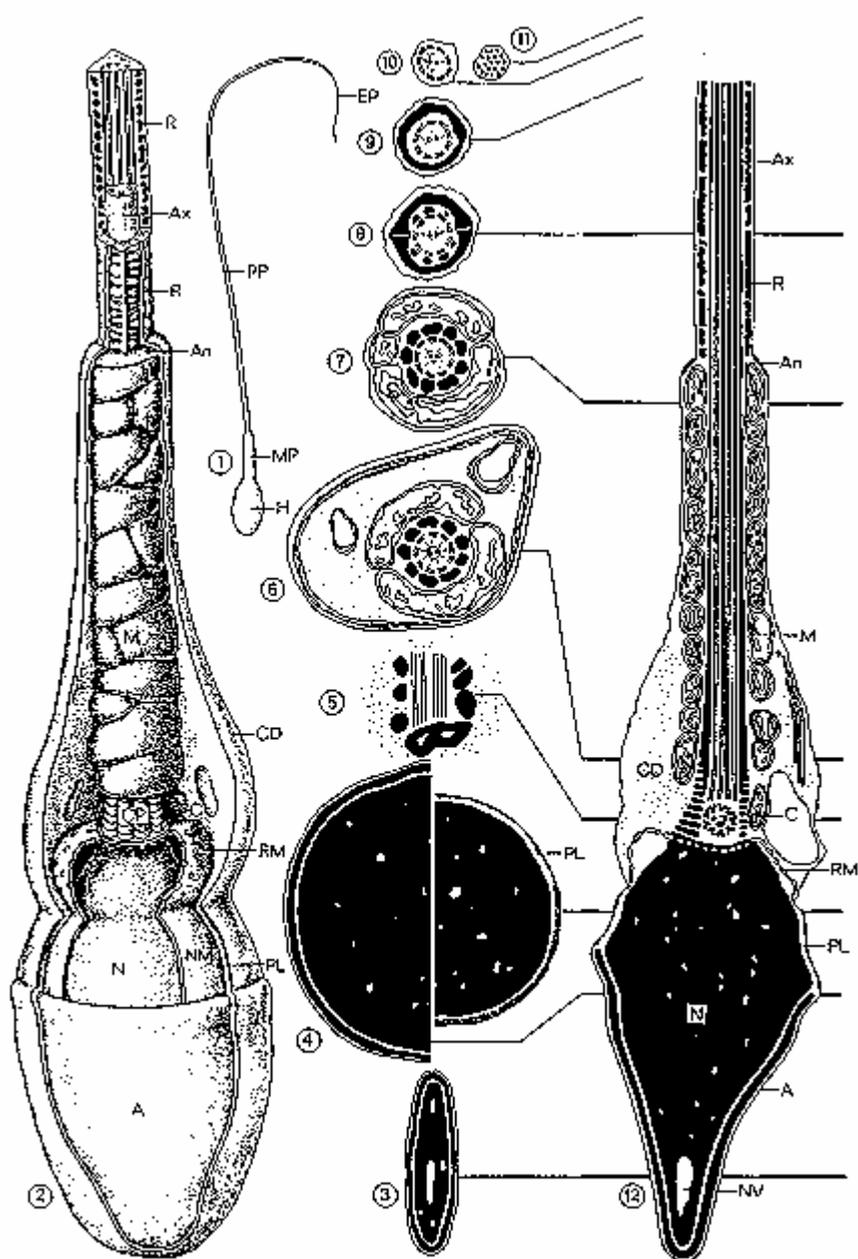


Figure 19.11. Structure of the mature spermatozoon. 1, the relative size of the head (H), midpiece (MP), principal piece (PP) and end piece (EP) is shown. 2, a three-dimensional cutaway drawing showing the acrosome (A), nuclear envelope and nucleus (N) in the head, the connecting piece (CP) of the neck, the mitochondria (M) in the midpiece, fibrous sheath (R), and axoneme (Ax) of the principal piece. 3 to 11, cross sections at the level indicated on diagram 12. (Courtesy of Dr. E. C. Roosen-Runge.)

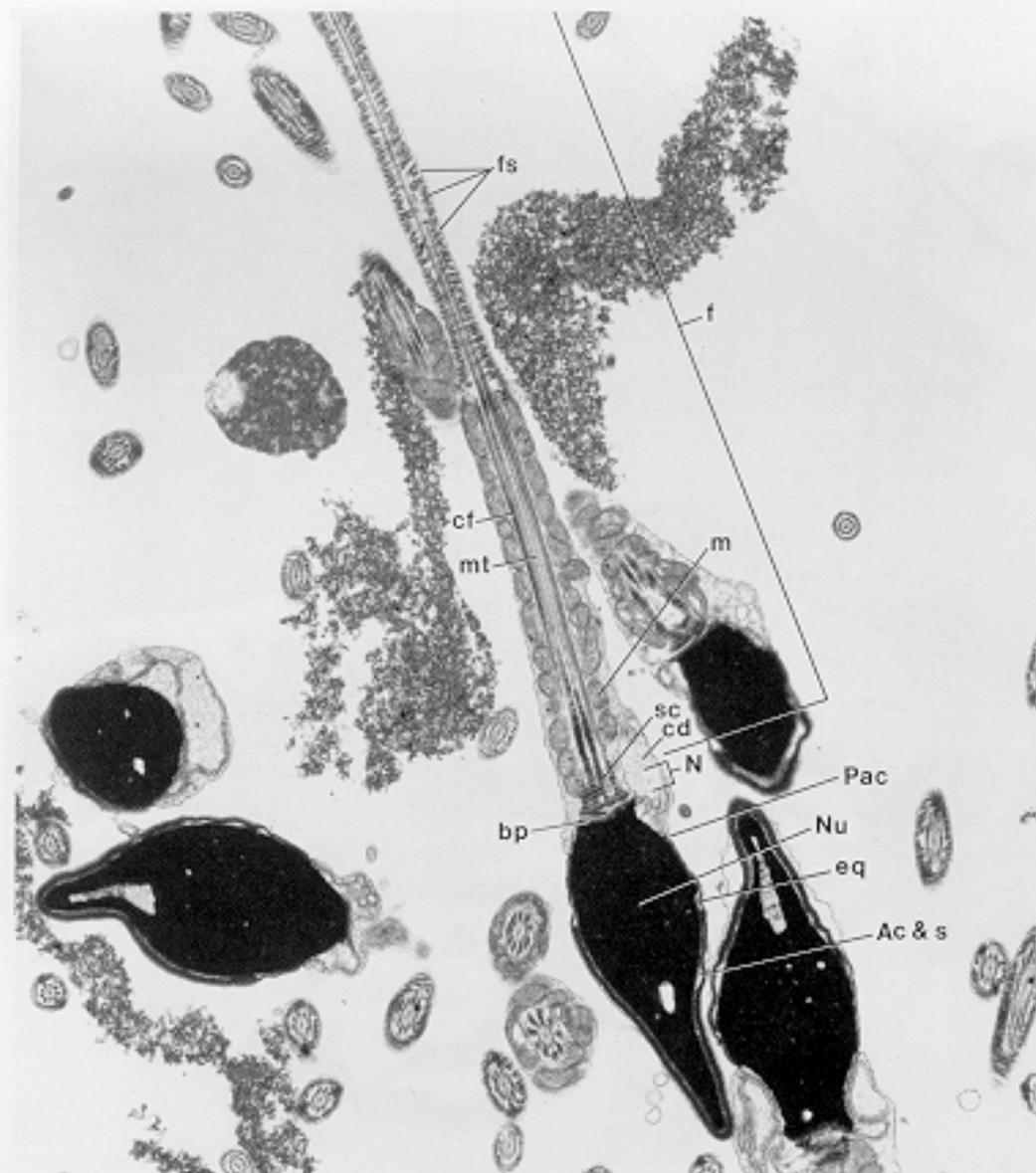
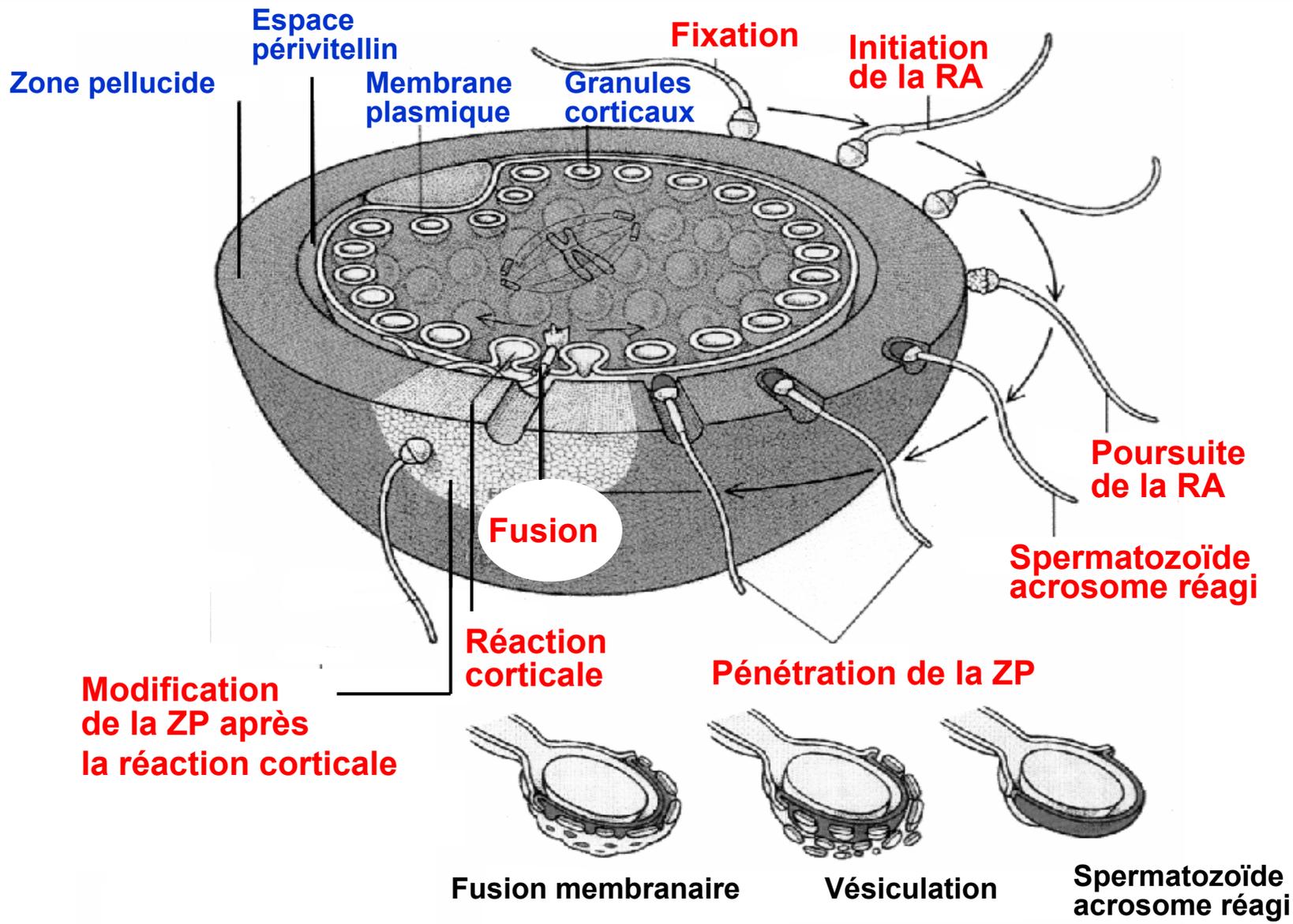


Figure 3.56. Longitudinal section of a normal spermatozoon. Nu = nucleus; Ac = acrosome; eq = equatorial region; Pac = postacrosomal region; cd = cytoplasmic droplet; sc = segmented columns of the proximal centriole; f = flagellum; bp = base plate; s = subacrosomal space; m = mitochondrion; N = neck; mt = microtubules; cf = coarse fibers. (Magnification: 17,400 ×.)



# L'analyse de sperme consiste en:

- analyse macroscopique
  - volume, pH, temps de liquéfaction
- analyse microscopique
  - concentration, mobilité et viabilité
- analyse immunologique
  - recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes
- analyse bactériologique
  - détection d'infection, en plus de la colonisation toujours présente
- évaluation de la morphologie des spermatozoïdes
  - examen détaillé de la morphologie de 100 à 200 spermatozoïdes
- analyse biochimique du plasma séminal
  - marqueurs des glandes annexes

# WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction

FOURTH EDITION



WORLD HEALTH ORGANIZATION

## *Valeurs de références des variables du sperme*

- Chaque laboratoire devrait déterminer ses propres valeurs de références pour chaque variable,
- Les valeurs de références devraient être basées sur les caractéristiques du sperme d'hommes ayant engendré un enfant moins de 12 mois avant l'analyse,
- Il faut environ 1000 échantillons, de telles références n'ont pas encore été établies,
- Les références utilisées sont basées sur des hommes fertiles et en bonne santé,
- Ces valeurs ne sont pas les valeurs minimales du sperme nécessaires à la conception,
- Des hommes avec des valeurs de sperme plus basses que celles indiquées peuvent être fertiles.

# ***Reference values of semen variables<sup>a</sup>***

<b>Volume</b>	2.0 ml or more
<b>pH</b>	7.2 or more
<b>Sperm concentration</b>	20x10 <sup>6</sup> spermatozoa/ml or more
<b>Total sperm count</b>	40x10 <sup>6</sup> spermatozoa or more
<b>Motility</b>	50% or more motile (grade a+b) or 25% or more with progressive motility (grade a) within 60 min after collection.
<b>Morphology</b>	*
<b>Vitality</b>	75% or more live
<b>White blood cells</b>	Fewer than 1x10 <sup>6</sup> /ml
<b>Immunobead test</b>	Fewer than 50% spermatozoa with adherent particles
<b>MAR test</b>	Fewer than 50% spermatozoa with adherent particles

<sup>a</sup>WHO manual, 4<sup>th</sup> edition, 1999.

\* Data from ART programmes suggest that, as sperm morphology falls below 15% normal forms, using the methods and definitions described in this manual, the fertilization rate in vitro decreases.

# Reference values of semen variables<sup>b</sup> (2)

## Seminal plasma biochemical analysis

### *Epididymal markers*

$\alpha$ -glucosidase (neutral) 20 mU or more per ejaculate

Carnitine 0.8-2.9  $\mu$ mole per ejaculate

### *Prostate markers*

Zinc (total) 2.4  $\mu$ mole or more per ejaculate

Citric acid (total) 52  $\mu$ mole or more per ejaculate

Acid phosphatase (total) 200 U or more per ejaculate

### *Seminal vesicle marker*

Fructose (total) 13  $\mu$ mole or more per ejaculate

—

<sup>b</sup>WHO manual, 3<sup>rd</sup> edition, 1992

- Certains des paramètres mesurés dans le spermogramme sont bien établis avec des valeurs de référence stables au cours du temps, comme :
  - le volume
  - le pH
  - la concentration minimale et le nombre absolu minimal de spermatozoïdes
  - la mobilité
  - la tolérance maximale en leucocytes
- Par contre, le pourcentage minimum de spermatozoïdes de morphologie normale a varié considérablement au cours du temps, de même que la définition de la morphologie normale.

# CASA

## Computer-Assisted Semen Analysis

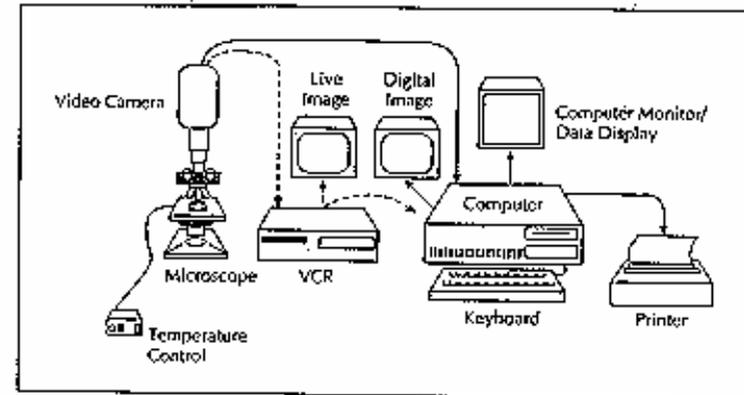


Fig 2.—Schematic diagram of a typical computer-aided sperm analysis system. VCR indicates videocassette recorder (from Boyers et al<sup>25</sup>).

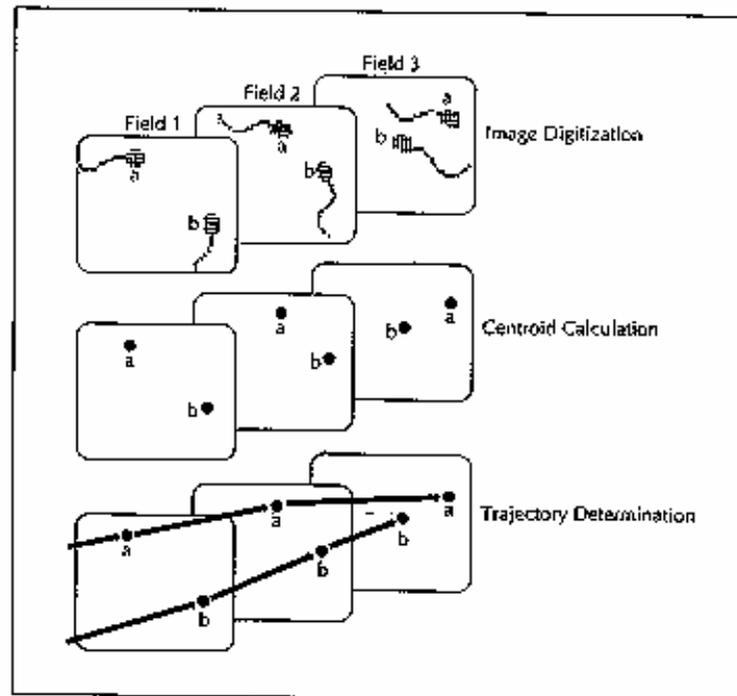
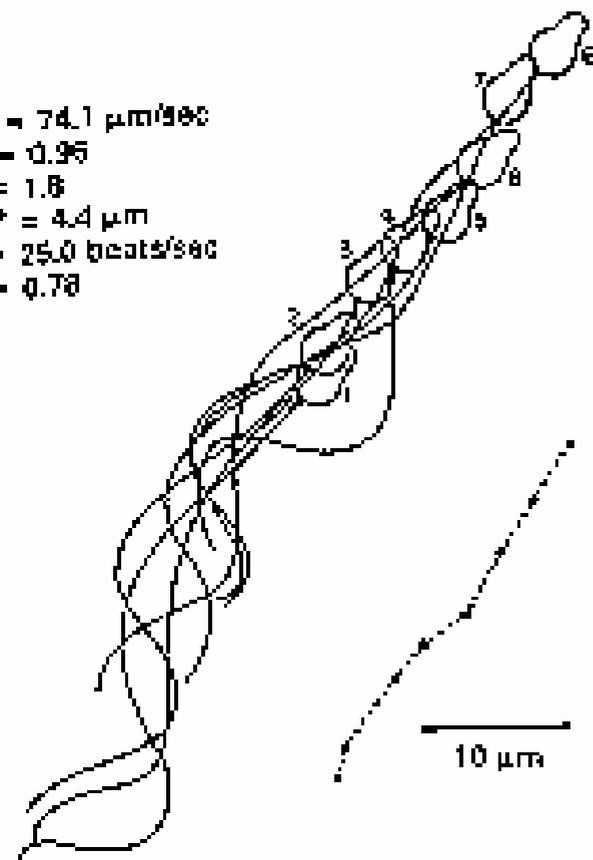


Fig 3.—Process of sperm digitization and calculation of sperm-swimming trajectories. The analog image of sperm cells is digitized in each video frame (top), the complete image of each cell is reduced to a centroid in each video frame (center), and sperm trajectories are computed from the centroids (bottom). a and b indicate two different sperm cells (from Boyers et al<sup>25</sup>).

*Hyperactivation of human spermatozoa*

(a)

VSL = 74.1  $\mu\text{m}/\text{sec}$   
LIN = 0.96  
Ah = 1.8  
AMP = 4.4  $\mu\text{m}$   
 $\partial F$  = 25.0 beats/sec  
CR = 0.78



(b)

VSL = 75.3  $\mu\text{m}/\text{sec}$   
LIN = 0.42  
Ah = 12.3  $\mu\text{m}$   
AMP = 11.3  $\mu\text{m}$   
 $\partial F$  = 17.8 beats/sec  
CR = 0.49

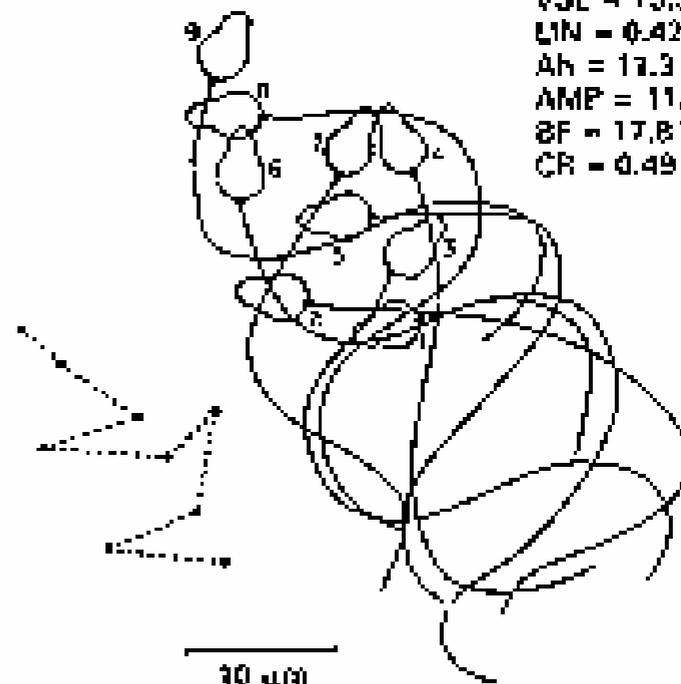
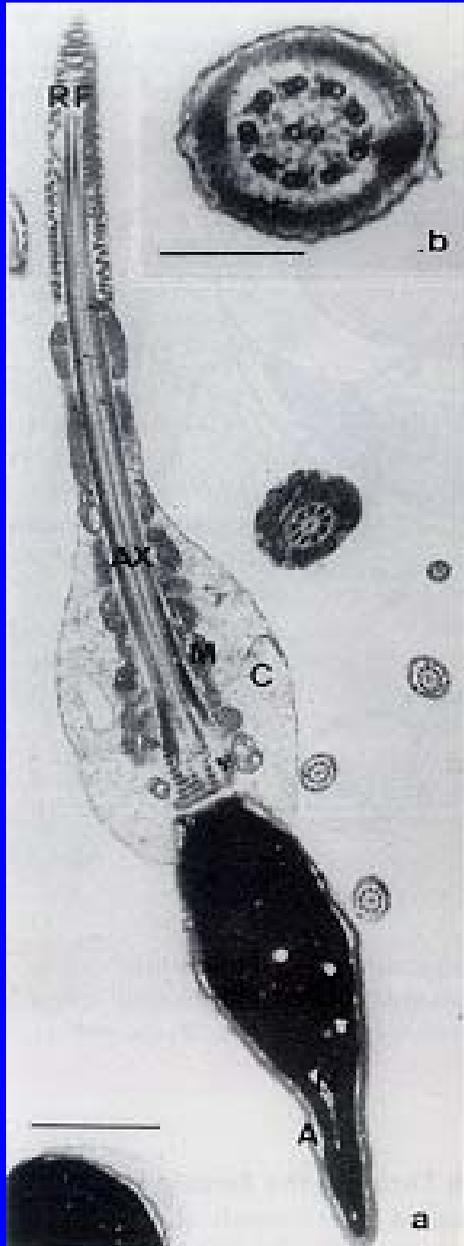


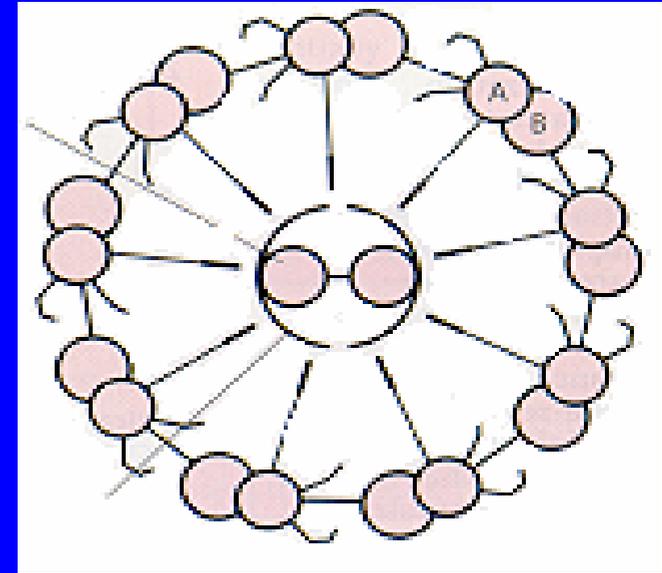
Fig. 3. Movement characteristics (see text for abbreviations) and swimming trajectories of a morphologically normal spermatozoon from a fertile donor at (a) T0 and (b) T6. Consecutive tracings are (a) 0-032 sec or (b) 0-049 sec apart. Points connected by broken lines represent the sequential position of the sperm head.

Morales et al. *J. Reprod. Fert.* 33:119, 1988.

# TROUBLES DE LA MOBILITÉ :



## LES DYSKINESIES FLAGELLAIRES



BRAS EXTERNES DE DYNÉINE : mobiles mais Tests Pénétration  
dans Glaire -

BRAS INTERNES DE DYNÉINE : Immotile Cilia,  
Kartagener syndrome.

TUBULES CENTRAUX : 9+0 Syndrome (*Neugebauer et al., 1990*)

## **BACTERIOLOGIE DU SPERME**

La bactériologie générale du sperme est toujours positive mais on trouve rarement des germes pathogènes.

### **Culture et antibiogramme**

- Culture Aerobe
  - Gram + germs
  - Gram - germs
  - Mixt germs
  - Anaerobe

### **Cultures sur milieux enrichis**

Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum: pathogenicity threshold  $10^4$  CFU/ml

### **PCR dans l'urine**

Chlamydia trachomatis: traitement par la tétracycline, pas de résistance connue.

## Micro-organismes capable de causer une infection du tractus génital

Classical germs	Aerobic, gram -	Aerobic, Gram +	Anaerobic
Chlymydia Trachomatis	E. Coli	Gardnerella Vaginalis	Bacteroides
Nesseria Gonorrhoeae	Enterobacter	Streptococcus Faecalis	Bifidobacterium
Treponema Vaginalis	Klebsiella	Staphylococcus Aureus	Fusobacterium
Mycoplasma	Proteus	Staphylococcus Epidermidis	Lactobacille
Ureaplasme Urealitique	Pseudomonas	Streptococcus Agalactiae	Peptococcus
Corynebacterium		Streptococcus Saprophyte	Propionibacter
			Peptostreptococcus

# Marqueurs biochimiques du plasma séminal

Le volume du sperme est constitué par la sécrétion séquentielle des glandes de Cowper (petit volume), de la prostate (25%),

- des testicules and epididymes (<10%)

et des vésicules seminales (66%).

Des marqueurs biochimiques spécifiques permettent de tester les sécrétions de ces différents compartiments.

**Nous utilisons couramment les marqueurs suivants :**

Vésicules séminales : Fructose

Prostate : Zinc

Epididyme : Carnitine

# EVALUATION D'UNE INFLAMMATION CHRONIQUE DU TRACTUS GENITAL MASCULIN

L'INTERROGATOIRE

L'EXAMEN CLINIQUE

L'ECHOGRAPHIE ENDORECTALE / TESTICULAIRE

LE SPERMOGRAMME

LA BIOCHIMIE DU PLASMA SEMINAL

LA SPERMOCULTURE

Faisceau  
d'arguments

Azoospermie —→ Oligospermie

Modification du type d'AMP (IA)

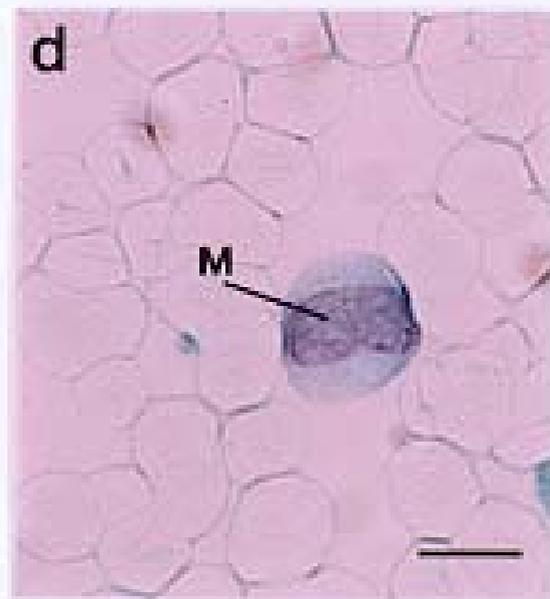
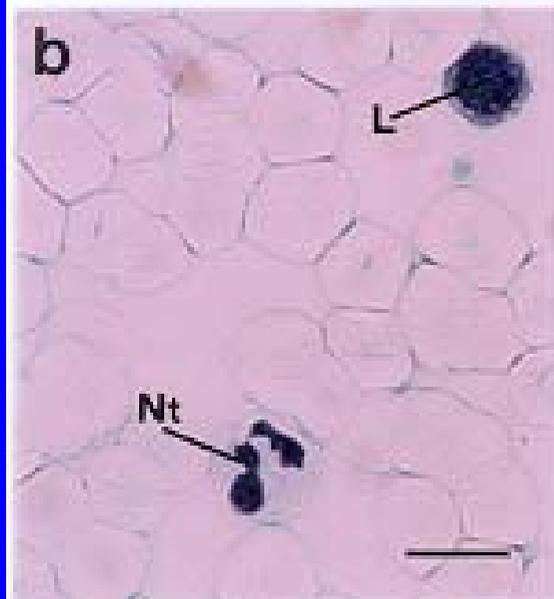
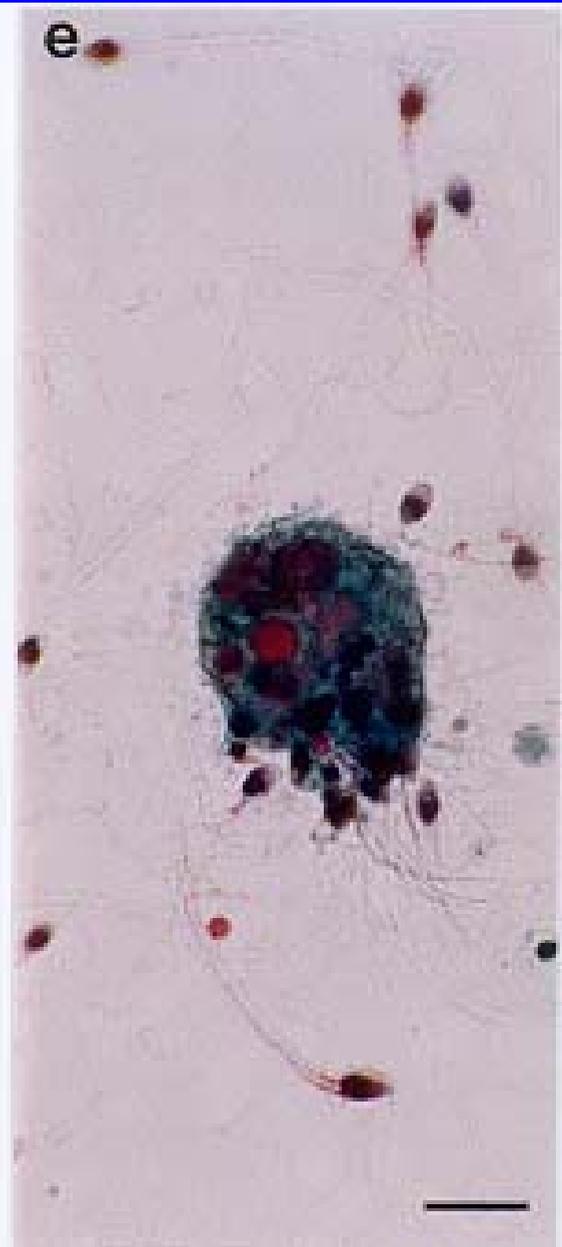
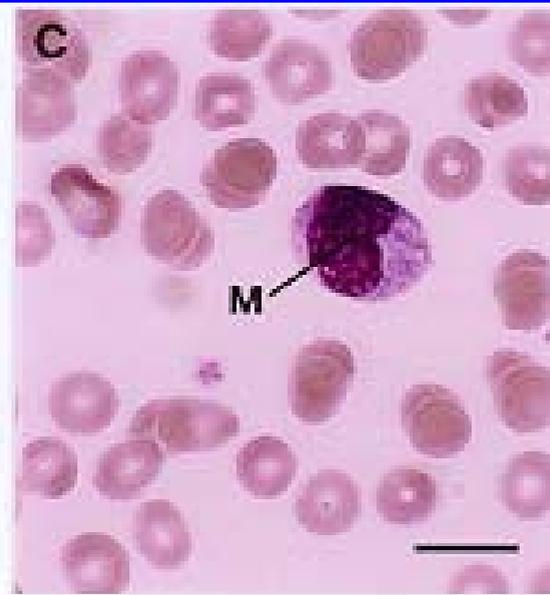
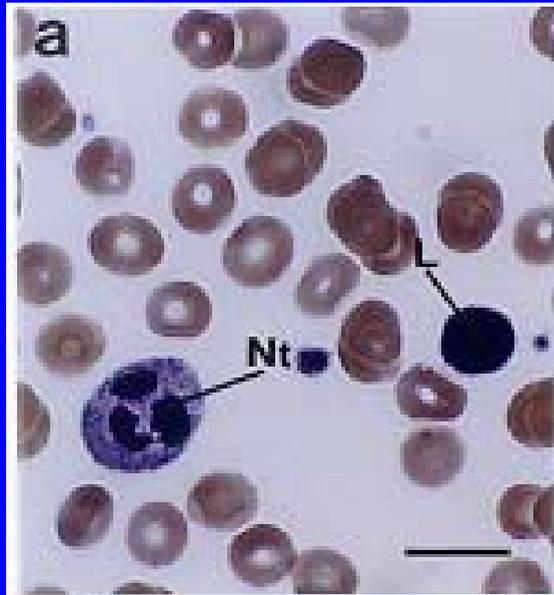
Amélioration de la Fécondance

Diminuer Apoptose des spz

OBJECTIFS

TRAITEMENT  
ATB + AINS

## Inflammatory cells in blood and semen



**TRAITEMENT D'UNE PROSTATITE CHRONIQUE ou  
D'UNE AUTRE INFLAMMATION CHRONIQUE  
du TRACTUS GENITAL MASCULIN**

**QUINOLONE II (OFLOXACINE 200 mg x 2/J)**

**ANTI-INFLAMMATOIRE NON STEROIDIEN 20 j**

puis

**METRONIDAZOLE (500 mg x 2/J) 10 j**

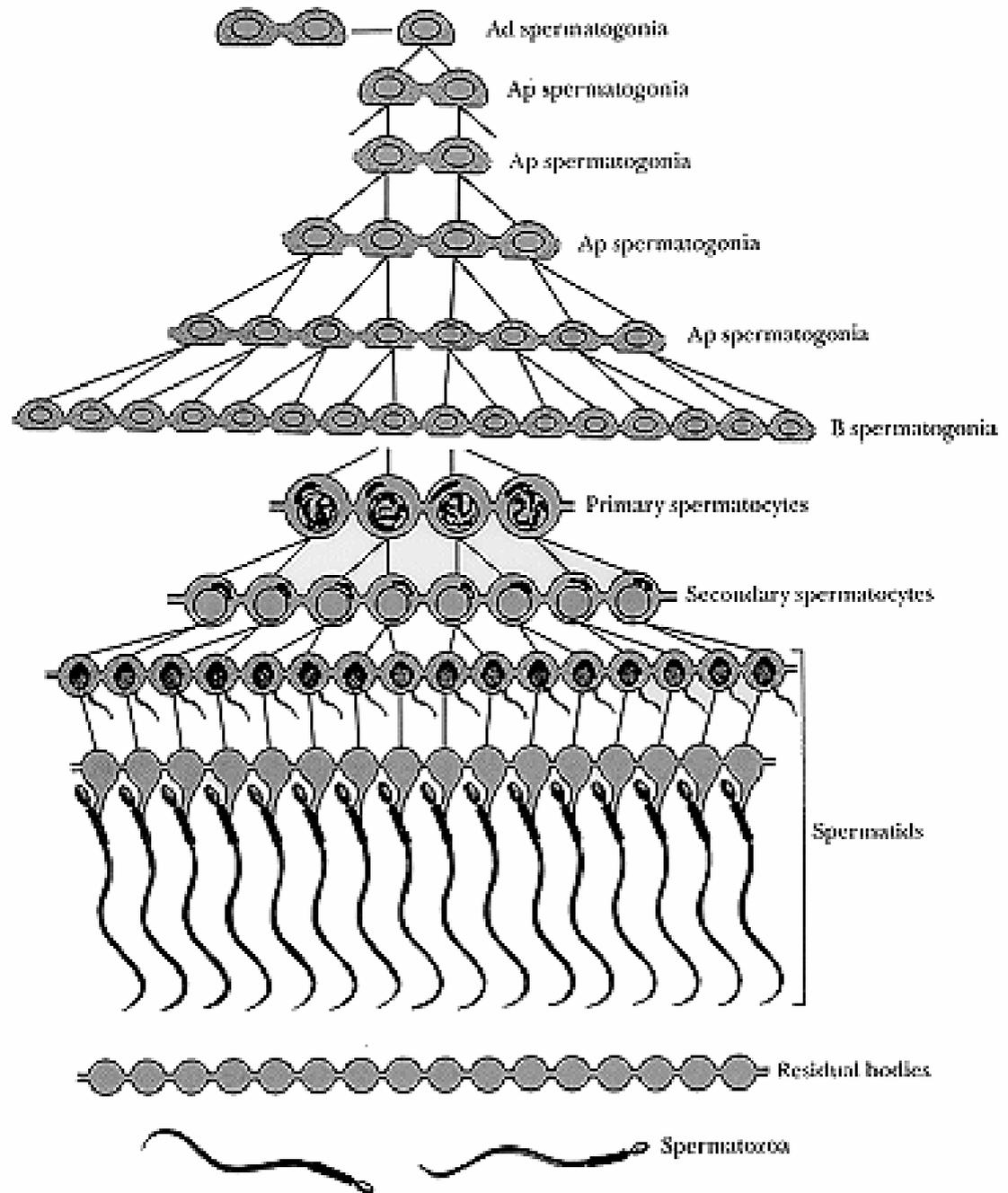
**DOXYCYCLINE (100 mg x 2/J) 16 j**

**PHASE 1**

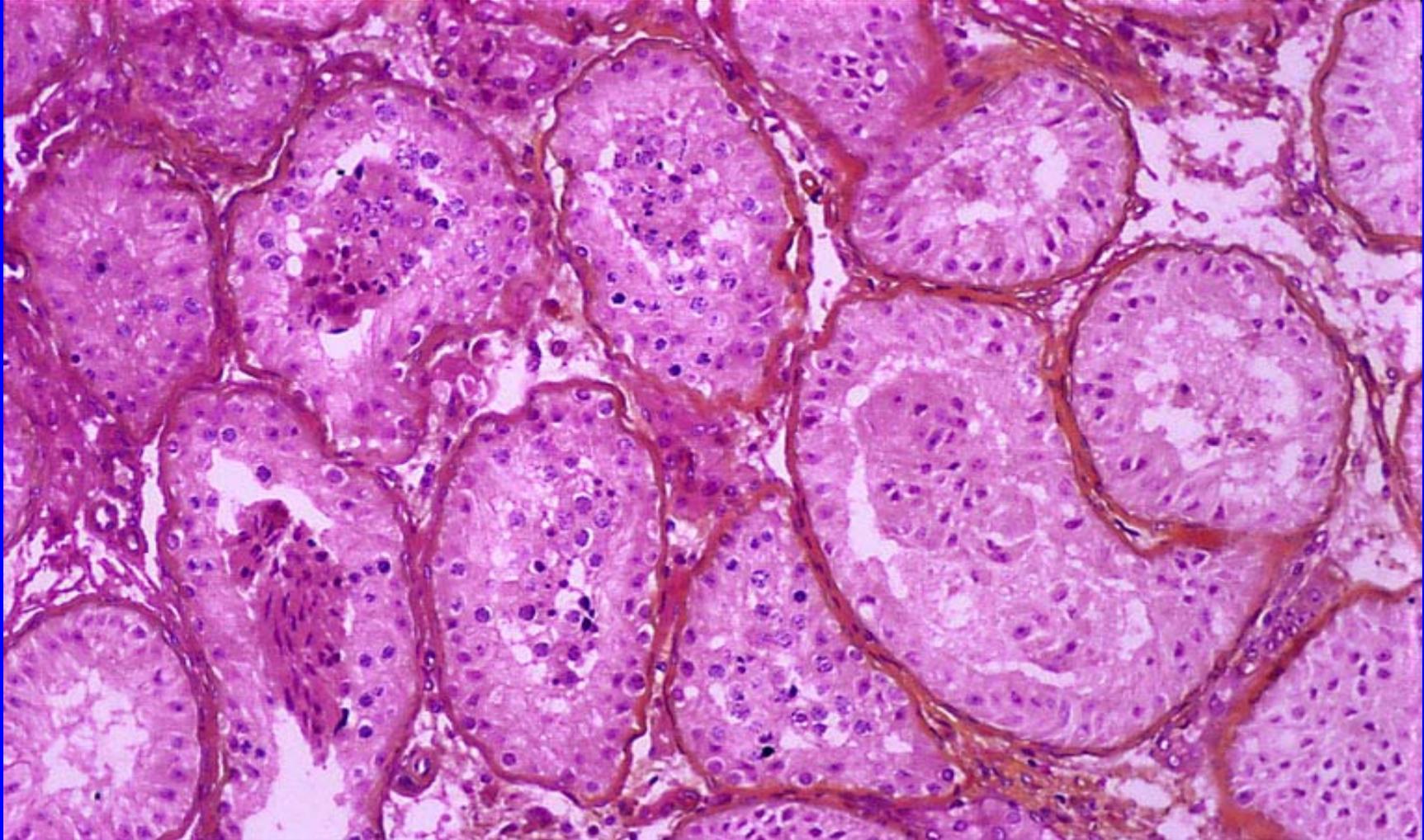
**PHASE 2**

**SPERMOGRAMME DE CONTRÔLE ( > 3 sem. Après la fin du traitement)**

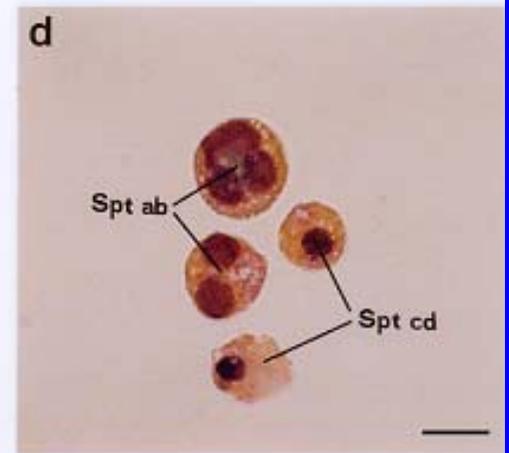
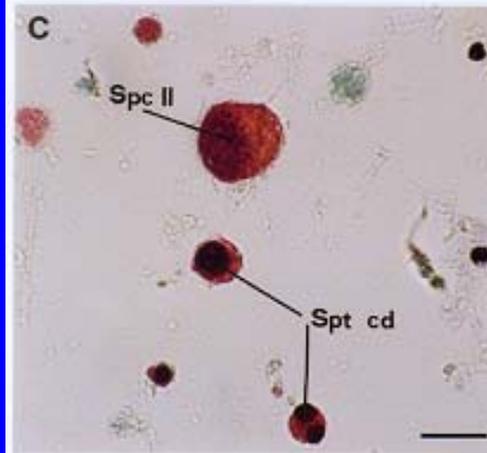
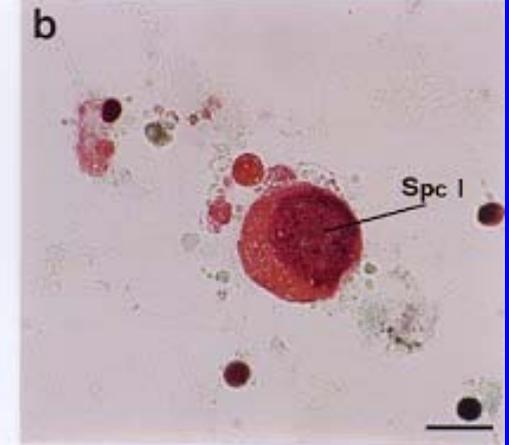
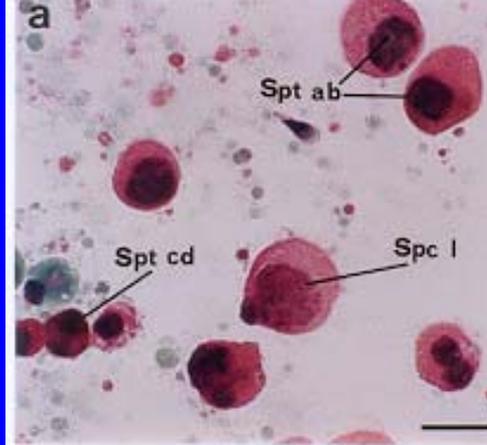
(Volume, Mobilité-Vitalité, Leucocytes, biochimie PS, SPCult, Clinique)



# Coupe d'un testis avec spermatogénèse normale



Immature germ cells in semen  
Papanicolaou staining



# Globozoospermia

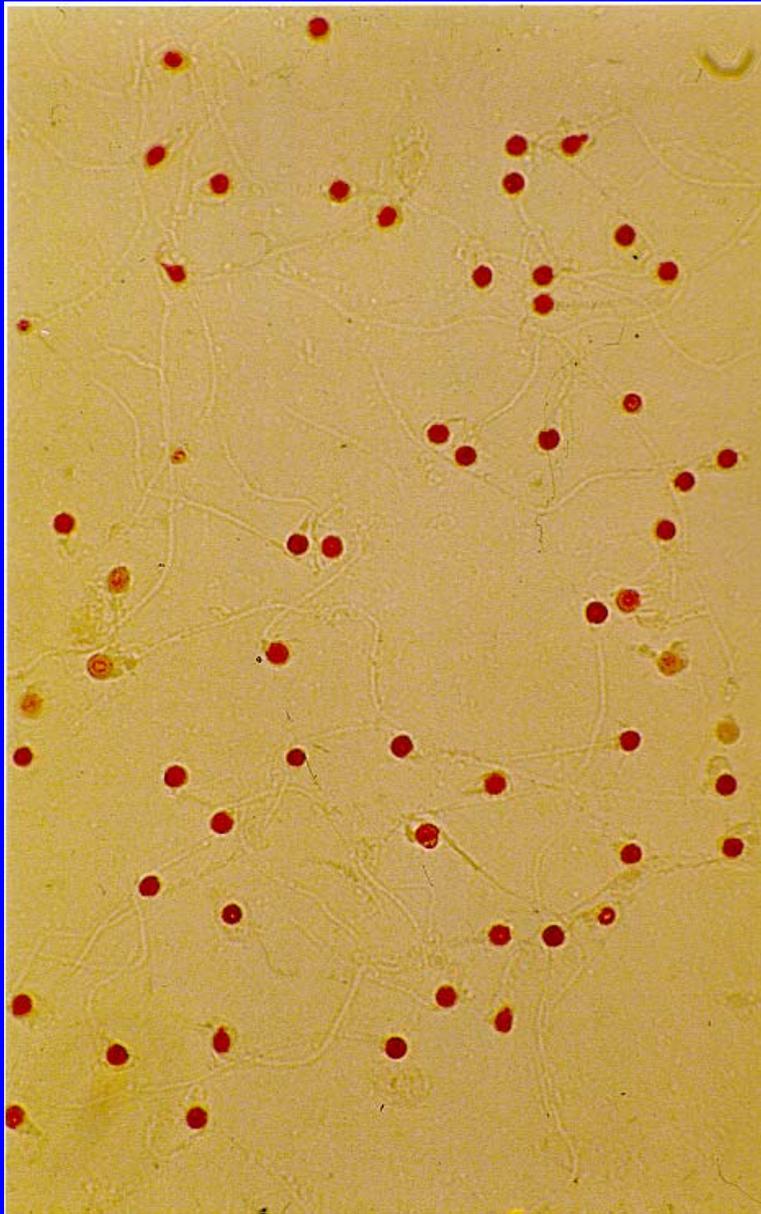
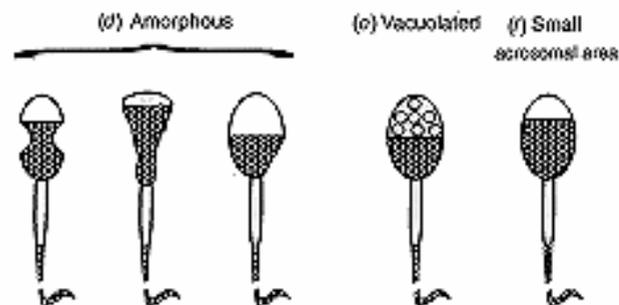
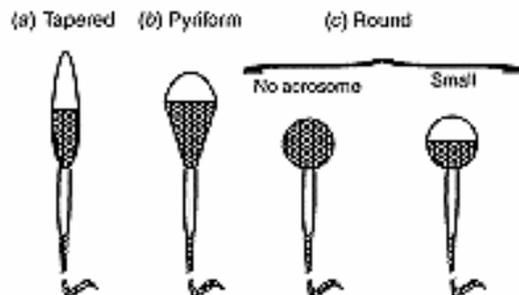


Figure 4.6. Transmission electron microscopy. Spermatozoa have spherically shaped nuclei, completely lacking both acrosome and postacrosomal sheaths.

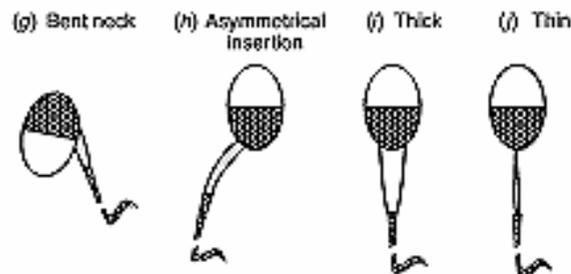
**Spermatozoa morphology,  
classification according to  
Tygerberg criteria (Kruger)  
Ref: WHO manual, 1999.**



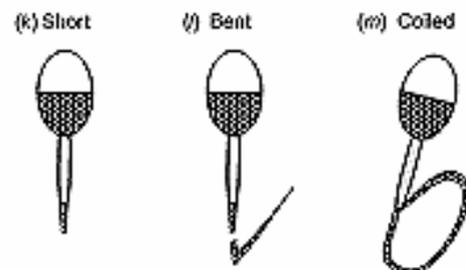
**A. Head defects**



**B. Neck and midpiece defects**



**C. Tail defects**



**D. Cytoplasmic droplet**



# Morphologie des spermatozoïdes humains.

## Têtes normales

- 1. 
- 2. 
- 3. 
- 4. 

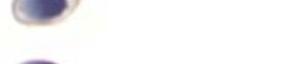
## Anomalies de la tête

- 5. Macocéphale 
- 6. Microcéphale 
- 7. Pyriforme 
- 8. Tapering 
- 9. Ronde (avec acrosome) 
- 10. Ronde (sans acrosome) 
- 11. Double tête (amorphe) 
- 12. Amorphe 
- 13. Amorphe 
- 14. Amorphe 
- 15. Amorphe 
- 16. Amorphe 

## Anomalies de la pièce intermédiaire

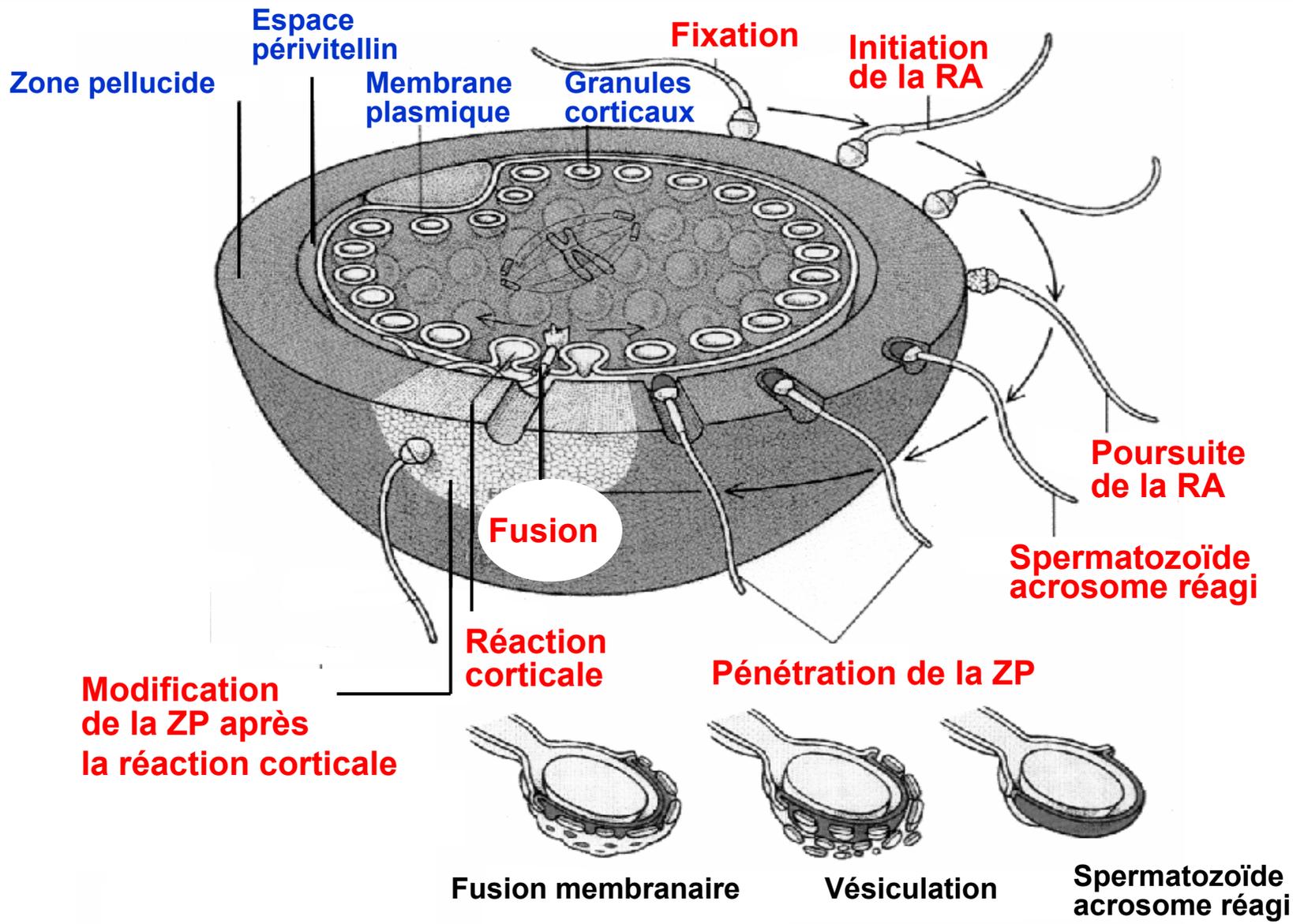
- 17. Reste cytoplasmique 
- 18. Angulation 

## Anomalies du flagelle

- 19. Double 
- 20. Court 
- 21. Enroulé 
- 22. " 
- 23. " 
- 24. Absent 
- 25. Angulé 

## **Certaines anomalies morphologiques peuvent compromettre la capacité fécondante des spermatozoïdes**

- Une anomalie de la pièce intermédiaire ou du flagelle peut gêner la mobilité
- Un acrosome incomplet ou absent peut empêcher la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte.
- Une tête trop volumineuse est un signe que la compaction de l'AND du noyau est incomplète
- En cas d'anomalies polymorphes de la tête des spermatozoïdes, il est impossible de présumer de leur fécondité



Le rapport entre la morphologie des spermatozoïdes et la fertilité dépend d'une évaluation à **deux niveaux distincts** :

- 1 Chaque spermatozoïde est évalué individuellement et classifié comme normal ou anormal suivant une **définition de la morphologie normale du spermatozoïde**.
- 2 Le pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale présents dans le sperme est évalué et relié à la fertilité suivant une **valeurs limite, au-dessous de laquelle la fertilité diminue**.

# Etablissement de normes valides pour les paramètres du sperme

- De vastes études multicentriques ont été lancées depuis deux ans, les premiers résultats ont été récemment publiés.
- Ils permettent de valider les limites de normalité chez des hommes fertiles.

# CONCLUSION

L'analyse de sperme donne des renseignements précieux sur la fonction reproductive masculine

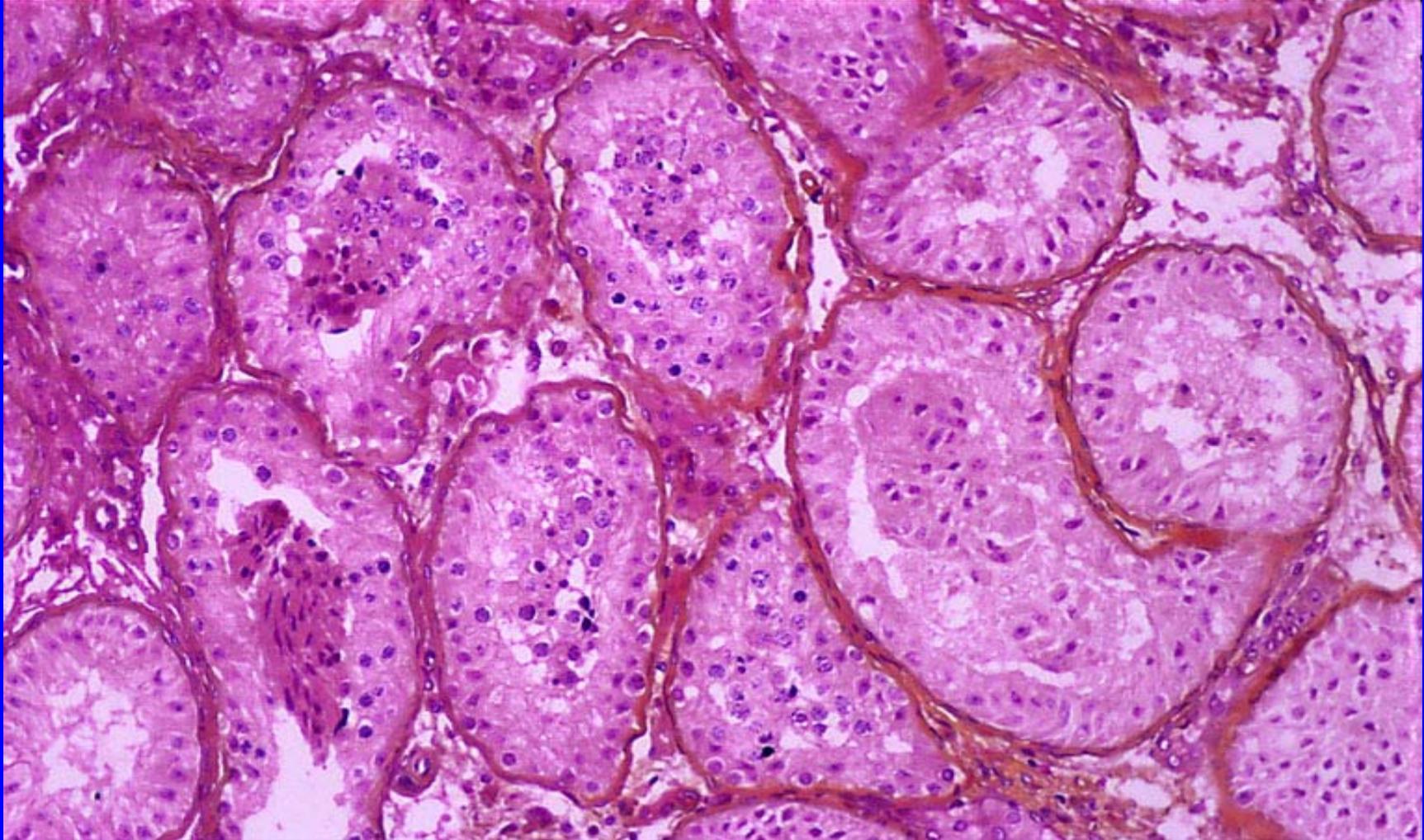
Elle permet :

- de tester la spermatogenèse et la fonction des glandes annexes
- de détecter des problèmes immunologiques, inflammatoires ou infectieux

Cependant, nous commençons seulement à obtenir des valeurs de référence adéquates, ce qui rend difficile l'évaluation de certains paramètres, comme la morphologie des spermatozoïdes

Les résultats des études multicentriques en cours, portant sur de grandes populations d'hommes fertiles, seront déterminantes pour établir des valeurs limites permettant de distinguer les cas associés à une fertilité réduite.

# Coupe d'un testis avec spermatogénèse normale



FEUILLE DE RESULTAT  
PRELEVEMENT CHIRURGICAL DE SPERMATOZOIDES

Nom : Y Massimiliano

Date naissance : 12.10.1959

Date Prélèvement-Congélation : 09.07.2001

**Indication : Azoospermie (microdélétion du chromosome Y)**

Urologues : Dr GA de Boccard

Biologistes : Dr H. Lucas

Nature du prélèvement	Avant Congélation			Nombre de paillettes	Test de Décongélation**
	Conc. SPZ	Mobilité (%)	Vitalité (%)		Mobilité (%)
<b>Testis G</b>	0-2 spz / champs (morpho altérée)	Tous immobiles	73%	5*	Rares spz mob. (cat 2) et Quelques spz mobiles sur place ( cat 1) <b>La morphologie reste très altérée</b>
<b>Testis D</b>	0-2 spz / champs (morpho altérée)	Tous immobiles			

\* Pool des 2 biopsies testiculaires et Congélation en Spermfreeze.

\*\* Test pratiqué dans les conditions de l'ICSI (PureSperm à 60%).

Commentaires :

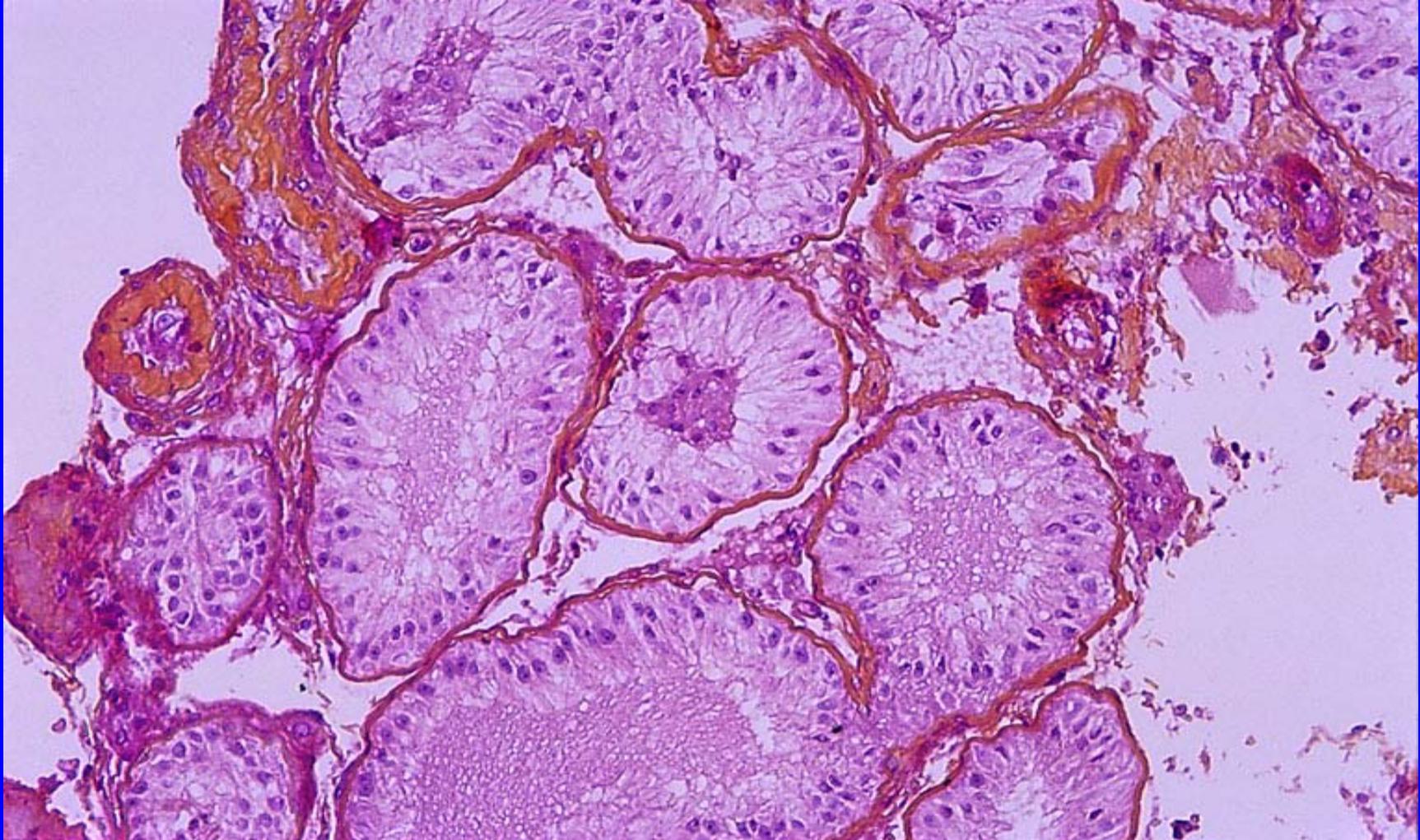
**Hypospermatogénèse franche.**

**Morphologie spermatique très perturbée.**

**Même si l'ICSI est envisageable ( 1 paillette/tentative), nous émettons des réserves quant au potentiel fécondant de ces spermatozoïdes. Le couple a néanmoins demandé un conseil génétique avant de décider le recours à l'ICSI.**

Dr Hervé LUCAS

Coupe d'un testis avec spermatogénèse abolie  
(Sertoli cell only syndrome)



# FEUILLE DE RESULTAT PRELEVEMENT CHIRURGICAL DE SPERMATOZOIDES

Nom : Mr Z Dario

Date Prélèvement-Congélation : 30.03.01

Date de naissance : 01.01.63

Indication : Azoospermie Non Obstructive à FSH normale.

Urologues : Dr LALIVE, Dr G.A. DE BOCCARD.

Biologistes : Dr Hervé LUCAS, Mme Ingrid WAGNER.

Nature du prélèvement	Avant Congélation*			Nombre de paillettes	Test de Décongélation**
	Conc. SPZ	Mobilité (%)	Vitalité (%)		Mobilité (%)
<b>Testis Gauche</b>	pas de spz				
<b>Testis Droit</b>	pas de spz				

\* Congélation en Spermfreeze.

\*\* Test pratiqué dans les conditions de l'ICSI.

## Commentaires :

■ Absence de spermatozoïdes.

■ Blocage méiotique probable (FSH normale, sans syndrome obstructif).

Dr Hervé LUCAS