

# Impact of gamete cell quality on the outcome of intracytoplasmic sperm injection.

## Impact de la qualité des gamètes sur les résultats de la micro-injection intracytoplasmique

Moes Kdous, Ghaya Merdassi, Marouen Braham, Amel Zhioua, Fathi Zhioua.

*Service de gynécologie obstétrique et médecine de la reproduction. CHU Aziza Othmana*

### RÉSUMÉ

**Prérequis :** la qualité des gamètes utilisés pour une microinjection intracytoplasmique de spermatozoïde est un facteur important qui peut influencer les taux de grossesse.

**But :** Etudier l'impact : des paramètres spermatiques conventionnels, de l'origine du sperme et de la qualité ovocytaire sur les taux de grossesse en ICSI.

**Méthodes :** Etude rétrospective comparative sur deux ans de 500 patientes ayant bénéficié dans le cadre de leur infertilité d'une tentative d'ICSI entre janvier 2004 et décembre 2005. Nous avons comparé Les paramètres conventionnels du sperme (nombre, mobilité, morphologie) et la qualité ovocytaire (ovocytes matures et immatures) dans deux groupes de patientes : celles ayant obtenu une grossesse : le groupe « grossesse+ » et celles n'ayant pas eu de grossesse : le groupe « grossesse- ».

**Résultats :** Parmi les paramètres conventionnels du sperme, seule la numération des spermatozoïdes après préparation était significativement plus élevée dans le groupe « grossesse + » ( $p=0,02$ ). Nous avons noté significativement plus de grossesses dans le groupe sperme éjaculé et épидидymaire par rapport au groupe sperme testiculaire ( $p<10^{-3}$ ). Le nombre d'ovocytes recueillis était significativement plus important dans le groupe « grossesse+ » ( $13,9\pm 7$  vs  $10,6\pm 7,6$  ;  $p<10^{-3}$ ) avec en majorité des ovocytes matures en métaphasell ( $9,1\pm 5,5$  vs  $6,6\pm 5,4$  ;  $p<10^{-3}$ ). L'analyse de la courbe ROC et l'étude en régression logistique montrent que pour le paramètre ovocytes matures, le seuil le plus discriminant pour la prédiction de grossesse est de 4 (OR=2,1 ; LR+=6,7 ; IC[1 ; 1,4] ;  $p0,009$ ).

**Conclusion :** Les paramètres conventionnels du sperme éjaculé ont peu d'incidence sur les taux de grossesse en ICSI. Le sperme testiculaire semble donner de moins bons résultats. Le nombre d'ovocytes recueillis ainsi que la proportion d'ovocytes matures (métaphase II) conditionnent significativement le pronostic.

### Mots-clés

ICSI, grossesse, sperme, Ovocyte

### SUMMARY

**Background:** the quality of the gametes used for an intracytoplasmic microinjection of spermatozoïde is a significant factor which can influence pregnancy rates.

**Aim :** To assess the effect of conventional sperm parameters, origin of spermatozoa and oocyte quality on pregnancy rate in ICSI.

**Methods:** A retrospective and comparative study of 500 women who underwent ICSI cycle during the study period from January 2004 to December 2005. Conventional sperm parameters (count, motility and morphology) and oocyte quality (mature and immatures oocytes) was compared in two groups of patients: Those achieving a pregnancy: The "pregnancy+" group and those failing to have a pregnancy: The "pregnancy-" group.

**Results:** Among the conventional sperm parameters, only spermatozoa count after preparation was significantly higher in "pregnancy+" group ( $p=0,02$ ). We found significantly more pregnancies in ejaculated and epididymal sperm groups than in the testicular one ( $p<10^{-3}$ ). The number of oocyte retrieved was significantly higher in "pregnancy+" group ( $13,9\pm 7$  vs  $10,6\pm 7,6$  ;  $p<10^{-3}$ ) with mainly mature oocyte (metaphasell) ( $9,1\pm 5,5$  vs  $6,6\pm 5,4$  ;  $p<10^{-3}$ ). Analysis of ROC curve and logistic regression study show that for mature oocyte, the most discriminative cut-off for predicting pregnancy is 4 (OR=2,1 ; LR+=6,7 ; IC[1 ; 1,4] ;  $p0,009$ ).

**Conclusion:** Conventional parameters of ejaculated sperm have almost no influence on pregnancy rates in ICSI. Testicular sperm seem to have worse results. The number of oocytes retrieved and the proportion of mature oocytes (metaphasell) affect markedly the prognosis.

### Key - words

ICSI, Pregnancy, Semen, Oocyte

L'influence des paramètres spermatiques comme élément pronostic dans l'obtention de grossesse n'a jamais cessé de susciter l'intérêt de toutes les équipes d'assistance médicale à la procréation pratiquant la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI).

Si certaines controverses subsistent concernant les détails de la spermologie en matière d'obtention de grossesse, il semble de nos jours que ces facteurs n'ont qu'une influence mineure par rapport à la qualité ovocytaire en terme de fécondation, de qualité embryonnaire et d'implantation. Le but de notre étude est d'étudier l'impact des paramètres spermatiques conventionnels et de la qualité ovocytaire sur les résultats de l'ICSI

---

## MATERIEL ET METHODES

---

### Patientes

Il s'agit d'une étude rétrospective comparative à propos de 500 patientes ayant bénéficié dans le cadre de leur infertilité d'une ICSI (Intracytoplasmic spermatozoid injection). Cette étude a été menée sur deux ans entre janvier 2004 et décembre 2005 au centre d'assistance médicale à la procréation de l'hôpital AZIZA OTHMANA de Tunis. Chaque patiente n'a été incluse qu'une seule fois, lors de sa première tentative. Aucune exclusion n'a été faite en terme d'âge, origine de l'infertilité ou type de l'infertilité (primaire ou secondaire). Toutes les patientes ont bénéficié dans le cadre du bilan pré ICSI d'un examen clinique (comportant outre l'examen gynécologique une mesure du poids et de la taille), une échographie pelvienne, un bilan hormonal de base (FSH, LH, Estradiol, Prolactine) et une hystérocopie diagnostique de façon systématique. Tous les couples étaient préalablement informés de la technique d'ICSI et des données disponibles sur les grossesses et les enfants déjà nés et ont donné leur consentement éclairé.

### Protocole thérapeutique.

Toutes les patientes ont été stimulées selon le protocole « long agoniste ». La stimulation ovarienne était précédée d'une désensibilisation hypophysaire par une injection unique de DECAPEPTYL®LP 3 mg (Acétate de Leuprolide) en IM, le premier jour du cycle ou bien aux 23<sup>ème</sup> – 24<sup>ème</sup> jours du cycle. Le contrôle de la désensibilisation hypothalamo-hypophysaire est réalisé 15 à 18 jours après l'injection par un dosage sérique de l'oestradiol (E2) et de la Luteinizing Hormone (LH). Un taux d'E2 inférieur ou égal à 50 pg/ml et un taux de LH inférieur ou égal à 2 UI/ml autorisent le début de la stimulation. Toutes les patientes ont été stimulées par de la FSH recombinante (Gonal F® Merck, Serono Tunisie). La dose de départ était de 150-225 UI/jour, ultérieurement adaptée en fonction des résultats du monitoring échographique et biologique. Le déclenchement a été réalisé par de l'hCG (5000 ou 10000 UI) lorsqu'au minimum trois follicules ont atteint un diamètre supérieur ou égal à 17 mm avec un taux d'oestradiol supérieur ou égal à 200 pg/ml par follicule mature. La ponction ovocytaire a été réalisée par voie vaginale échoguidée 24 à 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. Le transfert embryonnaire a été réalisé à J2 à l'aide d'un cathéter de transfert (cathéter de Frydman LG 4.5, CCD France). Seuls les embryons de grade 1 (blastomères réguliers, fragments cytoplasmiques < 10% de la surface embryonnaire totale) ou de

grade 2 (Blastomères réguliers, fragments cytoplasmiques entre 10 et 30%) ont été transférés avec un maximum de 2 à 3 embryons par transfert. Un soutien de la phase lutéale par un traitement progestatif a été administré à toutes les patientes : Utrogestan200® (2 comprimés par jour en deux prises et Progesterone retard® (une ampoule en intramusculaire tous les trois jours). Ce traitement est débuté le jour du transfert et poursuivi pendant une durée de 15 jours. Un dosage quantitatif des  $\beta$ hCG 15 jours après le transfert permet de faire le diagnostic de grossesse.

### Méthodes

Nous avons considéré deux groupes de patientes: celles ayant obtenu une grossesse clinique soit le groupe « grossesse+ » et celles n'ayant pas obtenu une grossesse clinique soit le groupe « grossesse- ». Nous avons comparé la qualité des gamètes (spermatozoïdes + ovocytes) entre ces deux groupes. L'évaluation de la qualité spermatique à tenu compte des paramètres conventionnels (numération, mobilité, morphologie des spermatozoïdes avant et après préparation au laboratoire). L'étude de la qualité ovocytaire est basée sur l'étude morphologique des ovocytes après décoronisation. Une grossesse clinique est définie par un taux de  $\beta$ hCG >1000 UI/ml et/ou la mise en évidence d'un sac gestationnel et d'une activité cardiaque 4 à 6 semaines après le transfert embryonnaire.

### Analyse statistique

Les données ont été saisies et analysées au moyen du logiciel SPSS version 13.0. Nous avons calculé des fréquences pour les variables qualitatives; et des moyennes, des médianes et des écarts-types pour les variables quantitatives. La comparaison de deux moyennes sur séries indépendantes a été effectuée au moyen du test t de Student, et en cas de faibles effectifs par le test non paramétrique de Mann et Whitney. La comparaison de pourcentages sur séries indépendantes, a été effectuée par le test de chi-deux de Pearson, et en cas de non validité de ce test, par le test exact bilatéral de Fisher. Dans tous les tests statistiques, le seuil de signification (p) a été fixé à 0,05.

Nous avons établi la courbe ROC (Receiver Operator Characteristic curve) pour déterminer le seuil le plus discriminant. L'aire sous la courbe (AUC) montre la précision globale du test. Plus l'aire est proche de 1, plus la précision globale du test est importante. Nous avons ensuite réparti les femmes en deux groupes distincts: supérieur et inférieur au seuil trouvé et nous avons conduit une analyse univariée en régression logistique, ceci nous a permis de calculer l'Odds Ratio lié à ce seuil, c'est-à-dire le nombre de fois par lequel la probabilité de succès (obtention de grossesse) ou d'échec (absence de grossesse) de la tentative d'ICSI est multipliée chez les patientes dont la valeur du paramètre étudié est supérieure ou inférieure au seuil trouvé.

---

## RESULTATS

---

### Caractéristiques de la population générale

L'âge moyen de nos patientes était de 33,4±4,6 ans (extrêmes : 20-46 ans). La majorité des patientes (72,6%) étaient âgées de plus de 30 ans. Près d'un tiers (32,2%) avaient un âge supérieur à 35 ans. La durée moyenne de l'infertilité était de 6.6±2.9 ans avec un minimum de 2 ans et un maximum de 15 ans.

L'infertilité était de type secondaire chez 279 patientes (55.8%) et de type primaire chez 221 patientes (44.2%). L'ICSI était proposée au couples pour une stérilité masculine pure dans plus de la moitié des cas soit 59.4%, pour une stérilité tubaire définitive dans 12% des cas, pour une stérilité mixte (tubaire et masculine) dans 19.5% des cas et après échec d'au moins 3 tentatives d'IAC dans 3.1% des cas. La microinjection a été réalisée dans la quasi majorité des cas avec du sperme éjaculé (449 cas soit 90 %). Un prélèvement chirurgical épидидymaire ou testiculaire a été réalisé dans 38 et 12 cas soit respectivement 7.6% et 2.4%

### Résultats de la tentative d'ICSI

Aucun cycle n'a été annulé. La ponction folliculaire a eu lieu dans tous les cas et a permis à chaque fois le recueil d'au moins un ovocyte fécondable. Aucune ponction blanche n'a été notée. Le transfert embryonnaire n'a pas eu lieu dans 17 cas (3,4%) et ce pour échec de fécondation dans 15 cas (3%) et arrêt de développement embryonnaire dans 2 cas (0,4%). Le taux de fécondation était de 52.6%, le taux de transfert 93.6%, le taux d'implantation 8.91%. Nous avons obtenu 107 grossesses cliniques (groupe grossesse+) soit un taux de grossesse clinique par transfert de 22.8% (tableau 1). 393 patientes n'ont pas obtenu de grossesse clinique (groupe grossesse-). La moyenne des embryons transférés était comparable entre les deux groupes (2,3±1,3 vs 2.2±0,7 ; NS). Les grossesses étaient réparties comme suit : 70 accouchements à terme (65,5%), 15 avortements tardifs (14 %) et 22 fausses couches spontanées précoce (20.5%).

**Tableau 1:** Résultats de l'ICSI (ICSI results)

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| Nombre moyen d'ovocytes recueillis  | 11,3± 7,6 |
| Nombre moyen d'ovocytes injectés    | 9,7± 6,5  |
| Nombre moyen d'embryons obtenus     | 5,1 ± 4,4 |
| Taux de fécondation (%)             | 52,60     |
| Taux de clivage (%)                 | 98,70     |
| Taux d'implantation (%)             | 8,9       |
| Taux de grossesse par transfert (%) | 22,8      |

### Etude des paramètres spermatisques

La numération moyenne des spermatozoïdes était au dessus des normes de l'OMS soit 38 millions/ml (M/ml) avant préparation au laboratoire et 29,7 M/ml après. La mobilité moyenne (a+b) était largement au dessous des normes de l'OMS soit 11,6% avant préparation au laboratoire et 27,2% après. La moyenne des spermatozoïdes de forme normale était aussi au dessous des normes de l'OMS soit 10.4 % avant préparation et 11.6% après Une oligospermie sévère (0-5 M/ml) était observée chez 177 conjoints soit 35,4% de la population d'étude. La proportion de conjoints ayant une oligospermie légère (10-20 M/ml) et modérée (5-10 M/ml) représentait respectivement 15,2% et 8,2%. Le nombre d'azoospermies était de 38 soit 7,6%. Seuls 168/500 partenaires (33,6%) avaient une numération normale (>20M). La majorité des patients soit 285 /500 (57%) avaient une asthénospermie sévère (a+b<10%). Les patients ayant une asthénospermie modérée (10%<a+b<20%) ou légère (20%<a+b<45%) étaient respectivement au nombre de 135/500 et 75/75 (27% et 15% respectivement). La mobilité était normale (a+b>45%) chez 5/500 patients uniquement soit 1% de la population d'étude. Seul le nombre de spermatozoïdes

après préparation au laboratoire était significativement supérieur dans le groupe grossesse+ (Tableau 2). Les autres paramètres du sperme n'avaient pas d'influence statistiquement significative sur la survenue ou non de grossesse. Néanmoins, en comparant les taux de grossesses en fonction de l'origine du sperme et en analysant les paramètres deux par deux, nous avons noté significativement plus de grossesses dans le groupe sperme éjaculé par rapport au groupe sperme testiculaire ( $p<10^{-3}$ ) et significativement plus de grossesses dans le groupe sperme épидидymaire par rapport au groupe sperme testiculaire ( $p<10^{-3}$ ). Aucune différence n'a été notée entre le groupe sperme éjaculé et sperme épидидymaire ( $p=0,8$ ) (Tableau 3).

**Tableau 2 :** Comparaison de la qualité spermatique entre les groupes grossesse+ et grossesse-.( Comparaison of sperm quality between « pregnancy+ » and « pregnancy -» groups)

|                 | Grossesse+        | Grossesse-        | p    |
|-----------------|-------------------|-------------------|------|
|                 | Avant préparation | Avant préparation |      |
| Nombre          | 30,5±53,4         | 40±94,5           | 0,18 |
| Mobilité        | 12,7±14,7         | 11,3±10,5         | 0,33 |
| Morphologie nle | 12,3±12,1         | 11,1±15,2         | 0,39 |
|                 | Après préparation | Après préparation |      |
| Nombre          | 32,7±92,6         | 18,9±36,1         | 0,02 |
| Mobilité        | 27,5±25,2         | 26,2±26,5         | 0,65 |
| Morphologie nle | 14,3±19,2         | 13±20,3           | 0,42 |

**Tableau 3 :** Influence de l'origine du sperme sur la survenue ou non de grossesse. (Effect of sperm origin on pregnancy occurrence)

|              | Grossesse+  | Grossesse- | P                     |
|--------------|-------------|------------|-----------------------|
| Ejaculé      | 98 (21,8%)  | 351(78,2%) |                       |
| Epididymaire | 8(21%)b     | 30(79%)    | 0,8 NS <sup>a</sup>   |
| Testiculaire | 1(7,7%)c, d | 12(92,3%)  | 0,001 <sup>b, c</sup> |

a : cette valeur de p est calculée pour estimer le seuil de significativité des taux de grossesse entre les groupes sperme Epididymaire vs sperme éjaculé.

b, c : ces valeurs de p sont calculées pour estimer le seuil de significativité des taux de grossesse entre les groupes sperme testiculaire vs sperme éjaculé et sperme testiculaire vs sperme Epididymaire

### Etude de la qualité ovocytaire

La majorité des ovocytes recueillis était en métaphase II, certaines ponctions étaient dépourvues de vésicules germinales et/ou d'ovocytes atrétiques et/ou d'ovocytes en métaphase I (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Qualité ovocytaire. (oocytes quality)

|                              | Moyenne | Ecart type |
|------------------------------|---------|------------|
| Nombre d'ovocytes recueillis | 11,3    | 7,6        |
| Métaphase I                  | 1,1     | 1,3        |
| Métaphase II                 | 7,1     | 5,5        |
| Vésicule germinale           | 0,3     | 0,7        |
| Atrétiques                   | 2,6     | 3,3        |

Le nombre d'ovocytes recueillis était significativement plus important dans le groupe grossesse+ (13,9±7 vs 10,6±7,6 ;  $p<10^{-3}$ ). Le nombre d'ovocytes en métaphase II (NOMII) était aussi significativement plus important dans le groupe grossesse+ (9,1±5,5 vs 6,6±5,4 ;  $p<10^{-3}$ ). Il en est de même pour le nombre d'ovocytes en métaphase I

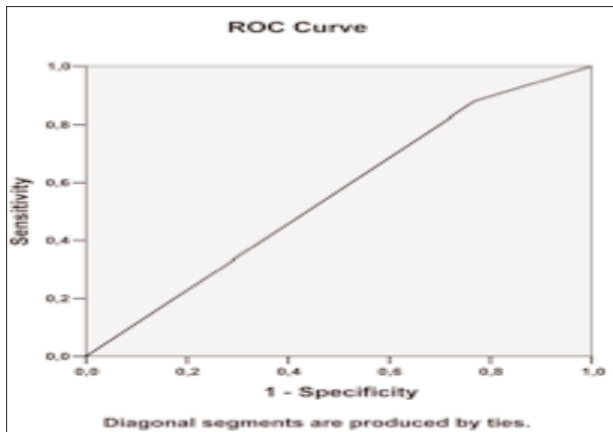
( $1,52 \pm 1,51$  vs  $1,07 \pm 1,3$  ;  $p < 10^{-3}$ ) et le nombre de vésicules germinales ( $0,5 \pm 1$  vs  $0,3 \pm 0,7$  ;  $p = 0,04$ ). Par contre, la proportion d'ovocytes atrétiques était similaire dans les deux groupes étudiés ( $2,7 \pm 3,2$  vs  $2,6 \pm 3,2$   $p = 0,84$  NS (Tableau 5).

**Tableau 5** : Comparaison de la qualité ovocytaire entre les groupes grossesse+ et grossesse-. (Comparaison of oocyte quality between « pregnancy+ » and « pregnancy - » groups)

| Qualité ovocytaire           | Grossesse+ | Grossesse- | p                 |
|------------------------------|------------|------------|-------------------|
| Nombre d'ovocytes recueillis | 13,9±7     | 10,6±7,6   | <10 <sup>-3</sup> |
| MétaphaseI                   | 1,52±1,51  | 1,07±1,3   | 0,006             |
| MétaphaseII                  | 9,1±5,5    | 6,6±5,4    | <10 <sup>-3</sup> |
| Vésicule germinale           | 0,5±1      | 0,3±0,7    | 0,04              |
| Atrétiques                   | 2,7±3,2    | 2,6±3,2    | 0,84              |

L'analyse de la courbe ROC du nombre d'ovocytes matures (en métaphase II) montre que le seuil le plus discriminant dans la prédiction de grossesse est de 4 ovocytes avec une sensibilité de 87,9% et une spécificité de 23,2% (AUC=0,555 ;  $p = 0,02$ ). Parmi les patientes ayant un  $NOMII \geq 4$ , 94 avaient eu une grossesse (90,3%) versus 13 grossesses dans le groupe ayant un  $NOMII < 4$  (3,2%). Le calcul de l'Odd ratio montre qu'en ayant un  $NOMII < 4$ , une femme réduit sa chance d'avoir une grossesse par 2,1. (OR=2,1; IC[1 ;1,4]; LR+ =6,7;  $p = 0,009$ ). (Fig. 1, Tableau 6).

**Figure 1** : Courbe ROC du nombre d'ovocytes en métaphase II. (mature oocytes ROC curve)



**Tableau 6** : Tableau croisé du nombre d'ovocytes en métaphase II. (Mature oocytes crosstab)

| NMII  | Grossesse+ | Grossesse- | TOTAL |
|-------|------------|------------|-------|
| <2    | 13(3,2%)   | 91(96,8%)  | 396   |
| ≥2    | 94(90,3%)  | 302(9,7%)  | 104   |
| TOTAL | 107        | 393        | 500   |

Après microinjection de ces ovocytes, nous avons remarqué que le nombre moyen de zygotes à 2PN obtenu à J1 était significativement plus important dans le groupe grossesse+ ( $7 \pm 4,1$  vs  $4,6 \pm 4,3$  ;  $p < 10^{-3}$ ). Les zygotes≠2PN (1 ; 3PN) étaient répartis de façon similaire dans les deux groupes (Tableau 7).

**Tableau 7** : Comparaison du nombre moyen de zygote à 2PN entre les deux groupes étudiés. (Comparaison of 2PN zygote number between « pregnancy+ » and « pregnancy - » groups)

|     | Grossesse+ | Grossesse- | p                 |
|-----|------------|------------|-------------------|
| 1PN | 0,009±0,09 | 0,02±0,15  | 0,19              |
| 2PN | 7±4,1      | 4,6±4,3    | <10 <sup>-3</sup> |
| 3PN | 0,04±0,21  | 0,03±0,19  | 0,69              |

## DISCUSSION

### Influence des paramètres spermatisques conventionnels et de l'origine du sperme sur les résultats de l'ICSI

Plusieurs études ont montré que l'issue de l'ICSI ne dépend pas du degré d'altération des paramètres spermatisques (numération, mobilité, morphologie) [2], mais seule une condition, l'injection d'un spermatozoïde non viable, semble influencer négativement les résultats de l'ICSI. D'autre part, La seule situation pour laquelle on enregistre des faibles taux de fécondation reste L'akinétopermie, puisqu'il est difficile de différencier un spermatozoïde vivant d'un spermatozoïde mort même si l'on a recours au test hypoosmotique [3]. Une analyse menée par NAGY et al [4] portant sur une série de 838 couples ayant bénéficié d'une ICSI, a évalué la relation entre la qualité du sperme et les résultats de ICSI et a montré que le taux de fécondation varie de 58 % à 71 % lorsque la numération spermatisque varie de 0 à plus de 5 millions / ml. En revanche, les taux de grossesse restent stables. Mercan [5] a étudié 715 cycles d'ICSI et a essayé de déterminer si la survenue de grossesse est influencée par la sévérité des anomalies spermatisques. Il a conclu qu'entre le groupe ayant une ICSI pour oligoasthénospermie sévère (OATS) et le groupe ayant une ICSI pour d'autres indications, il n'y avait pas de différences statistiquement significatives en matière de taux d'implantation (6% vs 9%), de grossesses cliniques (27% vs 29%), d'accouchements (18 % vs 24%) ou de fausses couches (35% vs 17 %).

De même, TRIPP [6] dans son étude de 510 cycles d'ICSI a montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les taux de fécondation, de grossesses, de fausses couches et le grade embryonnaire lorsque la numération totale des spermatozoïdes mobiles et le nombre de formes typiques changent. Dans notre étude nous n'avons observé aucune différence entre le groupe ayant permis l'obtention de grossesse et celui sans grossesse que ce soit en terme de numération des spermatozoïdes /ml (30,5 millions vs 40 millions,  $p = 0,18$ ), de pourcentage moyen de formes mobiles (12,7% vs 11,3 % ,  $p = 0,33$ ) ou de formes normales (12,3% vs 11,1% ;  $p = 0,39$ ). En effet, contrairement à la FIV, l'utilisation de la microinjection dans le traitement des infertilités masculines a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le nombre, la mobilité et les taux de fécondation ou de grossesse [3]. Ceci peut être expliqué en partie par le fait que l'embryologiste peut souvent trouver de bons spermatozoïdes mobiles

et morphologiquement sains pour les microinjecter, par conséquent, le spermatozoïde injecté dans le cytoplasme ovocytaire n'est pas nécessairement représentatif de la population spermatozoaire étudiée [7]. Quant à la morphologie des spermatozoïdes humains, elle n'a pu être mise en relation avec les résultats de L'ICSI lesquels sont indépendants du spermocytogramme. En effet, des études antérieures ont montré qu'aucune différence n'était enregistrée entre les taux de fécondation lorsque le pourcentage de formes typiques était inférieur à 14% et même inférieur à 4% selon les critères stricts de la classification de KRUGER [8]. Même en présence d'un taux important d'anomalies morphologiques, rien ne peut permettre d'affirmer que les spermatozoïdes injectés soient tous morphologiquement atypiques. DEVOS [9], a montré dans une étude rétrospective de 662 cycles que le taux de grossesses varie significativement avec des spermatozoïdes morphologiquement normaux (36.7%) qu'avec des spermatozoïdes anormaux (20,2%), mais le pourcentage de formes anormales est sans effet sur le développement embryonnaire ce qui rejoint les études de Svalander et Lundin [10,11]. Une des explications à ces résultats est que les spermatozoïdes morphologiquement anormaux sont généralement porteurs d'anomalies chromosomiques, lesquelles se transmettent aux embryons formés et peuvent ainsi diminuer leur capacité d'implantation et de ce fait les taux de grossesses. Dans notre série, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes grossesse+ et grossesse- selon que le sperme est éjaculé ou d'origine épидидymaire, avec des taux respectifs de grossesse/ponction de 21,8% et 21% ( $p=0,8$ , NS). En revanche, lorsque le sperme était d'origine testiculaire, le taux de grossesse/ponction était significativement plus faible : 7,7% (7,7% vs 21,8% ;  $p<10^{-3}$  / 7,7% vs 21% ;  $p<10^{-3}$ ). L'analyse de ces données est difficile du fait de la présence d'un biais de sélection : l'inhomogénéité de la répartition des patients selon l'origine du sperme. Plusieurs séries ont étudié l'influence de l'origine du sperme sur les résultats de l'ICSI. Bukulmez [12], dans son étude à propos de 890 cycles, a conclu que le taux de fécondation, le nombre moyen d'embryons de grade 1, le nombre d'embryons transférés et le taux de grossesses cliniques étaient similaires entre les groupes sperme éjaculé et le groupe sperme testiculaire. De même, Ghazzawi [13], a comparé des cycles d'ICSI avec sperme éjaculé, épидидymaire et testiculaire respectivement dans des cas d'OATS, d'azoospermies obstructives et non obstructives et a trouvé des taux de fécondation et de grossesses similaires (respectivement 25 % et 28 %). EGE [14], a conclu dans son étude de 454 cycles que les taux de fécondation et de grossesses par transfert étaient statistiquement inférieurs dans le groupe sperme testiculaire par rapport au groupe sperme éjaculé. De même NAGY [15], a rapporté qu'avec le sperme testiculaire le taux de fécondation normale était significativement inférieur par rapport à celui du groupe sperme éjaculé (48 % vs 7%,  $p=0,002$ ), mais similaire au groupe sperme épидидymaire, il rejoint ainsi les résultats de WATKINS [16] qui a trouvé des taux élevés de fécondation anormale dans le groupe sperme testiculaire reflétant l'immaturité fonctionnelle de ce type de sperme. Les explications possibles aux faibles résultats obtenus avec le sperme testiculaire est le manque de certains facteurs de maturité qui les rendent peu ou pas capables de féconder un ovocyte. En effet, les spermatozoïdes testiculaires sont souvent immobiles lorsqu'ils sont séparés de leur tissu et leur mobilité croît avec le temps ce qui suppose la présence d'un facteur testiculaire inhibant la mobilité et

empêchant les spermatozoïdes testiculaires de terminer leur maturation qui n'est achevée que lors de leur passage dans l'épидидyme [17]. La capacité des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement (testiculaires et épидидymaires) à féconder un ovocyte et à produire des embryons est encore un sujet très débattu. Les différences observées au vu de plusieurs études reflètent l'hétérogénéité de distribution des pathologies testiculaires mais aussi l'intrication de facteurs féminins.

### **Influence du nombre et de la qualité ovocytaire sur les résultats de l'ICSI**

Dans la pratique actuelle, les protocoles de stimulation ovarienne tendent à produire le plus grand nombre d'ovocytes et d'embryons, parce que les chances de grossesse augmentent considérablement si l'on transfère plus d'un embryon. Tant que le SHSO (syndrome d'hyperstimulation ovarienne) est évité, la devise était « plus on a d'ovocytes mieux c'est » [18]. Cependant, une question reste sujette à plusieurs controverses : est-ce que une réponse ovarienne importante affecte la qualité ovocytaire et est-ce que le fait d'avoir un taux élevé d'ovocytes immatures réduit les chances de grossesse ?

Des expériences sur les animaux ont montré l'effet négatif d'une importante réponse ovarienne. Les blastocystes de souris stimulées se divisent plus tardivement que ceux provenant de cycles normaux [19]. Les modèles de souris ont montré aussi que la forte réponse ovarienne altère la qualité ovocytaire et embryonnaire comme le montre la diminution des taux d'implantation et le développement post implantatoire [20]. L'analyse chromosomique révèle un plus grand nombre d'anomalies chromosomiques dans les ovocytes d'animaux hyperstimulés par rapport à ceux ovulant spontanément [21]. Cependant, les études chez l'homme ont montré des résultats moins évidents. Certaines études ont montré qu'une hyperstimulation ovarienne contrôlée tend à diminuer les taux d'implantation [22,23], ce qui est probablement dû à une diminution de la réceptivité utérine plutôt qu'à une diminution de la qualité ovocytaire et à une action nocive sur l'embryon des taux élevés d'E2 [24]. KOK et al [25] ont étudié 1894 cycles (1544 FIV classique ; 350 ICSI) et ont montré que la réponse ovarienne à la stimulation n'avait aucun effet sur les taux d'implantation ni sur la proportion d'embryons de bonne qualité. Dans cette même étude, la fraction d'ovocytes immatures passaient de 3.9% chez les femmes ayant moins de 3 ovocytes recueillis à 26% chez les femmes ayant plus de 20 ovocytes recueillis. Cependant, aucun effet négatif n'a été observé sur les taux de fécondation par ovocyte injecté (OR = 1 ; IC[0.87;1.14]). Les auteurs concluent alors que chez les hyperrépondeuses, bien qu'il y est plus d'ovocytes immatures qui ne peuvent être fécondés, les ovocytes qui vont être fécondés sont au moins de même qualité que ceux des normorépondeuses. Ceci rejoint les résultats obtenus par Fabregues et al [26] qui ont montré que même dans le cas de SHSO sévère, les taux d'implantation et de grossesses ne sont pas diminués.

Dans notre série nous avons obtenu significativement plus d'ovocytes dans le groupe grossesse+ que dans le groupe grossesse- ( $13.9 \pm 7$  vs  $10.6 \pm 7.6$ ,  $p<10^{-3}$ ). La proportion d'ovocytes matures (ovocytes en métaphase II) était significativement supérieure dans le groupe grossesse+ ( $9.1 \pm 5.5$  vs  $6.6 \pm 5.4$ ,  $p<10^{-3}$ ). Nous avons aussi remarqué que le fait d'avoir un taux élevé d'ovocytes immatures (ovocytes M1, vésicules germinales) n'altère pas les taux de grossesses. En effet, le

taux d'ovocytes en MII était significativement plus élevé dans le groupe grossesse+ ( $1.52 \pm 1.51$  vs  $1.07 \pm 1.3$ ,  $p=0.006$ ) de même le taux de vésicules germinales ( $VG = 0.5 \pm 1$  vs  $0.3 \pm 0.7$ ,  $p=0,04$ ). L'analyse de la courbe ROC du nombre d'ovocytes matures obtenus, montre qu'un nombre supérieur à 4 multiplie les chances de grossesse par 2,1 (OR=2,1; IC[1 ;1,4]; LR+ =6,7 ;  $p=0,009$ ).

## CONCLUSION

Il ressort de notre étude que les paramètres du sperme éjaculé quelque soit la sévérité de l'atteinte n'influence en rien la survenue d'une grossesse lors d'une ICSI. Le sperme éjaculé et épididymaire donnent les meilleurs résultats. L'obtention d'une grossesse est significativement corrélée au nombre d'ovocytes recueillis d'une manière générale et au nombre d'ovocytes en métaphase II d'une façon particulière. C'est dire l'importance d'une prise en charge optimale lors d'une induction de l'ovulation afin d'obtenir des ovocytes de bonne qualité et en quantité suffisante ; éléments clés et déterminants pour la survenue d'une grossesse.

## Références

1. Gunby J, Daya S. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2002 results from the canadian ART register. *Fertil Steril* 2006;86:1356-64.
2. Parinaud G, Mieusset R, Vietez G, Labal B, Richoille G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 2009;60:888-92.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
4. Nagy ZP, Liu J, Joris H et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 2005;10:1123-9.
5. Mercan R, Lanzendorf S, Nassar A, Mayer J, Muasher SJ, Oehninger S. The outcome of clinical pregnancies following ICSI is not affected by semen quality. *Fertil Steril* 2007;68:151-2.
6. Tripp BM, Lewitton M, Hoekstra T et al. Intracytoplasmic sperm injection results as evaluated by multiple outcome assessment is not influenced by male factors. *Fertil Steril* 2007;68:113-114.
7. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin Y, Ramzi AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005;64:982-6.
8. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro-fertilization. *Fertil Steril* 2008;49:112-7.
9. Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;69:564-8.
10. [10] Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to "strict criteria" sperm morphology. *Hum Reprod* 2006;11:1019-22.
11. Lundin K, Söderland B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 2011;12:2676-81.
12. Bukulmez O, Yucel A, Yarali H, Bildirici I, Gurgan T. The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome. *European Journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2011;94:250-255.
13. Ghazzawi IM, Sarraf MG, Taher MR, Khalifa FA. Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2009;13:348-52.
14. Ege N, Goker T, Sendag F, Levi R, Sendag H, Tavmergen E. Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm. *European Journal of obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2010;104:129-136.
15. Nagy Z, Liu J, Janssenwillen C, Silber SJ, Devroey P, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa give rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005;63:808-15.
16. Watkins W, Nieto F, Bourne H, Wutthiphon B, Speirs A, Baker HWG. Testicular and epididymal sperm in microinjection program: methods of retrieval and results. *Fertil Steril* 2009;67:527-35.
17. Schoysman R. Clinical situations challenging the established concept of epididymal physiology in the human. *Acta Eur Fertil* 1993;24:55-60.
18. Van Kooij RJ, Looman CWN, Habbema JDF, Dorland M, Te Velde ER. Age-dependant decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;66:769-75.
19. Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 2011;16:1237-43.
20. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2010;16:221-5.
21. Spielmann H, Vogel R. Genotoxic and embryotoxic effects of gonadotropin hyperstimulated ovulation on murine oocytes, preimplantation embryos en term fetuses. *Ann Ist Super Sanita* 2003;29:35-9.
22. Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2009;16:416-20.
23. Valbuena D, Martin J, De Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increasing levels of E2 are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril* 2001;76:962-8.
24. Kok JD, Looman CWN, Weima SM, Te Velde ER. A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2006;85:918-24.
25. Ng EHY, Lau EYL, Yeung WSB, Ho PC. Oocyte and embryo quality in patients with excessive ovarian response during in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2008;20:186-91.
26. Fábregues F, Peñarrubia J, Vidal E, Cascals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril* 2004;82:827-33.