



HAL
open science

**Méthode de mesure objective de la mobilité des spermatozoïdes humains par diffusion de la lumière.
Application à l'immunologie de la reproduction**

B. Volochine, J. Bosq-Rolland

► **To cite this version:**

B. Volochine, J. Bosq-Rolland. Méthode de mesure objective de la mobilité des spermatozoïdes humains par diffusion de la lumière. Application à l'immunologie de la reproduction. *Revue de Physique Appliquée*, 1979, 14 (2), pp.391-404. 10.1051/rphysap:01979001402039100 . jpa-00244608

HAL Id: jpa-00244608

<https://hal.science/jpa-00244608>

Submitted on 4 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Classification

Physics Abstracts

07.65 — 42.65C — 87.80 — 87.25

Méthode de mesure objective de la mobilité des spermatozoïdes humains par diffusion de la lumière. Application à l'immunologie de la reproduction (*)

B. Volochine (**) et J. Bosq-Rolland (***)

(Reçu le 30 juin 1978, accepté le 3 juillet 1978)

Résumé. — La méthode est basée sur la détection de l'effet Doppler optique par la technique des battements de photons *hétérodyne* permettant l'analyse de faibles changements de fréquences. La source de lumière monochromatique est un laser hélium-néon de faible puissance.

La mobilité est traduite par plusieurs paramètres : nombre absolu de spermatozoïdes mobiles, pourcentage des spermatozoïdes mobiles, vitesse caractéristique de la population, distribution des vitesses. On obtient également une appréciation de la concentration en spermatozoïdes.

Les applications possibles sont illustrées par des résultats relatifs à l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes dans le sperme, dans le mucus cervical, et en immunologie en présence d'anticorps immobilisants. On caractérise ainsi l'activité d'un sérum par un temps caractéristique.

Abstract. — The method is based upon the detection of the optical Doppler effect by the *heterodyne* photon beating technique, which allows the analysis of small frequency changes. The monochromatic light source is a low power helium-neon laser.

Mobility is described by several dynamical parameters : the absolute number of motile spermatozoa, the percentage of motile spermatozoa, the characteristic velocity of the population, the velocity distribution. Moreover, an appreciation of the spermatozoa concentration is also obtained.

Some possible applications are illustrated by the results of the analysis of spermatozoa motility in semen, in cervical mucus, and under the action of anti-bodies of a given serum. The absolute activity of a serum is thus characterized by the measurement of a characteristic decay time.

1. Introduction. — La réalisation de l'objectif fonctionnel du spermatozoïde, la fécondation, implique le déplacement actif du gamète mâle. L'aptitude à se mouvoir dans un milieu liquide est une caractéristique très spécifique de la cellule sexuelle mâle.

Aussi il n'est pas étonnant que, de tous les paramètres habituellement recherchés au cours de l'analyse du sperme, ce soit la mobilité qui donne la meilleure corrélation avec l'aptitude à la fécondation [1, 2].

Mais, à la différence de la plupart des mammifères,

l'homme possède une semence de qualité très inégale. La grande hétérogénéité de la morphologie des spermatozoïdes humains est bien connue. Il en est de même pour la mobilité. Chez l'homme fécond, il y a, en moyenne 60 % de spermatozoïdes mobiles, mais ce pourcentage peut être bien inférieur et même nul chez les hommes stériles.

La connaissance de ce paramètre est donc importante non seulement pour le diagnostic ou le pronostic des stérilités mais aussi pour suivre l'effet d'un traitement éventuel.

Malheureusement, dans les conditions habituelles de la pratique, l'estimation de ce paramètre se heurte à de nombreuses difficultés. En effet, lors d'un examen au microscope, l'observateur se trouve déjà en difficulté pour la simple appréciation du pourcentage d'éléments mobiles dès lors que le sperme présente une certaine concentration. L'observateur est placé à peu près dans la situation de quelqu'un qui, du haut des tours de Notre-Dame, devrait dire combien il y a de touristes sur le parvis, combien se déplacent et à quelle vitesse.

S'il est relativement facile de compter les éléments immobiles, il est, par contre, illusoire de tenter le

(*) Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de la D.G.R.S.T. Contrat n° 74-7-0846, et à la collaboration étroite entre une équipe de physiciens (Berge (P.), Volochine (B.), Dubois (M.), Ozenda (B.)) du Laboratoire de Diffusion Inélastique de la Lumière du C.E.N. Saclay, Orme des Merisiers, et une équipe de médecins et de biologistes (David (G.), Jouannet (P.), Serres (C.), Fissinger (S.), Jeulin (C.), Bosq-Rolland (J.) (***) du Laboratoire d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, du Professeur David, à l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre.

(**) Laboratoire de Diffusion Inélastique de la Lumière, Orme des Merisiers, C.E.N. Saclay B.P. n° 2, 91190 Gif sur Yvette, France.

(***) Assistante au Laboratoire de Biophysique du Professeur C. Benezech, Faculté de Médecine, Montpellier 34000, France.

décompte des éléments mobiles dont le nombre subit de continuelles variations dans un même champ. Aussi le plus souvent se livre-t-on à une évaluation globale, forcément approximative. Ceci explique les écarts importants relevés entre différents laboratoires et au sein d'un même laboratoire entre différents lecteurs et même entre les différentes lectures d'un même observateur [3, 4].

D'autre part l'appréciation de la qualité de la mobilité, c'est-à-dire la vitesse, est encore plus difficile dans les conditions habituelles. En effet le lecteur se trouve devant un grand nombre d'éléments, qui se déplacent dans toutes les directions, avec des vitesses variables d'un élément à l'autre et même avec des variations de vitesse d'un instant à l'autre pour un même élément. Aussi ne peut-on émettre qu'une appréciation extrêmement grossière sur la qualité de la mobilité soit en utilisant une échelle à 3, 4 ou 5 degrés (degré 0 : mobilité nulle, degré supérieur : excellente mobilité) soit en exprimant la mobilité en 3 classes :

% d'immobiles , % à mobilité diminuée ,
% à mobilité normale .

Quel que soit le mode d'expression, il ne faut pas se dissimuler qu'il traduit plus une *impression* qu'une *appréciation objective*.

On conçoit que ces difficultés parfaitement connues et unanimement reconnues aient été à l'origine de nombreuses recherches visant à la mise au point d'un système objectif de mesure.

2. Analyse des méthodes proposées antérieurement.

— Pour porter un jugement objectif sur toute méthode visant à mesurer la mobilité des spermatozoïdes, il convient tout d'abord de dégager les exigences essentielles que l'on doit se poser : Jecht et Russo [5] en ont récemment défini 6 :

1) Donner une mesure objective de la concentration des spermatozoïdes.

2) Déterminer la distribution du nombre total de spermatozoïdes mobiles en fonction de leur vitesse et de leur type de mouvement.

3) Donner la vitesse moyenne d'une population de spermatozoïdes mobiles.

4) Déterminer le pourcentage de spermatozoïdes immobiles.

5) Donner la distribution du nombre total de spermatozoïdes mobiles en fonction de la direction de leur déplacement.

6) Eviter d'altérer l'environnement ou d'introduire des facteurs artificiels dans la réalisation des objectifs 1 à 5 précédents.

Ces exigences légitimes nous ont paru insuffisantes en ce sens qu'elles ne tiennent pas compte des contraintes particulières à l'utilisation en pratique courante d'analyse du sperme humain. Aussi nous

avons proposé de compléter les 6 exigences précédemment formulées par Jecht et Russo, par 3 autres :

7) Possibilité d'effectuer des mesures dans un large éventail de concentration (pratiquement de 0 à 200 millions par ml).

8) Rapidité de la mesure : en effet la mobilité n'est pas une donnée stable, elle évolue dans le temps.

9) Maniabilité du système, c'est-à-dire, possibilité de le mettre en œuvre d'une *manière simple* et sans temps intermédiaire trop lourd.

Enfin, il va de soi que la méthode doit s'appuyer sur un instrument de mesure qui offre les garanties de sensibilité, fidélité et précision.

C'est en fonction de ces exigences qu'il convient d'examiner les différentes méthodes proposées. Elles sont nombreuses mais peuvent être regroupées en 3 classes selon qu'elles utilisent comme technique de base :

- la microcinématographie
- la microphotographie
- des procédés physiques n'utilisant pas de microscope.

a) Les méthodes microcinématographiques répondent, en principe, à toutes les exigences proposées plus haut, sauf évidemment à la 9^e puisque par définition elles nécessitent des opérations de dépouillement d'autant plus longues que l'on veut cerner avec plus de précision les différents paramètres. Elles peuvent, à condition d'analyser sur les films un grand nombre de spermatozoïdes, constituer en quelque sorte une *méthode de référence*.

Jecht et Russo [5] ont proposé une variante de la méthode microcinématographique qui constitue une notable amélioration sur le plan de la rapidité d'obtention des résultats. Il s'agit en fait de remplacer la caméra par un dispositif de télévision couplé à un ensemble informatique qui, à partir d'une digitalisation du champ analysé, est capable d'enregistrer pour chacun des éléments ses positions successives. Un programme très élaboré permet alors d'extraire rapidement les différents paramètres caractérisant la mobilité. L'appareillage électronique doit répondre à l'accumulation et au traitement d'un très grand nombre de données. De ce fait, la taille de l'ordinateur nécessaire (I.B.M. 1130) rend cet appareillage *inabordable* pour tout laboratoire ne disposant pas d'une logistique lourde en informatique et d'un important support financier.

b) Les méthodes microphotographiques sont basées sur l'analyse des traces laissées par les spermatozoïdes mobiles, soit après un temps d'exposition relativement long (de l'ordre de la seconde), soit sur une série de clichés rapprochés. Ces techniques, tout en étant plus *légères* que la microcinématographie, ne donnent cependant pas de *réponse immédiate*. D'autre part elles nécessitent une dilution du sperme dès lors que la concentration dépasse 50 millions de sper-

matozoïdes par ml, pour éviter les superpositions d'images. Elles se heurtent donc à l'exigence n° 6.

D'autres procédés physiques utilisant le microscope ont été proposés. Nous ne citerons que la technique proposée par Munktell [6] qui utilise une matrice de photodiodes montée dans l'oculaire d'un microscope et reliée à un ensemble électronique de traitement de données. Les impulsions produites par les passages des spermatozoïdes dans le champ du microscope permettent d'obtenir, après accumulation et traitement des données, deux paramètres : le nombre absolu d'éléments mobiles et la vitesse moyenne. Les auteurs reconnaissent que l'appareillage actuel est encore relativement lourd et nécessite des calculs secondaires.

c) Méthodes physiques n'utilisant pas le microscope. Certaines utilisent le phénomène de *rhéotaxie* (orientation des spermatozoïdes dans un fluide en écoulement selon une direction à contre-courant). Ce dispositif de base, en lui-même compliqué, nécessite la suspension des spermatozoïdes dans des milieux artificiels et n'aboutit pas d'ailleurs à une véritable mesure, mais à l'établissement d'un simple *index de mobilité* [7].

Enfin la méthode proposée par Rothschild [8] : basée sur le changement d'impédance électrique produite dans le milieu par les mouvements des spermatozoïdes, exige de très fortes concentrations de spermatozoïdes très largement supérieures à celles trouvées dans le sperme humain normal.

Au travers de cette revue rapide des différents procédés de mesure de la mobilité, il apparaît bien à l'heure actuelle qu'aucune méthode proposée ne répond à la totalité des exigences définies plus haut.

C'est pourquoi nous avons repris le principe d'une méthode de mesure basée sur la diffusion de la lumière, méthode qui a été proposée par P. Bergé, B. Volochine, R. Billard et A. Hamelin [9]. Nous l'avons adaptée plus particulièrement à l'étude du sperme humain en ayant comme objectif :

1) Que la méthode réponde *aussi bien* aux contraintes de la pratique courante (simple et fiable) qu'aux exigences de la recherche (précision et sensibilité).

2) Qu'elle permette la mesure des différents paramètres caractérisant la mobilité et plus spécialement du pourcentage de spermatozoïdes mobiles, de la vitesse caractéristique de la population étudiée, et de la distribution des vitesses.

3) Qu'elle soit applicable quel que soit le milieu dans lequel se déplacent ces spermatozoïdes : liquide séminal, mucus cervical, milieu de conservation ou tout autre milieu liquide.

2. Principe de la méthode proposée. Détermination des divers paramètres accessibles par cette technique.

— Si on envoie de la lumière sur une suspension d'objets dans un solvant, une partie de cette lumière

est absorbée par ces objets et rediffusée dans tout l'espace. L'étude de la répartition spatiale de l'intensité diffusée permet de remonter à la forme et aux dimensions des objets diffusants. Pour un angle d'observation donné, l'intensité diffusée et l'absorption sont proportionnelles au nombre total d'objets en suspension.

Si ces objets sont en mouvement, les fréquences lumineuses de la lumière diffusée diffèrent de celles de la lumière incidente (diffusion inélastique) et les caractéristiques de leur spectre dépendent de l'angle de diffusion et du type de mouvement. Dans le cas de translation à la vitesse v , l'effet Doppler donne un décalage $\Delta\nu$ de fréquence par rapport à celle de la lumière incidente ν_0 . Ce décalage étant égal à :

$$\Delta\nu = \frac{2v}{c} \nu_0 \cos \alpha \sin \frac{\theta}{2} \quad (1)$$

où α est l'angle entre la direction de la vitesse et celle de la bissectrice extérieure de l'angle de diffusion θ , c : est la vitesse de la lumière.

Les vitesses de déplacement des spermatozoïdes sont le plus souvent inférieures à $100 \mu.s^{-1}$. Les variations de fréquence $\Delta\nu$ sont alors, pour les angles de mesure choisis (en général $\theta \sim 10^\circ$), de quelques dizaines d'Hertz au maximum. Comme ν_0 est de l'ordre de $5 \times 10^{14} s^{-1}$, il est nécessaire, pour mesurer de telles variations de fréquences, d'utiliser les méthodes spectroscopiques de battements de photons (13, 14) qui ont un pouvoir de résolution fantastique (de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-15}). On utilise ainsi soit la méthode homodyne soit la méthode hétérodyne.

La méthode de détection homodyne consiste à envoyer la lumière diffusée sur la photocathode d'un photomultiplicateur et à analyser les fluctuations du photocourant produites par les battements de toutes les fréquences lumineuses entre elles. *Le spectre des fluctuations du photocourant est alors le produit de convolution du spectre optique par lui-même.*

La méthode hétérodyne consiste à mélanger sur la photocathode du photomultiplicateur, la lumière diffusée avec un oscillateur local d'intensité $I_{OL} \gg I_{(\omega)}$ calé à la fréquence ω_{OL} dont le spectre est représenté pratiquement par une distribution de Dirac. Dans ce cas, *la densité spectrale du photocourant est la convolution du spectre optique par une fonction de Dirac, donc elle est identique au spectre optique lui-même* mais centrée à la fréquence ω_{OL} de l'oscillateur local.

A partir du spectre de la lumière diffusée on peut théoriquement remonter à la dynamique des objets en mouvements.

Il est évident que dans le problème qui nous intéresse, nous utiliserons la méthode de détection hétérodyne, car le spectre des fluctuations du photocourant donne directement le spectre Doppler $S(\nu) \equiv S(\Delta\nu)$ où ν est la fréquence d'analyse.

2.1 INTENSITÉ DIFFUSÉE, MESURE DE LA CONCENTRATION EN SPERMATOZOÏDES. — Si un faisceau de lumière parallèle, monochromatique et d'intensité P_0 , est envoyé sur une suspension de spermatozoïdes une partie de cette lumière est rediffusée dans l'espace avec une intensité I_D telle que :

$$I_D = C \times N_T + I_P \quad (2)$$

où N_T est la concentration de spermatozoïdes et I_P est l'intensité diffusée par tous les autres éléments inclus dans la suspension (débris cellulaires, cristaux, etc...), la mesure de I_D peut donc constituer une détermination de la concentration en spermatozoïdes, $C = C_1 P_0 f(\theta)$.

C_1 est une constante qui tient compte de la section efficace de diffusion des spermatozoïdes et des paramètres géométriques de la mesure. θ est l'angle que fait la direction d'observation avec la direction du faisceau incident. Si P_0 et θ sont fixés, $I_D - I_P$ est proportionnel à N_T .

2.2 PARAMÈTRES LIÉS A LA MOBILITÉ DES SPERMATOZOÏDES. — 2.2.1 *Mesure de vitesses.* — La vitesse de déplacement des spermatozoïdes peut être déduite de l'étude du spectre en fréquences de la lumière diffusée. Pour un spermatozoïde se déplaçant à la vitesse v , la fréquence ν_D de la lumière diffusée est reliée à celle de la lumière incidente ν_0 par la relation de l'effet Doppler (Equation (1)).

Notons cependant que les spermatozoïdes ne se déplacent jamais en ligne droite, mais que les battements du flagelle imposent à la tête un mouvement oscillant superposé au mouvement de progression, ce dernier n'intervenant pas forcément selon une trajectoire rectiligne. La vitesse v dont nous parlons ici doit donc être considérée comme une vitesse de translation *instantanée* définie sur une trajectoire d'une longueur minimum de 10 μ , mais, dans la plupart des cas, nous ne déduirons aucune information sur le type du mouvement.

Si les spermatozoïdes se déplacent tous avec la même vitesse et dans la même direction, le spectre de fréquence de la lumière diffusée ne sera représenté que par une seule valeur $\nu = \nu_D$ et sa mesure permettra de connaître le terme $v \cos \alpha$ (ou v si α est connu). Si, dans la suspension étudiée, il y a N_v spermatozoïdes mobiles se déplaçant dans toutes les directions, et avec des vitesses différentes, le spectre de la lumière diffusée est alors une *intégrale* de la relation (1) sur tous les angles et toutes les vitesses représentées [10, 11, 12]. Le spectre $S(\nu)$, c'est-à-dire l'intensité S en fonction de la fréquence ν , est alors représenté par l'expression :

$$S(\nu) = N_v \int_{v=\nu/k}^{\infty} \frac{p(v)}{kv} dv \quad (3)$$

où $p(v)$ est la densité de probabilité de la vitesse v dans la population étudiée avec

$$\int_{v=0}^{v=\infty} p(v) dv = 1, \quad k = \frac{2 \nu_0}{c} \sin \frac{\theta}{2}. \quad (4)$$

Pour connaître le $p(v)$ correspondant à un spectre $S(\nu)$ mesuré, il suffit de dériver $S(\nu)$

$$\frac{dS(\nu)}{d\nu} \div \frac{p(v)}{kv} \quad (5)$$

$$p(v) \div \frac{\nu dS(\nu)}{d\nu}$$

la distribution des vitesses des spermatozoïdes est obtenue point par point à l'aide de la relation (5) où

$$v \Leftrightarrow \frac{\nu}{k}.$$

2.2.2 *Distribution particulière des vitesses des spermatozoïdes humains.* — L'étude d'une série de spermatozoïdes humains — dont les principaux résultats ont été présentés en [18] — a montré que la distribution des vitesses des spermatozoïdes dans le liquide séminal est généralement bien définie. En effet, le spectre des fréquences, exprimé en coordonnées semi-logarithmiques, est alors linéaire et la distribution des vitesses qui lui correspond est alors :

$$p(v) = \frac{1}{V_c^2} v e^{-v/V_c} \quad (6)$$

où V_c est la vitesse caractéristique des spermatozoïdes.

La mesure de la grandeur de cette vitesse V_c est obtenue simplement et rapidement par la mesure de la pente β du spectre exprimé en coordonnées semi-logarithmiques ($\text{Log } S(\nu)$)

$$V_c = \frac{1}{\beta k} \quad (7)$$

k est le paramètre déterminé plus haut, donc connu pour un angle de mesure donné.

2.2.3 *Détection du spectre de fréquences.* — Dans le cas d'un spectre défini comme précédemment, l'analyse des fluctuations du photocourant redonne directement le spectre Doppler $S(\nu) \equiv S(\Delta\nu)$ où ν est la fréquence d'analyse (Fig. 1) (détection hétérodyne).

L'efficacité du battement entre le faisceau diffusé et l'oscillateur local est défini par le taux d'hétérodyne $h \leq 1$.

$h = 1$ lorsque tous les réglages optiques sont optimisés. L'intensité totale du spectre détecté est telle que :

$$\int_0^{\infty} S(\nu) d\nu \div h I_{OL} iD \div N_T \quad (8)$$

où I_{OL} est l'intensité de l'oscillateur local et N_T est le nombre total de spermatozoïdes.

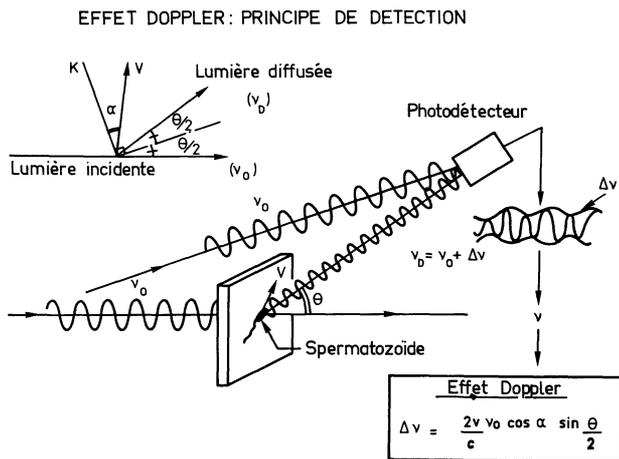


Fig. 1. — Effet Doppler. Principe de détection.

[Doppler effect. Principle of detection.]

2.3 MESURE DE LA CONCENTRATION DE SPERMATOZOÏDES MOBILES. — La mesure de la concentration de spermatozoïdes mobiles soit N_v peut être donnée par l'intégrale du spectre en fréquences de la lumière diffusée. Celui-ci est cependant composé de deux parties : celle donnée par les spermatozoïdes mobiles, entièrement déterminée par leur vitesse, comme indiqué précédemment (3) et celle donnée par les spermatozoïdes *immobiles* qui contribuent au spectre $S(v)$ par leur seul mouvement brownien. Un filtrage astucieux du spectre permet cependant d'éliminer la contribution de ces derniers, de telle sorte que la mesure de l'intégrale du spectre en fréquences soit directement proportionnelle aux seuls spermatozoïdes mobiles.

L'élimination du spectre donné par les spermatozoïdes immobiles (morts et non mobiles) se fait en mettant à la sortie du photodétecteur un filtre passe-bande, dont la fréquence coupure basse v_m est supérieure à la fréquence des spectres donnés par les immobiles ; sa fréquence haute v_M est supérieure aux fréquences des spectres donnés par les mobiles (Fig. 2, II).

On a alors :

$$S_v = \int_{v_m}^{v_M} S(v) dv \# S_v(v) dv \div I_{DV} \div N_v \tag{9}$$

où S_v est le spectre donné par les seuls spermatozoïdes mobiles, de concentration N_v et diffusant une intensité I_{DV} .

La mesure de l'intensité intégrée S_v du spectre à travers le filtre passe-bande permet donc de connaître la concentration de spermatozoïdes mobiles

$$N_v = \frac{S_v}{h I_{OL} C_1 f(\theta) P_0} \tag{10}$$

$C_1 f(\theta)$ est donné par la pente de la droite $i_D = f(N)$ tracée pour un angle d'observation donné ; h est

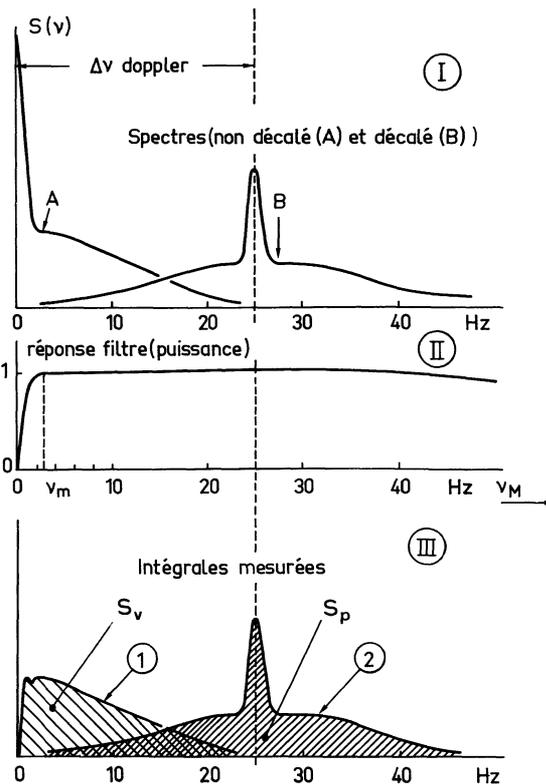


Fig. 2. — Principe de la mesure de la concentration de spermatozoïdes mobiles et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. I. Spectre A : cellule immobile ; spectre B : cellule mobile. II. Réponse du filtre passe-bande. III. Intégrales mesurées des spectres A(I_1) et B(I_2).

[Principle of the measurement of the percentage of motile spermatozoa. I. A spectrum : the cell being motionless ; B spectrum : the cell being in motion. II. Response of the pass-band filter. III. Measured integrals.]

déterminé par la comparaison de l'intensité intégrée d'un spectre connu mesuré avec l'intensité de référence pour $h = 1$.

2.4 MESURE DIRECTE DU POURCENTAGE DES SPERMATOZOÏDES MOBILES. — Le principe de la méthode consiste à mesurer l'intégrale des spectres de la lumière diffusée dans deux conditions :

1) Comme au paragraphe précédent, la cellule étant immobile.

2) La cellule étant animée d'un mouvement convenable. Nous venons de voir que dans la condition 1) l'intégrale du spectre est proportionnelle à N_v . Par contre, dans le second cas, du fait du mouvement de la cellule, tout se passe comme si tous les spermatozoïdes étaient mobiles. Le spectre intégré est donc proportionnel au nombre total N_T des spermatozoïdes (Fig. 2).

Le rapport des deux mesures soit S_v/S_p donne directement le pourcentage de spermatozoïdes mobiles

$$\frac{S_v}{S_p} = \frac{N_v}{N_T} \tag{11}$$

Ce type de mesure a l'avantage de s'affranchir des réglages optiques et électroniques, mais il n'est valable que si l'intensité des diffusions parasites est négligeable devant celles données par les spermatozoïdes (ce fait introduit une limitation dans le cas des spermatozoïdes à très faible concentration).

3. Montage expérimental. — L'appareillage (Fig. 3) est essentiellement constitué d'une partie optique (source de lumière laser, cellule de diffusion contenant le sperme, composants optiques divers, détecteurs) et d'éléments électroniques traitant l'information (analyseur de spectre, intégrateur de spectre, enregistreurs). Une description technique détaillée en est donnée en [15]; nous rappelons ci-dessous les principales caractéristiques de l'appareillage.

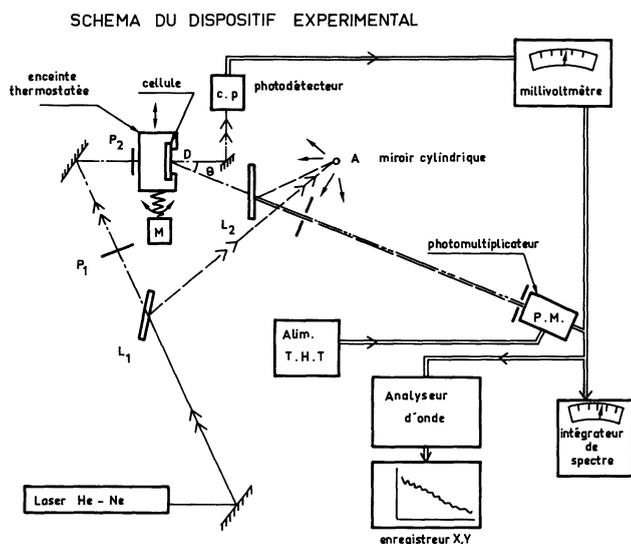


Fig. 3. — Schéma du dispositif expérimental.

[Experimental device.]

3.1 CARACTÉRISTIQUES OPTIQUES. — Le faisceau issu d'un laser He-Ne d'une puissance de 6 mW, est séparé en deux parties pratiquement égales par la lame L_1 . La partie transmise sert de faisceau excitateur. Après avoir été ajustée en puissance (toujours inférieure à 0,3 mW) par le polariseur P_1 , elle traverse la cellule contenant les spermatozoïdes. Le faisceau réfléchi par la lame L_1 éclaire un miroir cylindrique de très faible rayon constitué par une aiguille A , placée de telle façon que son image donnée par la lame L_2 soit rigoureusement confondue avec le point d'impact D du faisceau excitateur sur la cellule. Pour tout angle de mesure θ , la lumière diffusée par la cellule et celle réfléchie par l'aiguille (oscillateur local) puis par la lame L_2 semblent provenir du même point, condition indispensable pour assurer un bon taux d'hétérodynage.

Les deux faisceaux d'ouverture utile $2,3 \times 10^{-5}$ stéradians sont reçus sur un photomultiplicateur. L'inten-

sité de l'oscillateur local est ajustée par le déplacement de la lame L_1 .

Le faisceau incident, après avoir traversé l'emplacement de la cellule, est envoyé à l'aide d'un prisme sur une cellule photoélectrique qui donne la mesure de P_0 et de P transmis lorsque la cellule est en place.

La cellule contenant le sperme est une cuve en verre, cylindrique ($\varnothing = 20$ mm) démontable donc très facilement nettoyable. Son épaisseur utile est de 0,1 mm et son volume utile de 17 mm^3 .

La cellule est placée dans un bloc de cuivre dont la température peut être stabilisée entre l'ambiante et quelques dizaines de degrés C. Le bloc de cuivre, donc la cellule, peut être translaté perpendiculairement au faisceau excitateur soit manuellement, soit mécaniquement. La cellule est alors soumise à un mouvement de va-et-vient d'amplitude et de vitesse réglables.

3.2 CARACTÉRISTIQUES ÉLECTRONIQUES. — Les deux éléments importants de mesure sont l'intégrateur de spectre et l'analyseur de fréquence.

L'intégrateur de spectre est un filtre passe-bande suivi d'un millivoltmètre de lecture; la coupure ν_m est de 0,4 Hz, la coupure ν_M de 100 Hz a été choisie pour que les plus larges des spectres observés soient entièrement pris en compte.

L'analyseur de spectres est de type conventionnel. Le fait qu'il travaille en temps réel permet d'avoir le spectre instantané. Celui-ci cependant est très fluctuant, étant donné l'origine même des phénomènes étudiés, il peut donc être accumulé autant de fois qu'il est nécessaire pour obtenir une courbe lissée et exploitable. En moyenne 2 à 3 mn d'accumulation sont suffisantes. La sortie des résultats se fait sur un enregistreur XY.

3.3 CONDITIONS ET MÉTHODES DE MESURE. — L'angle d'observation choisi est de 8° car pour cet angle de diffusion, la majorité de la lumière reçue par le photomultiplicateur provient des têtes de spermatozoïdes.

La puissance incidente est ajustée de telle façon que les mesures se fassent avec la même valeur de I_D , quel que soit le sperme étudié. Cette puissance est toujours très faible et ne modifie en rien la mobilité des spermatozoïdes quel que soit le temps d'exposition. On choisit une intensité de I_{OL} égale à $20 I_D$.

L'épaisseur de la cellule est telle que les mesures puissent se faire directement avec *du sperme non dilué*. Celui-ci, déposé dans la cellule maintenue dans le bloc thermostaté du montage, ne subit donc pas de modification thermique.

L'ensemble des différentes mesures qui donnent tous les paramètres étudiés précédemment, pour un même sperme, s'effectuent en moins de 5 mn, temps suffisamment court pour éviter une évolution spontanée d'un sperme. Le caractère fluctuant de la mesure du spectre de fréquences, nécessite plusieurs lectures indépendantes; en général, dix mesures relevées sur une minute donnent une précision de 5 %.

4. **Résultats.** — Nous avons appliqué la méthode de mesure décrite dans ce travail, à l'étude systématique d'une série de 150 spermatozoïdes pris au hasard. L'objet de la présente publication n'est pas l'analyse détaillée des résultats portant sur cette série, mais d'illustrer à l'aide de quelques exemples les possibilités et les limites de l'appareillage proposé.

C'est pourquoi, dans le tableau I, nous donnons les résultats de l'étude de 3 spermatozoïdes de populations très différentes. Pour chaque échantillon présenté, nous avons déterminé :

- la concentration/cc des spermatozoïdes : N_T ,
- la vitesse caractéristique V_c ,
- la distribution des vitesses $p(v)$,
- la concentration/cc des spermatozoïdes mobiles : N_v ,
- le pourcentage des spermatozoïdes mobiles : $M\%$.

4.1 COMMENTAIRES DU TABLEAU I. — *a)* La concentration (N_T) des spermatozoïdes est obtenue à partir de la loi de variation linéaire de l'intensité diffusée : $I_D = f(N_T)$ déduite de l'étude systématique de la série des 150 spermatozoïdes. La pente de la droite moyenne des variations de I_D nous a donné, par ailleurs, la valeur expérimentale du coefficient :

$$C_1 f(\theta) = 1,83 \times 10^{-9} \left(\frac{MV}{N} \right),$$

nécessaire à la détermination de la concentration/cc en spermatozoïdes vivants : N_v .

b) La vitesse caractéristique V_c des spermatozoïdes mobiles est obtenue à partir de la pente du spectre en fréquences exprimée en coordonnées semi-logarithmiques tableau (I A-C-D-E).

Afin d'éliminer l'influence du bruit de photons qui introduit une distorsion du spectre, il n'est pris en considération, pour déterminer la pente, que la partie située au-dessus d'une droite à 10 dB au-dessus du bruit de photons.

c) La distribution des vitesses est obtenue à partir du spectre en fréquences exprimé en coordonnées linéaires tableau I B. Cette distribution des vitesses est en bon accord avec la mesure directe de V_c déduite de la figure A du tableau I ($V_c = 51 \mu.s^{-1}$, sperme n° 1).

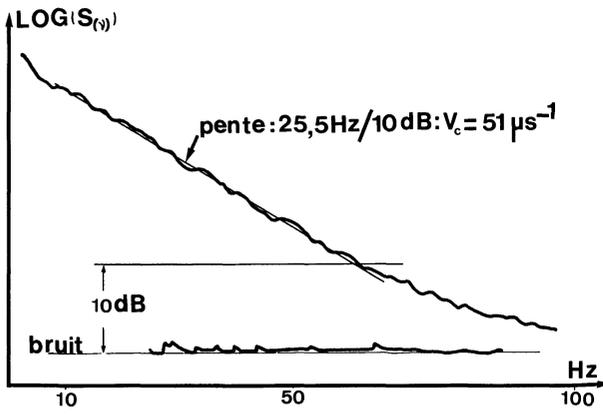
d) La concentration des spermatozoïdes mobiles N_v est obtenue à partir de l'intégrale du spectre en fréquences exprimé en coordonnées linéaires (Fig. B a du tableau I) compte tenu de la valeur expérimentale du coefficient $C_1 f(\theta)$ et en utilisant le filtre passe-bande.

e) Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles ($M\%$) s'obtient en utilisant le filtre passe-bande (Fig. 3).

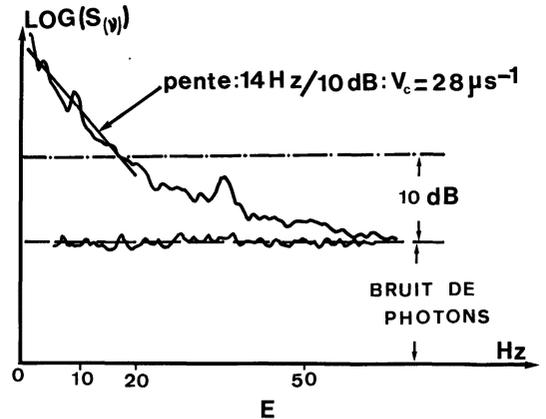
f) Limites de la méthode. — Les résultats obtenus à partir du sperme n° 3 tableau I donnent les limites d'utilisation de la méthode. Dans l'exemple proposé, il est impossible de déterminer d'une façon significative N_T , N_v et $M\%$. Les mesures relatives à ces 3 paramètres n'ont un sens que si la concentration des sperma-

Tableau I.

| Echantillons | Paramètres déduits de l'observation au microscope | Paramètres déduits de la diffusion de la lumière |
|--------------|--|---|
| Sperme n° 1 | $N_T = 149 \times 10^6$ sp/cc Cellules = 5×10^6 cell/cc $M\% = 70\%$ | $N_T = 152 \times 10^6$ sp/cc $V_c = 51 \mu.s^{-1}$ Fig. A $P(v) =$ Fig. B $N_v = 118 \times 10^6$ sp/cc $M\% = 86\%$ |
| Sperme n° 2 | $N_T = 88 \times 10^6$ sp/cc Cellules : 9×10^6 cell/cc 1 h après prélèvement $M\% = 60\%$ 5 h après prélèvement $M\% = 35\%$ | $N_T = 98 \times 10^6$ sp/cc 1 h après prélèvement $V_c = 60 \mu.s^{-1}$ Fig. C (a) $N_v = 48 \times 10^6$ sp/cc $M\% = 41\%$ 5 h après prélèvement $V_c = 48 \mu.s^{-1}$ Fig. C (b) $N_v = 33 \times 10^6$ sp/cc $M\% = 28\%$ Fig. D : spectre des spermatozoïdes tués $V_c =$ inexploitable |
| Sperme n° 3 | $N_T = 0,6 \times 10^6$ sp/cc Cellules : 0 $M\% = 68\%$ | $N_T = 6 \times 10^6$ sp/cc $V_c = 28 \mu.s^{-1}$ (Fig. E) $N_v =$ inappréciable $M\% =$ non significative |



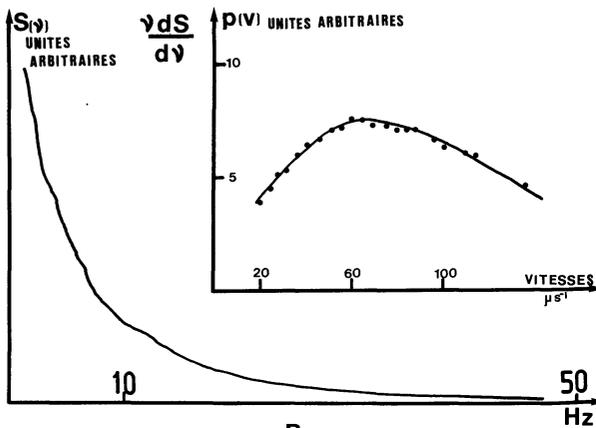
A



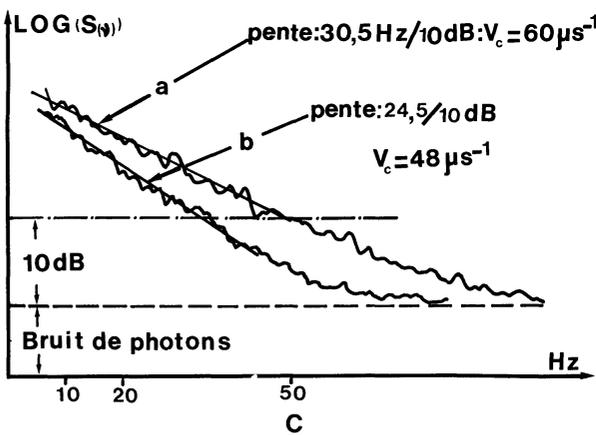
E

Figs. A, B, C, D, E. — Voir texte et tableau I.

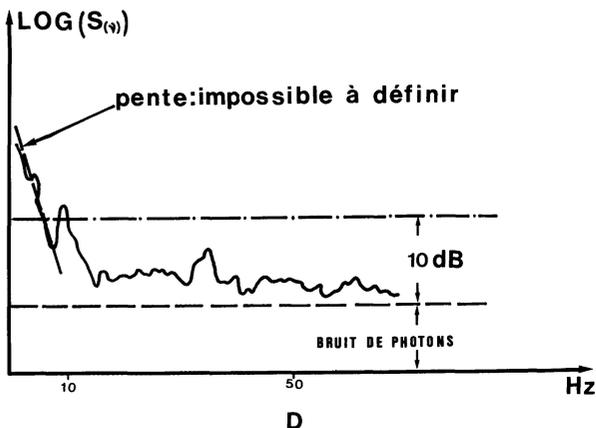
[A, B, C, D, E. — Cf. text and table I.]



B



C



D

tozoïdes mobiles de l'échantillon est $\geq 3 \times 10^6/\text{cc}$. Par contre, la détermination de la vitesse caractéristique V_c reste significative jusqu'à une concentration de spermatozoïdes mobiles de $0,5 \times 10^6/\text{cc}$.

g) *Précision.* — Les valeurs des différents paramètres obtenus par cette méthode nécessitent les remarques suivantes :

— La détermination de N_T , N_V et $M\%$ est fortement influencée par la présence de lumière diffusée parasite, due aussi bien à l'hétérogénéité des spermatozoïdes qu'aux cellules, aux débris cellulaires, aux petits cristaux et au liquide séminal. Par conséquent, les valeurs de ces 3 paramètres, obtenues dans le cas de spermatozoïdes à faible concentration en spermatozoïdes, doivent être soumises à une correction tenant compte de cet effet parasite global.

— Par contre, la détermination de la vitesse caractéristique V_c n'est pas influencée par cette diffusion parasite. Ce paramètre est déterminé à mieux que 5%.

h) *Reproductibilité des mesures.* — Pour estimer la reproductibilité des mesures faites par notre technique, nous avons comparé les résultats obtenus avec différents échantillons d'un même sperme. Cette étude nous a permis de montrer que :

- les mesures de la mobilité sont reproductibles à 5% près,
- les déterminations des vitesses caractéristiques V_c sont reproductibles à 6%.

4.2 DISCUSSION DE LA MÉTHODE DE MESURE. — La liste des exigences auxquelles devrait satisfaire une technique d'étude de la mobilité des spermatozoïdes a été évoquée au début de cet article à propos de l'analyse des méthodes existantes.

Les résultats rapportés ci-dessus montrent que la méthode proposée répond aux objectifs 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9.

La distribution du nombre total de spermatozoïdes mobiles en fonction de la vitesse (objectif n° 2) est

donnée par notre technique qui, par contre, ne permet pas de connaître le type du mouvement de chaque cellule mobile. Cette information, bien qu'utile, n'apparaît pas essentielle pour l'évaluation de la valeur fonctionnelle d'une population de spermatozoïdes.

Il en est de même pour l'exigence n° 5. Si la méthode ne peut donner la *distribution des spermatozoïdes mobiles en fonction de la direction de leur déplacement*, elle permet de préciser le caractère plus ou moins orienté de la mobilité d'une population de spermatozoïdes.

Ce renseignement est de grande valeur quand il s'agit d'apprécier la qualité de la progression des spermatozoïdes dans les sécrétions du col de l'utérus. Ces sécrétions ou mucus cervical, constituent un véritable barrage que doivent franchir les spermatozoïdes pour pénétrer dans l'utérus.

La réussite de la pénétration dépend des caractéristiques du mucus cervical, qui varient en fonction de la situation endocrinienne. Par résonance magnétique Odeblad [16] a montré l'importance de la structure du mucus cervical : sous stimulation œstrogénique, les mucoprotéines constitutives se regroupent en micelles disposées parallèlement et entre lesquelles les spermatozoïdes peuvent se déplacer.

La technique décrite ici se prête particulièrement bien à l'étude de la pénétration des spermatozoïdes dans le mucus cervical humain comme l'ont montré Dubois, Berge, Jouannet, David [17].

Le mouvement étant orienté, toutes les vitesses ont

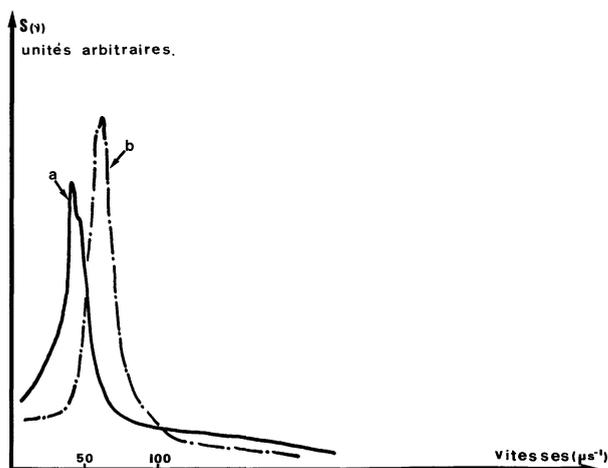


Fig. 4. — Spectre dû aux mouvements des spermatozoïdes dans le mucus cervical humain. Ces mesures ont été effectuées 1/2 h après le début de la pénétration des spermatozoïdes d'un sperme (de $265,5 \times 10^6$ sp/cc, et 85 % de spermatozoïdes mobiles) en deux points différents de la pipette. Courbe (a) = à 3 cm de l'extrémité où s'est faite la pénétration ; courbe (b) = à 7,5 cm de l'extrémité où s'est faite la pénétration.

[Spectra corresponding to spermatozoa in human cervical mucus. These spectra were obtained in two different points of the pipette, 1/2 h after the beginning of the penetration of spermatozoa from a semen with $265,5 \times 10^6$ spermatozoa per cc and 85 % of mobile spermatozoa. (a) At 3 cm from the point of penetration ; (b) At 7.5 cm from the point of penetration.]

la même direction et le spectre de fréquences est directement représentatif de la distribution des vitesses de progression des spermatozoïdes ($\alpha = \text{Cte}$ dans la formule (1) du § 2).

La figure 4 donne un exemple de spectre obtenu à partir de spermatozoïdes ayant pénétré dans le mucus cervical humain. Celui-ci a été prélevé dans une pipette rectangulaire de section carrée de 1 mm \times 1 mm, disposée perpendiculairement au faisceau laser incident.

Nous voyons donc que cette méthode de mesure de la *mobilité* d'une population cellulaire permet de mieux comprendre la physiologie du spermatozoïde et de tester, par exemple, l'action de facteurs exogènes sur la population spermatique.

Nous allons maintenant voir les possibilités qu'elle offre dans le cas particulier de l'étude de la dynamique d'action des anticorps immobilisants.

5. Application à l'immunologie de la reproduction [25]. — 5.1 IMMOBILISATION ET STÉRILITÉ. —

Malgré la multiplicité des examens, l'origine de la stérilité du couple reste inconnue dans une proportion importante de mariages stériles. La mise au point de nombreuses techniques immunologiques variées a permis, au cours des 2 dernières décennies, de prouver l'existence, dans certains types de stérilités, d'une réaction immunitaire qui reposerait :

- chez l'homme, sur un processus d'*auto-immunisation* contre l'épithélium séminifère ou contre les spermatozoïdes,

- chez la femme, sur une *iso-immunisation* à l'égard des anticorps spermatiques, susceptible d'induire la formation d'anticorps présents dans le sérum ou au niveau du tractus génital.

La présence d'anticorps entraîne une altération de la mobilité des spermatozoïdes, donc une diminution ou perte des possibilités de fécondation.

Récemment, Eyquem et d'Almeida [19-24] ont discuté la responsabilité des processus immunologiques dans la stérilité. Leur travail a mis en évidence la pluralité des techniques sérologiques, permettant la détection des anticorps anti-spermatozoïdes, mais aussi la *non-concordance des résultats obtenus sur un même sérum*, par ces différentes techniques. Il est évident qu'il y a là un premier obstacle à l'appréciation de l'immunité.

5.2 PRINCIPES DES MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES. —

Les tests d'immobilisation, utilisés actuellement, pour caractériser l'action d'un sérum antisperme, font appel à la simple détermination d'un indice d'activité au microscope. En général on définit cet indice :

- Soit en temps. Temps au bout duquel 90 % des spermatozoïdes sont immobilisés dans ce sérum, par rapport à un sérum témoin normal.

- Soit en pourcentage de spermatozoïdes immobilisés. Indice d'immobilisation à 50 % par rapport à un

sérum témoin normal au bout d'un temps fixe de 2 heures après le début de la réaction immunologique.

Cette méthodologie présente évidemment l'inconvénient d'un *temps mort* (incubation) pendant lequel nous n'avons aucune information sur l'évolution de la réaction immunologique, et elle ne conduit qu'à une appréciation très subjective de l'activité du sérum. De plus, elle ne donne accès qu'au paramètre pourcentage de mobiles et à aucun autre paramètre dynamique caractérisant la population étudiée. Enfin elle nécessite un temps d'expérimentation très long, car on étudie une gamme de dilutions du sérum s'étendant de 1/1 à 1/2ⁿ.

Pour essayer de comprendre le processus de la réaction immunologique, nous avons appliqué la méthode décrite au début de cet article pour étudier l'évolution temporelle des divers paramètres (vitesse caractéristique, nombre absolu de spermatozoïdes mobiles, distribution des vitesses) caractérisant une population de spermatozoïdes au contact d'un sérum antisperme. Cette étude, dont nous présentons ici les résultats, a porté sur un hétérosérum et sur un allosérum antisperme.

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé des spermatozoïdes humains, provenant de spermes normaux à la concentration de $50 \times 10^6/cc$, un pourcentage de mobiles $\geq 70\%$ et de vitalité $\geq 90\%$.

5.2.1 *Hétérosérum*. — La figure 5 donne la courbe de cytotoxicité de l'hétérosérum étudié (brebis). En ordonnées on a porté la mortalité (exprimée en pourcentage et rapportée à l'échantillon témoin) en fonction de chaque dilution de l'hétérosérum. Chaque point expérimental de ce graphique correspond à une moyenne de 10 mesures effectuées sur 10 spermes différents. Les barres verticales donnent les écarts maxima observés sur ces 10 spermes. Les traits horizontaux inférieurs (en pointillés) représentent la mortalité spontanée moyenne initiale et finale de l'échantillon témoin.

Dans le domaine des fortes cytotoxicités de l'hétéro-

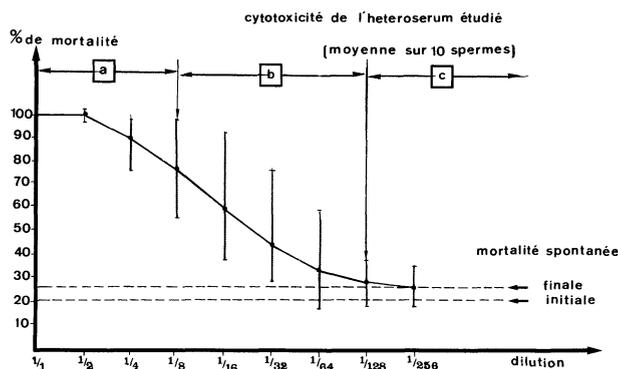


Fig. 5. — Courbe de cytotoxicité de l'hétérosérum étudié. Chaque point expérimental représente la moyenne de 10 mesures effectuées sur 10 spermes différents.

[Cytotoxicity of the studied heteroserum. Each experimental point is the mean value of 10 measurements on 10 different semen.]

sérum (ⓐ sur la figure 5) l'évolution des divers paramètres est très rapide. C'est pourquoi, dans ce domaine de faible dilution, nous n'avons étudié que l'évolution temporelle de la vitesse caractéristique V_c . La figure 6 montre, à titre d'exemple, l'évolution temporelle du spectre en coordonnées semi-logarithmiques.

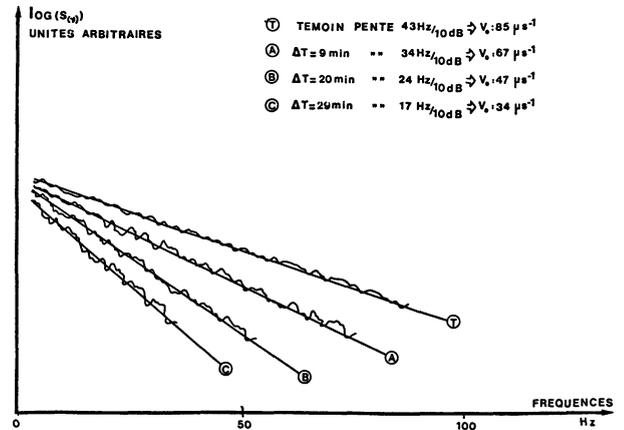


Fig. 6. — Exemple d'évolution de la vitesse caractéristique de spermatozoïdes en fonction du temps (en présence d'hétérosérum).

[Time dependence of a spectrum corresponding to a given semen under the action of the heteroserum.]

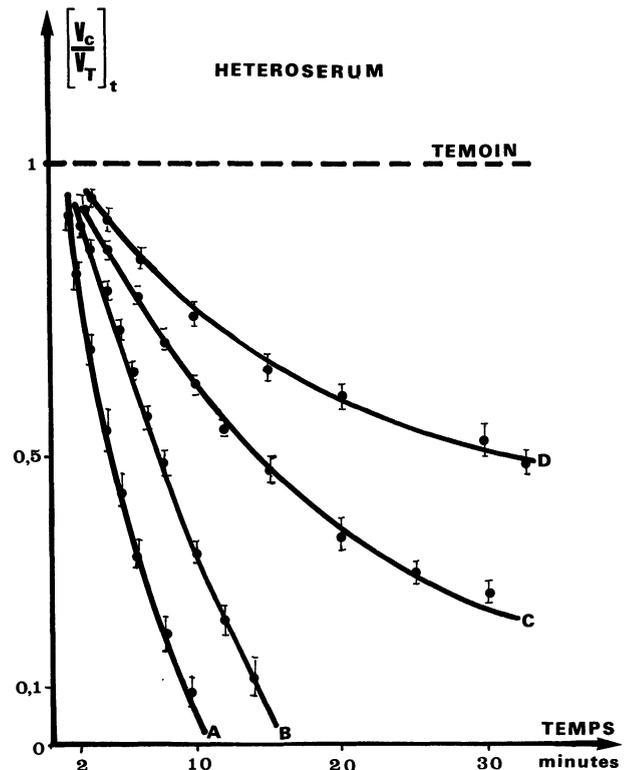


Fig. 7. — Evolution du rapport $(V_c/V_T)_t$ en fonction du temps. Chaque point expérimental est la moyenne de 7 mesures obtenues sur 7 spermes différents soumis à l'action de l'hétérosérum. Les courbes A, B, C, D, correspondent respectivement aux dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de l'hétérosérum (à 25 °C).

[Time dependence of the ratio $(V_c/V_T)_t$. Each experimental point is the mean value of 7 experiments performed on 7 different semen. The curves A, B, C, D correspond respectively to different dilutions of the heteroserum : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 at room temperature (25 °C).]

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus sur différents spermatozoïdes, nous avons normalisé cette vitesse caractéristique V_c à celle du témoin V_T mesurée au même instant.

La figure 7 donne une moyenne sur 7 spermatozoïdes de l'évolution temporelle de ce rapport. Le temps 0 étant déterminé par l'instant de la mise en contact de la population et du sérum complétement. La précision de la détermination de chaque point expérimental est de 7 %.

Pour caractériser l'évolution temporelle de ce paramètre, nous avons reporté les résultats de la figure 7 en coordonnées semi-logarithmiques.

La figure 8 montre ainsi que $\log(V_c/V_T)_t$ est une fonction linéaire du temps dans le domaine des fortes concentrations en hétérosérum (1/1, 1/2, 1/4, 1/8). Par conséquent la loi qui décrit l'évolution temporelle de la vitesse caractéristique d'une population de spermatozoïdes en contact avec l'hétérosérum étudié est du type exponentiel décroissant en fonction du temps.

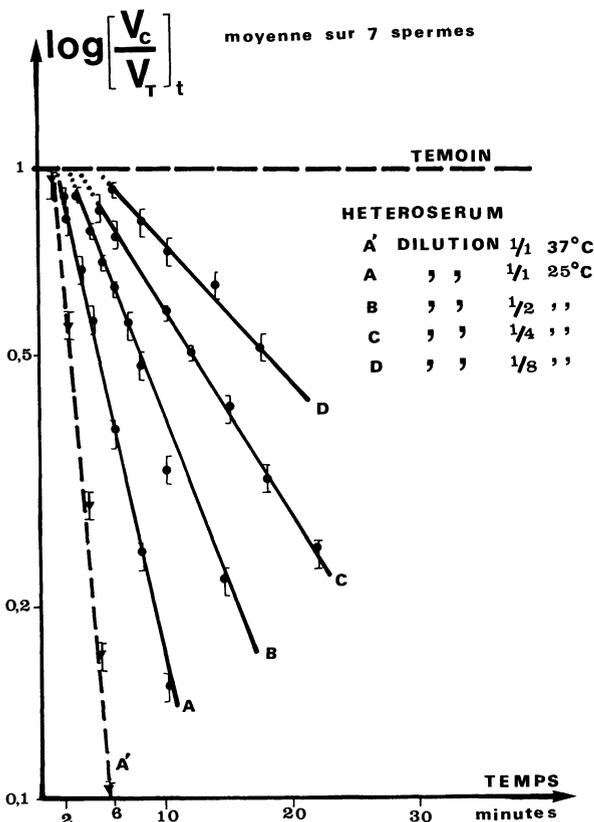


Fig. 8. — Résultats de la figure 7 en coordonnées semi-logarithmiques. La droite A' a été obtenue à 37 °C pour la dilution 1/1 de l'hétérosérum, les droites A, B, C, D correspondent respectivement aux dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 à la température de 25 °C.

[Time dependence of the ratio $(V_c/V_T)_t$ in a semi-Log plot. The dotted line A' corresponds to a dilution of 1/1, but at 37 °C instead of 25 °C (line A).]

Ce résultat nous permet donc de caractériser d'une façon objective l'activité de cet hétérosérum à une dilution donnée soit :

— par le temps caractéristique τ_c , de la décroissance exponentielle de la vitesse caractéristique (courbe A $\tau_c = 5$ min.),

— par le temps au bout duquel on obtient une diminution de 50 % de ce paramètre τ_{50} (courbe A $\tau_{50} = 3$ min.).

L'examen détaillé de la figure 8 montre de plus :

a) Que pour chacune des dilutions de l'hétérosérum étudié, le rapport $(V_c/V_T)_t$ ne décroît pas immédiatement à partir de $t = 0$ mais présente un *temps de latence* dans l'action des anticorps sur les spermatozoïdes, impliquant un effet protecteur possible du liquide séminal sur les spermatozoïdes.

b) Effet de température. Les courbes A, B, C, D ont été obtenues à la température ambiante (~ 25 °C). Il était intéressant de vérifier s'il existait, comme on pouvait le penser, une accélération de cette cinétique d'immobilisation due à une élévation de la température.

Pour mettre en évidence ce point, nous avons choisi de travailler sur un échantillon maintenu à 37 °C à la dilution 1/1 de l'hétérosérum. Du fait de sa haute activité, une telle concentration de sérum devrait être très sensible à un éventuel effet de la température.

La droite A' de la figure 8 représente les résultats de mesures moyennées sur 2 spermatozoïdes à 37 °C. On voit que le processus a la même évolution temporelle qu'à 25 °C, mais le temps caractéristique de cette exponentielle est notablement plus court qu'à 25 °C. En effet $\tau_c = 2$ min. (au lieu de 5 min.) et le temps

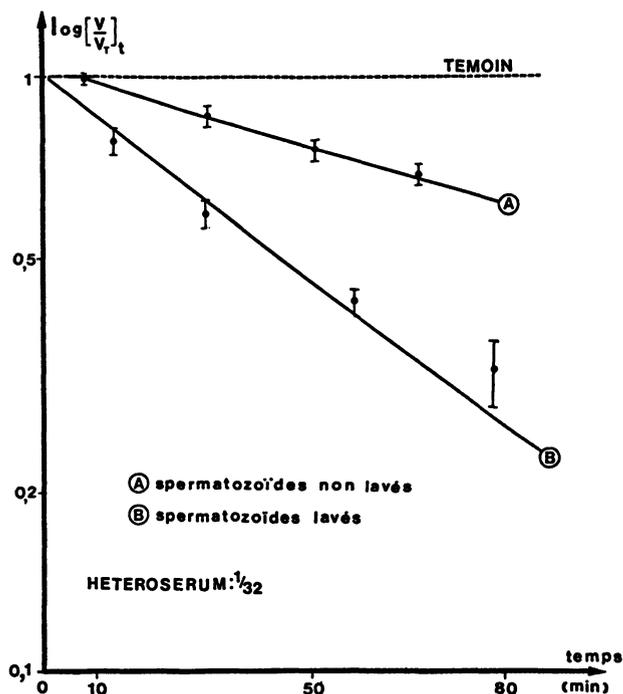


Fig. 9. — Influence du liquide séminal sur les spermatozoïdes en présence d'hétérosérum à la dilution de 1/32 (coordonnées semi-logarithmiques).

[Influence of the seminal plasma (dilution 1/32).]

$\tau_{50\%}$ est égal à 1 min. 40" (au lieu de 3 min.). Enfin le temps de latence n'a pas varié de façon significative.

La figure 9 montre l'effet éventuel de protection des spermatozoïdes par le plasma séminal. Les résultats de ce graphique (relatifs à la vitesse caractéristique) ont été obtenus sur deux populations de spermatozoïdes provenant d'un même sperme, dans les mêmes conditions de concentration, mais les uns étant suspendus dans leur plasma séminal (courbe A) les autres étant lavés (courbe B). On voit que le temps de latence a disparu (courbe B) et que le temps caractéristique de l'évolution B est plus rapide que celui de l'échantillon A ($\tau_{cA} = 91'$, $\tau_{cB} = 64'$).

La figure 10 montre l'évolution temporelle du paramètre nombre absolu de mobiles N_v (intégrale du spectre en coordonnées linéaires) dans la région des moyennes et fortes dilutions de l'hétérosérum étudié. Ce nombre N_v étant normalisé au témoin. Là encore, l'évolution de N_v est une exponentielle décroissante dans le temps (sans temps de latence).

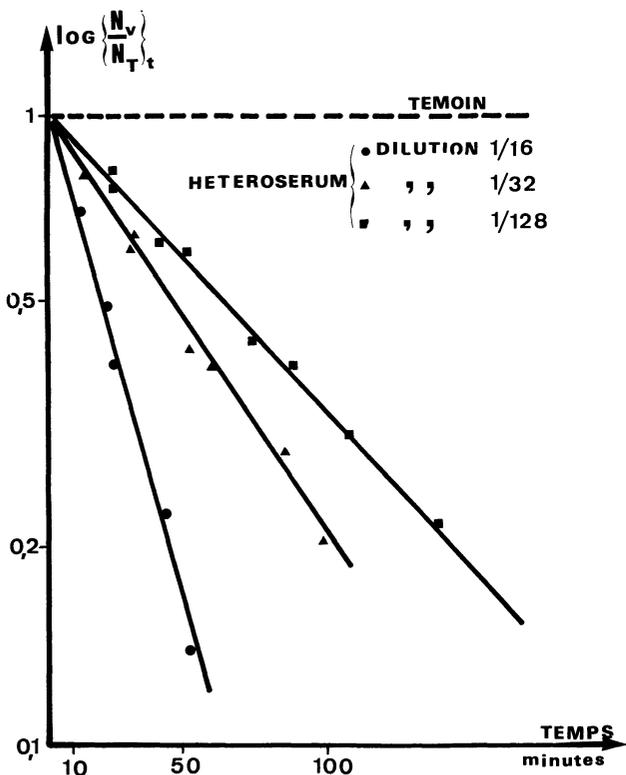


Fig. 10. — Evolution en coordonnées semi-logarithmiques du nombre absolu de spermatozoïdes mobiles dans le domaine des moyennes et fortes dilutions de l'hétérosérum (régions b et c de la figure 5).

[Semi-Log plot of the time dependence of the absolute number of mobile spermatozoa in the region of low and high dilutions of the heterosperm.]

Un autre résultat important nous est fourni par l'allure générale des spectres obtenus à partir de populations de spermatozoïdes soumises à l'action de l'hétérosérum étudié (Fig. 6). En effet le spectre

en coordonnées semi-logarithmiques est encore linéaire, donc la distribution des vitesses reste toujours définie par la relation (6) du paragraphe 2.2.2.

Les figures 11 et 12 représentent respectivement l'évolution temporelle des distributions des vitesses de spermatozoïdes lavés et non lavés issus d'un même sperme et soumis à l'action de l'hétérosérum étudié dilué au 1/32, mettant en évidence l'effet de protection des spermatozoïdes par le plasma séminal.

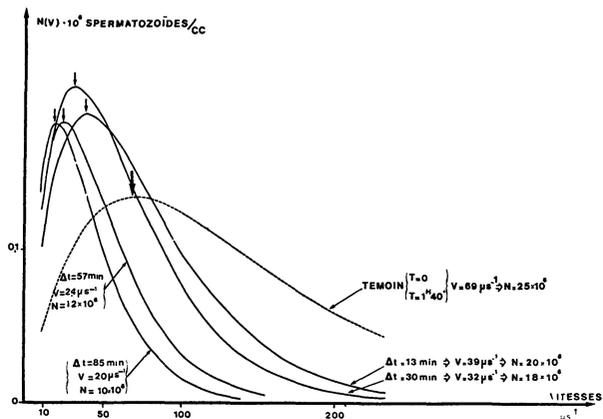


Fig. 11. — Evolution temporelle de la distribution des vitesses de spermatozoïdes lavés (dilution 1/32 de l'hétérosérum) (coordonnées linéaires).

[Time dependence of the velocity distribution for washed spermatozoa (dilution 1/32).]

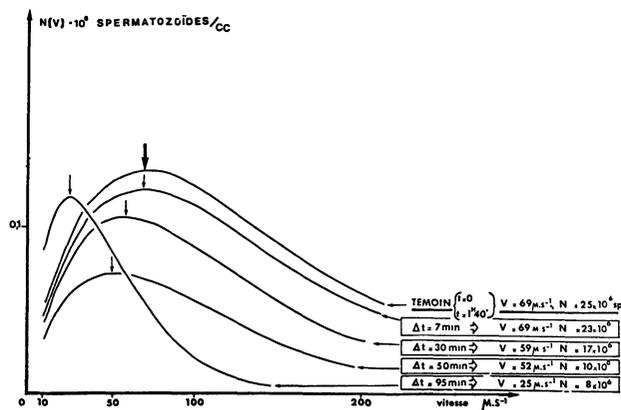


Fig. 12. — Evolution temporelle de la distribution des vitesses de la même population de spermatozoïdes non lavés. (Coordonnées linéaires.) (Comparer avec la figure 11.)

[Time dependence of the velocity distribution for the same unwashed population (dilution 1/32). Compare this figure with the last one.]

5.2.1 *Allosérum*. — Les résultats que nous présentons ici sur un allosérum ont été obtenus à la température de 37 °C, pour une dilution de 1/1.

1. *Vitesse caractéristique*. — La figure 13 (courbe A) montre que l'évolution temporelle de la vitesse caractéristique est encore une exponentielle décroissante dans le temps, mais avec un temps caractéristique

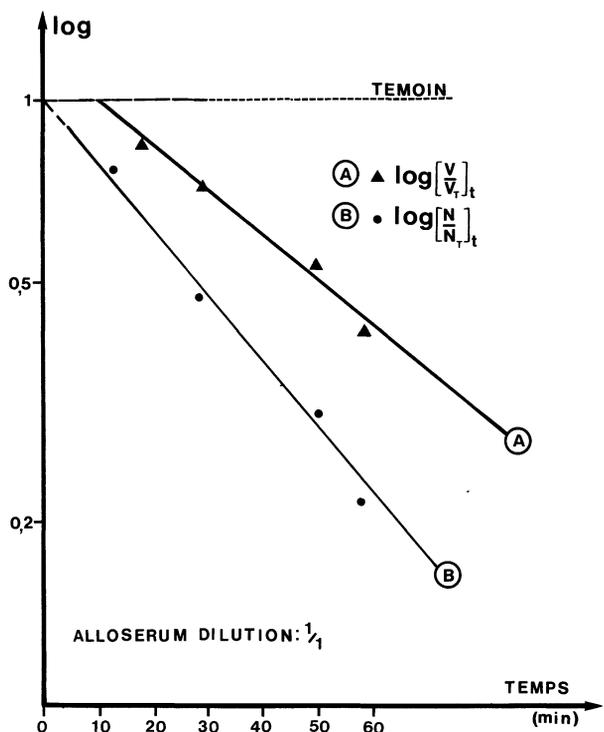


Fig. 13. — Evolution temporelle de la vitesse caractéristique et du nombre absolu de spermatozoïdes mobiles en présence d'allosérum (dilution 1/1) (coordonnées semi-logarithmiques).

[Semi-Log plot of the time dependence of the characteristic velocity and of the absolute number of mobile spermatozoa under the action of an allosérum.]

τ_c nettement plus long que dans le cas de l'hétérosérum à la même dilution ; en effet il est de l'ordre de 48 min. au lieu de 5'.

De même le temps $\tau_{50\%}$ est égal à 12' au lieu de 2'. Ainsi l'allosérum étudié serait environ 9 fois moins actif que l'hétérosérum étudié précédemment.

2. Nombre absolu de mobiles. — La cinétique plus lente de l'immobilisation des spermatozoïdes par l'allosérum étudié à la dilution de 1/1 nous a permis de déterminer à cette dilution, avec une bonne précision, la surface des spectres exprimés en coordonnées linéaires (donc de déterminer le nombre absolu de spermatozoïdes mobiles).

La figure 13 (courbe B) montre que l'évolution temporelle de ce paramètre est encore exponentielle décroissante comme dans le cas de l'hétérosérum, sans temps de latence. Ce graphique montre aussi que les variations de ce paramètre sont plus rapides que celles de la vitesse caractéristique. Par conséquent, l'évolution de ce paramètre permet une analyse *plus fine* de l'activité du sérum sur un sperme donné.

3. Distribution des vitesses. — Les figures 14 et 15 montrent l'évolution temporelle des distributions des vitesses respectivement pour deux populations de spermatozoïdes lavés et non lavés issus d'un même sperme, soumis à l'action de l'allosérum étudié à la dilution de 1/1.

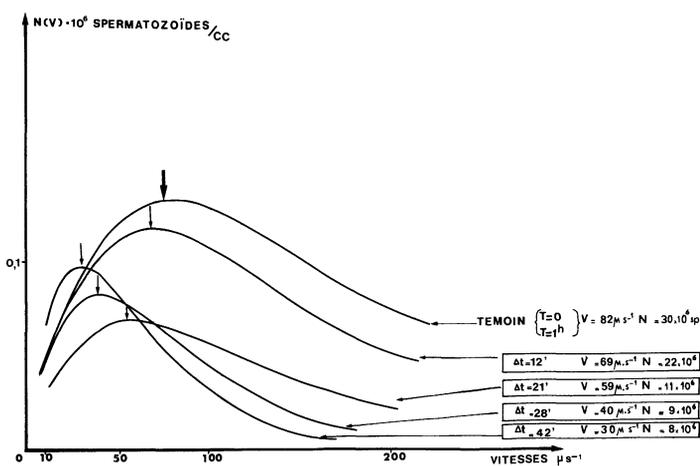


FIG. 14.

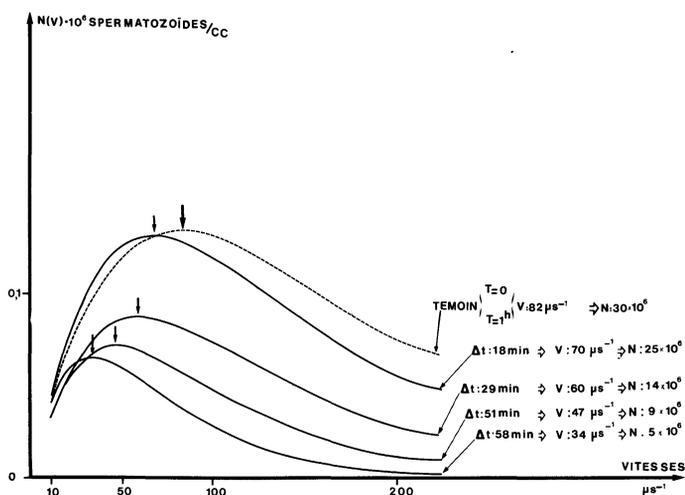


FIG. 15.

Figs. 14 et 15. — Evolutions temporelles respectives des distributions de vitesses de spermatozoïdes lavés et non lavés en présence d'allosérum à la dilution de 1/1 (coordonnées linéaires).

[Time dependence of the velocity distribution of a given population respectively washed and unwashed, under the action of an allosérum (dilution 1/1).]

Ces figures montrent encore une accélération de la cinétique de l'immobilisation des spermatozoïdes en absence de plasma séminal.

6. Conclusions. — La méthode que nous avons présentée ici, basée sur l'analyse du spectre de la lumière diffusée par des populations cellulaires et, plus particulièrement, par des populations de spermatozoïdes humains, permet, comme on l'a vu à partir de son application aux problèmes de l'immunologie, de caractériser avec finesse, précision et objectivité la mobilité des populations étudiées, aussi bien dans leur évolution naturelle que soumises à l'action de

facteurs physico-chimiques divers. Dans l'exemple de son application à l'immunologie elle a permis, pour la première fois, de montrer le caractère exponentiel décroissant de l'évolution de divers paramètres dynamiques et de donner une *mesure absolue* de l'activité d'un sérum.

Cette méthode a permis bien d'autres études variées

(influence de gradients de viscosités, de gradients de vitesse, etc...) qui contribuent à une meilleure connaissance du gamète mâle.

Signalons enfin que l'O.M.S. a jugé cette méthode comme étant actuellement la seule qui puisse cerner avec objectivité, précision et rapidité, le paramètre *mobilité* d'une population donnée.

Bibliographie

- [1] MAC LEOD, J., GOLD, R. Z., *Fert. Steril.* **2** (1951) 187.
 [2] MAC LEOD, J., GOLD, R. Z., *Fert. Steril.* **4** (1953) 10.
 [3] VAN DUIN, C., VAN VOORST, C., FREUND, M., *Europ. J. Obstet. Gynecol.* **4** (1970) 121.
 [4] DAVID, G., JOUANNET, P., BERGE, P., DUBOIS, M., VOLOCHINE, B., VIIIth World Congress Fert. Steril. (1974).
 [5] JECHT, E. W., RUSSO, J. J., *Andrologie* **5** (1973) 215.
 [6] MUNKTELL, G., FJALLBRANT, T., 3rd Int. Cong. Med. Phys. Gothenburg, 1972.
 [7] TIMOURIAN, H., WATCHMAKER, G., *Develop. Biol.* **21** (1970) 62.
 [8] ROTHSCHILD, *Nature* **171** (1953) 512.
 [9] BERGE, P., VOLOCHINE, B., BILLARD, R., HAMELIN, A., *C.R. Hebd. Séan. Acad. Sci.* **265** (1967) 889.
 [10] NOSSAL, R., CHEN, S. H., *J. Physique Colloq.* **33** (1972) C1-171.
 [11] COMBESCOT, R., *J. Physique* **31** (1970) 767.
 [12] BOON, J. P., NOSSAL, R., CHEN, S. H., *Bioph. J.* **14** (1974) 847.
 [13] CUMMINS, H. Z., KNABLE, N., YEH, Y., *Phys. Mes. Lett.* **12** (1964) 150.
 [14] DUBIN, S. R., LUNACEK, J. H., BENEDEK, G. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57** (1967) 1164.
 [15] BERGE, P., DUBOIS, M., *Revue Phys. Appl.* **8** (1973) 89.
 [16] ODEBLAD, E., RUDOLFSSON, C., BLANDAU, R. J., MOGHISSI, K., *The Biology of the Cervix* (University of Chicago Press) 1973.
 [17] DUBOIS, M., BERGE, P., JOUANNET, P., DAVID, G., *Nature* **252** (1974) 711.
 [18] JOUANNET, P., VOLOCHINE, B., DEGUENT, P., SERRES, C., DAVID, G., *Andrologia* **9** (1977) 36.
 [19] D'ALMEIDA, M., BELAISCH, EYQUEM, A., *Soc. de Gynécologie, C. rendus* **6** (1969) 2.
 [20] D'ALMEIDA, M., PALMER, R., EYQUEM, A., *Rev. Suisse Gynéco et Obst.* **2** (1971) 315.
 [21] D'ALMEIDA, M., EYQUEM, A., GUILLON, G., *Masson* **377** (1972).
 [22] EYQUEM, A., D'ALMEIDA, M., 2nd Int. Sympo. on Immun. of Rep. Varna (1971) Acad. Sc. Sofia (1973).
 [23] EYQUEM, A., D'ALMEIDA, M., *Feuillet Biol.* **15** (1974) 67.
 [24] EYQUEM, A., D'ALMEIDA, M., *J. Gyn. Obst. Biol. Rep.* **4** (1975) 165.
 [25] DAVID, G., VOLOCHINE, B., BOSQ, J., 3rd Int. Sympo. on Immun. of Rep. Varna (1975) Acad. Sc. Sofia (1977).