

Influence de la congélation sur le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes normaux à sévèrement altérés

Célia SABBAGH¹, Martine ALBERT¹, François VIALARD^{1,3}, Ibrahim HAMMOUD¹,
Marianne BERGERE¹, Vincent DELABROYE¹, Denise MOLINA-GOMES¹,
Marc BAILLY², Raoul LOMBROSO², Jacqueline SELVA^{1,3}

¹ Service de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique

² Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint Germain en Laye

³ Unité INSERM U407, Faculté de Médecine Lyon Sud

RESUME

La cryoconservation de spermatozoïdes est une technique couramment utilisée en AMP, en particulier dans les cas d'oligospermie sévère, dans la crainte d'une aggravation ultérieure. L'objectif de notre étude a été de rechercher un effet délétère éventuel du processus de migration-congélation-décongélation sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes évaluée par la technique TUNEL.

L'étude a porté sur 72 patients répartis en 4 groupes selon leurs caractéristiques spermatiques : groupe 1 [n=20] (paramètres «normaux» selon l'OMS), groupe 2 [n=24] (numération spermatique normale associée à une asthénie et/ou une tératospermie), groupe 3 [n=16] (numération totale comprise entre 5 et 20 millions), groupe 4 [n=12] (numération totale inférieure à 5 millions). Une évaluation des paramètres spermatiques conventionnels et de la fragmentation de l'ADN (technique TUNEL) a été réalisée sur le sperme entier (non migré non congelé) et sur le sperme décongelé. Une évaluation des taux de fragmentation a également été réalisée sur la fraction migrée avant congélation pour 20 patients (10 du groupe 1 et 10 du groupe 2) ; cette analyse n'a pas pu être effectuée sur les prélèvements oligospermiques (groupes 3 et 4).

Après l'ensemble du processus de migration, congélation et décongélation du sperme, le taux de fragmentation diminue dans la population témoin (groupe 1), alors qu'il augmente significativement dans les groupes de patients présentant des paramètres spermatiques altérés

(groupes 2, 3 et 4). En examinant l'étape intermédiaire, la migration diminue les taux de fragmentation dans les 2 groupes étudiés par rapport au sperme entier.

Donc le taux de fragmentation diminue après migration, puis s'élève après congélation-décongélation à un taux inférieur à celui du sperme entier dans la population témoin, alors qu'il remonte à un taux plus élevé lorsque le sperme est altéré. Cependant, cet effet délétère de la congélation sur les spermatozoïdes altérés reste modéré.

En conclusion, ces résultats sont plutôt en faveur de l'autoconservation de sperme pour les patients oligospermiques sévères.

Mots clés : cryoconservation de sperme, oligospermie sévère, fragmentation de l'ADN, TUNEL, migration spermatique, ICSI

Correspondance :

Dr Martine ALBERT - Service de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique, Centre Hospitalier Poissy-St Germain en Laye, 10 rue du Champ Gaillard, BP 3082, 78303 Poissy Cedex, France - Tel 01.39.27.53.18 - Fax 01.39.27.44.25 - Email martine_albert@hotmail.com

I. INTRODUCTION

La cryoconservation de sperme est un acte de préservation du pouvoir fécondant dont les indications sont multiples.

Une première indication est l'autoconservation du sperme dans le but de préserver la fertilité des patients, quand celle-ci risque d'être compromise par le traitement médical ou chirurgical d'une maladie ou par la maladie elle-même [3]. La deuxième indication de la cryoconservation de sperme s'inscrit dans un cadre légal. En effet, pour le don de sperme [3], la loi requiert dans un souci de sécurité sanitaire et d'anonymat, que le sperme du donneur soit congelé et placé en quarantaine pendant 6 mois. En ce qui concerne le don d'ovocytes, il est également habituel d'effectuer une cryoconservation du sperme du conjoint, ce qui facilite l'anonymat entre la donneuse et le couple receveur. Enfin, la congélation de sperme est également indiquée dans le cadre de la prise en charge en AMP des couples « à risque viral », lorsque le conjoint est séropositif pour le VIH et/ou le VHC.

Une dernière indication de la congélation de sperme concerne la conservation de gamètes d'obtention difficile. Il peut tout d'abord s'agir d'un problème éjaculatoire : difficultés de recueil, anéjaculation d'origine neurologique ou psychogène (pour laquelle peut être pratiqué un recueil assisté [3, 36]). Les spermatozoïdes retrouvés lors d'exploration chirurgicale épидidymaire [38, 50] ou testiculaire [31, 40, 49] sont congelés dans un certain nombre d'équipes pour éviter les interventions chirurgicales testiculaires répétées. Cependant, cette attitude reste discutée [49]. Enfin, dans le cas des oligospermies sévères et des cryptozoospermies, une autoconservation peut être indiquée dans la crainte d'une altération des paramètres spermatiques avec le temps et pour éviter les stimulations ovariennes inutiles.

Dans certains centres d'AMP, une autoconservation de sperme est systématiquement proposée aux patients oligospermiques sévères et cryptozoospermiques. Il est légitime de se demander si cette attitude est justifiée en essayant d'évaluer le rapport entre le bénéfice apporté par la constitution de ces paillettes « de secours » utilisables le jour de la tentative d'AMP en cas d'absence de spermatozoïdes et le risque de l'effet potentiellement délétère de la congélation sur ces spermatozoïdes déjà sévèrement altérés initialement.

La cryoconservation est connue pour causer en effet un certain nombre de dommages physiques et chimiques sur le sperme [27, 75], qui engendrent un certain nombre d'altérations spermatiques telles que la perte de mobilité [46], l'atteinte de l'intégrité de l'acrosome et de la

membrane plasmique [6, 19, 32, 46, 51], les dommages mitochondriaux [35, 56] ainsi que nucléaires [12, 14, 15, 17, 18, 30, 37, 53, 57, 65]. Certains des effets de la congélation sur le sperme sont bien connus (effet sur la mobilité, sur la vitalité) mais d'autres, tels que l'intégrité nucléaire, ont été moins explorés, surtout dans le cas de prélèvements oligospermiques sévères. Or cette question de l'influence de la cryoconservation sur le noyau spermatique est importante. En effet, si l'ICSI permet de s'affranchir des problèmes posés par la perte de la mobilité, de l'intégrité de l'acrosome ou de la membrane plasmique, il n'en est pas de même de ceux engendrés par les dommages nucléaires. Ainsi, même si le développement de l'embryon s'effectue les deux ou trois premiers jours sous la dépendance des ARN maternels, le génome spermatique est mis en jeu à partir du troisième jour et contribue bien sûr à la qualité du développement embryonnaire. On peut alors se demander si une altération nucléaire induite par la congélation ne compromettrait pas les chances d'implantation et de développement de l'embryon dans la muqueuse utérine.

But de l'étude

La question que nous nous sommes posée dans ce travail a été la suivante : la cryoconservation de spermatozoïdes de patients oligospermiques sévères et cryptozoospermiques est-elle délétère pour les spermatozoïdes présentant des paramètres spermatiques initialement déjà sévèrement perturbés ? Nous avons choisi d'évaluer le dommage de l'ADN causé par la cryoconservation par le test de fragmentation de l'ADN (technique TUNEL sur lame).

Après une première étape de mise au point de la technique existante afin qu'elle soit adaptée aux prélèvements oligospermiques sévères et applicable en routine, nous avons réalisé la congélation de 72 prélèvements de patients (patients témoins et patients présentant des altérations spermatiques plus ou moins sévères) pour lesquels nous avons évalué la fragmentation de l'ADN sur le sperme entier et après migration-congélation-décongélation. Cette étude visait ainsi à évaluer l'innocuité de la pratique de l'autoconservation dans le cas des oligospermies sévères, voire à modifier cette pratique si besoin.

II. PATIENTS ET METHODES

1. Patients

Les patients étudiés faisaient partie des couples pris en charge pour infertilité dans le centre d'AMP de Poissy-St Germain-en-Laye.

Nous avons distingué 4 populations :

- groupe 1 (n= 20) : patients dits «témoins selon la classification OMS» répondant aux critères suivants: concentration spermatique > 20M/mL ou numération totale > 40M/éjaculât ; mobilité progressive totale (a+b*) > 50% ou progressive rapide (a*) > 25% ; proportion de formes typiques > 15% (selon la classification stricte de Kruger).
- groupe 2 (n=24) : «patients présentant une numération spermatique normale avec d'autres anomalies spermatiques» : concentration spermatique > 20M/mL ou numération totale > 40M/éjaculât, associée à une asthénospermie et/ou une tératospermie.
- groupe 3 (n=16) : «patients oligospermiques modérés**» présentant une numération spermatique totale comprise entre 5 et 20 M/éjaculât, quelles que soient les valeurs des autres paramètres.
- groupe 4 (n=12) : «patients oligospermiques sévères**» présentant une numération spermatique totale inférieure à 5M/ éjaculât.

Ces patients présentaient tous une spermoculture et des sérologies (VIH, VHC, VHB, syphilis) négatives de moins d'un an. De plus, ils avaient été informés de l'analyse au cours d'un entretien et avaient donné leur consentement pour l'étude.

2. Traitement du sperme entier

Les différentes étapes du traitement des prélèvements de sperme sont résumées dans la **Figure 1**.

Après prélèvement au laboratoire (après un délai d'abstinence compris entre 3 et 7 jours) et liquéfaction du sperme (30 minutes à 1 heure à 37°C), la première étape a consisté à déterminer des caractéristiques spermatiques sur le sperme entier avant migration : volume, pH, numération (des spermatozoïdes et des cellules ; évaluation par une méthode hémoctométrique), mobilité (évaluée entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase, GT X400), vitalité (test à l'éosine-nigrosine) et réalisation de frottis qui ont été ultérieurement colorés (hématoxyline-Schorr) pour le spermocytogramme. La morphologie a été évaluée par une méthode de classification basée sur des critères stricts (Kruger), le seuil de la normale étant de 15%.

Une partie de l'éjaculât a été réservée à l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique sur sperme «entier» (cf. 5.).

Le reste du prélèvement a été mis à migrer à travers un gradient de densité PureSperm (Nidacon) bicouche (45 et 90%) 20 minutes à 90 g. Au terme de cette

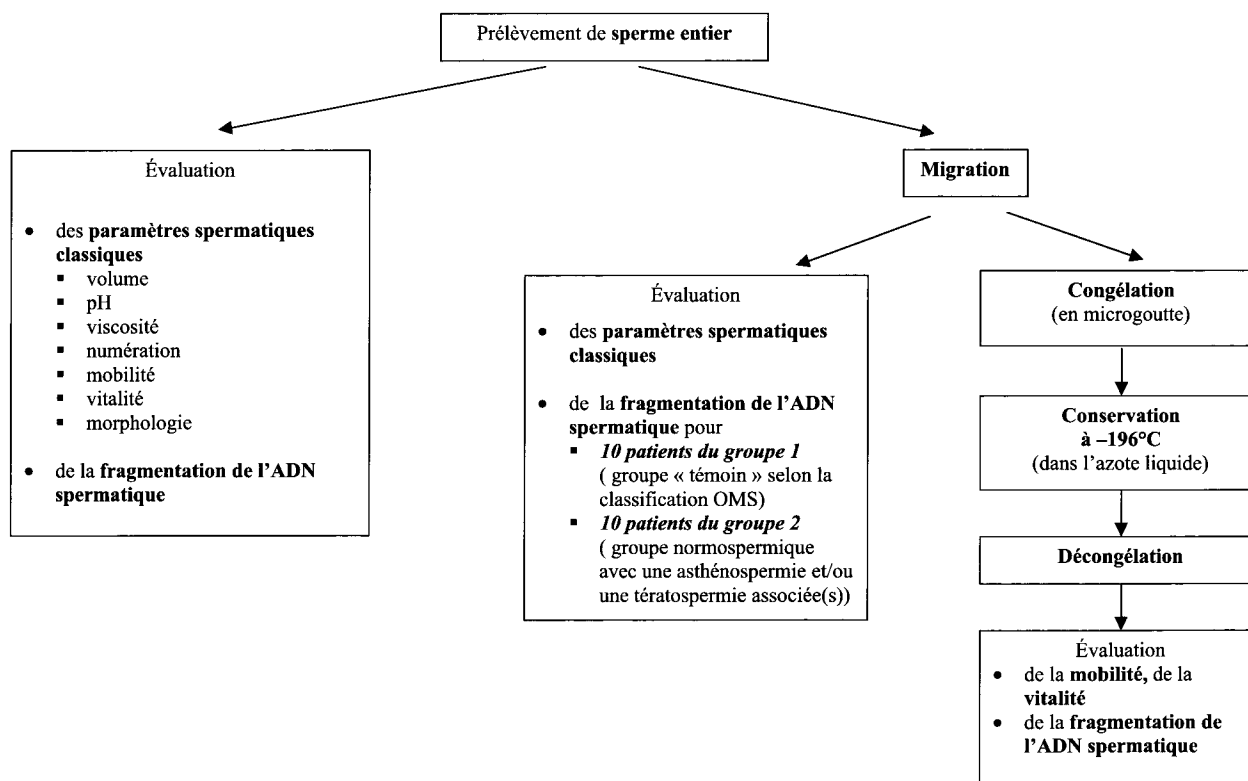


Figure 1 : Résumé des différentes étapes du traitement des prélèvements de sperme.

migration, le culot récupéré dans la fraction 90% a été lavé dans 2 mL de milieu (IVF, Medicult) et centrifugé 10 minutes à 125 g. Le culot a alors été repris dans 0,2 à 0,5 mL de milieu et les paramètres spermatiques ont été évalués sur la fraction migrée.

La fragmentation de l'ADN a été analysée sur une partie de la fraction migrée de 20 patients (10 du groupe 1 et 10 du groupe 2) et le reste a été congelé. Pour tous les autres, et notamment les prélèvements oligospermiques, nous avons gardé toute la fraction migrée pour la congélation et l'étude de la fragmentation de l'ADN après décongélation.

3. Congélation de la fraction migrée

La congélation de sperme en vue d'autoconservation est systématiquement réalisée dans des paillettes « haute sécurité » (ayant une contenance de 300 µL, CryoBioSystem), en microgouttes (40 à 100 µL) [29] et est effectuée sur la fraction migrée du sperme.

On ajoute à la fraction migrée le milieu de congélation (Spermfreeze) volume à volume, goutte à goutte (en mélangeant par agitation entre chaque goutte). Après 10 minutes, la paillette est alors « montée » en réalisant l'aspiration à l'aide d'un micropipeteur, selon la **Figure 2**.

La paillette est identifiée puis soudée. La congélation est réalisée dans un appareil «Minicool 40 PC» (Air Liquide), une fois celui-ci stabilisé à 20°C. La cinétique de congélation est la suivante :

-5°C/min de +20°C à -8°C ; -10°C/min de -8°C à -25°C; -25°C/min de -25°C à -140°C.

A la fin de la congélation, la paillette est plongée dans l'azote liquide à -196°C puis stockée dans une cuve spécialement réservée aux autoconservations de sperme.

4. Décongélation des paillettes

Après la sortie de la paillette de l'azote liquide, elle est maintenue à température ambiante pendant 10 minutes. Le contenu de la paillette est vidé dans un microtube conique «Eppendorf» de 1,5 mL et 400 µL de milieu (IVF)

sont ajoutés goutte à goutte. La mobilité et la vitalité du prélèvement décongelé sont alors évaluées. Après ajout d'1 mL d'eau, la suspension est centrifugée 10 minutes à 125 g et on en récupère le culot. Cette étape permet de diluer puis de «retirer» le milieu de congélation (pouvant interférer dans l'analyse de la fragmentation) et de rendre le plus possible aux spermatozoïdes leur fonctionnalité. Le culot est alors traité pour l'analyse de la fragmentation selon le protocole décrit ci-après.

5. Mise au point technique de l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique pour les prélèvements oligospermiques (modérés à sévères)

a) Technique «classique» utilisée pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique

La technique habituellement utilisée dans le laboratoire était la technique TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling*) qui comportait plusieurs étapes dans lesquelles l'échantillon était traité presque essentiellement sous forme de suspension.

Après extraction du liquide séminal, un traitement des spermatozoïdes par une solution de trypsine était réalisé, trypsine utilisée à une concentration adéquate (solution pure un molaire) à la perméabilisation de la membrane spermatique. Un traitement par une solution hypotonique de KCL (0,075 molaire) suivait, ayant pour but de créer un choc cellulaire. Une fois les spermatozoïdes étalés sur lame, l'étape d'hybridation avec la solution de réaction (contenant l'enzyme TdT [*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*] et les nucléotides dUTP [*DeoxyUridine TriPhosphate*] marqués) avait lieu, suivie d'une contre-coloration au DAPI (4', 6-diamino-2- phényl indole). La lecture s'effectuait au microscope à fluorescence Olympus BX60 équipé d'une lampe à fluorescence et de filtres DAPI et FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate). Elle était réalisée sur au moins 400 spermatozoïdes par lame (500 pour la majorité des cas à l'exception d'un seul correspondant à la détermination du taux de fragmentation de l'ADN spermatique d'une paillette contenant un très faible nombre de spermatozoïdes, pour laquelle la lecture n'a pu être réalisée que sur seulement 400 spermatozoïdes).

spermfreeze		spermatozoides+spermfreeze		spermfreeze	"coton"
	air	40 à 100µL (au total)	air	40 µL	

Figure 2 : Figure représentant une paillette dans laquelle est monté le prélèvement spermatique.

Les spermatozoïdes dont l'ADN était intact étaient colorés en bleu par le DAPI, la fluorescence bleue provenant de la liaison du DAPI aux triplets A-T de l'ADN. Les spermatozoïdes dont l'ADN était dégradé présentaient une fluorescence bleue très amoindrie, du fait de la dissociation de la structure de l'ADN et donc partiellement des triplets A-T [20, 39, 47, 64]. On distinguait donc les spermatozoïdes à ADN intact colorés en bleu par le DAPI (DAPI+) des spermatozoïdes à ADN dégradé, présentant une coloration au DAPI très atténuée (DAPI-). Lors de l'analyse au filtre FITC, les spermatozoïdes ayant un noyau fragmenté présentaient une fluorescence verte intense, homogène et complète alors que ceux n'ayant pas un noyau fragmenté ne présentaient pas de fluorescence.

Le taux de fragmentation était évalué en considérant les spermatozoïdes DAPI+ et en effectuant le rapport entre le nombre de spermatozoïdes présentant un noyau avec une fluorescence verte au filtre FITC (FITC+ DAPI+) et le nombre total de spermatozoïdes DAPI+. Les spermatozoïdes dont le noyau présentait une fluorescence verte au filtre FITC faible, inhomogène et/ou partielle n'étaient pas considérés positifs.

b) Différents protocoles établis pour adapter la technique aux prélèvements oligospermiques

La technique « classique » habituellement utilisée dans le laboratoire comportait plusieurs étapes de centrifugation entraînant la perte du matériel spermatique et ne permettait donc pas de concentrer suffisamment les spermatozoïdes, rendant l'analyse longue et délicate en cas d'oligospermie sévère. Plusieurs protocoles ont été expérimentés, comportant les étapes énoncées précédemment (5, a) mais dans un ordre parfois variable et à l'aide de réactifs et de consommables variés.

Afin de limiter au maximum la perte spermatique, l'idée a consisté à ne plus travailler en suspension, mais à réaliser le plus tôt possible une lame sur laquelle était étalé le culot lavé de spermatozoïdes et ensuite de traiter cette lame avec les différents réactifs [29, 45, 73]. Plusieurs modes opératoires ont été effectués en parallèle, utilisant différents types d'agents perméabilisants de la membrane spermatique (trypsine, Triton, acétone) et différents types de support de traitement des spermatozoïdes (lames « Superfrost », lames à puits, lames pour « Cytospin »). Les avantages et les inconvénients étaient évalués pour chaque protocole.

On retiendra que la méthode avec étalement sur lame permet de limiter la perte des spermatozoïdes (qui sont fixés puis étalés très tôt sur lame). L'agent perméabilisant

de la membrane plasmique spermatique retenu est le Triton X-100 puisque les spermatozoïdes ont une morphologie conservée et qu'une grande partie des cellules germinales et de la lignée blanche (souvent présentes dans les prélèvements oligospermiques et pouvant ainsi gêner la lecture) est éliminée. Le temps d'incubation dans le Triton optimal (évitant les faux positifs et négatifs) est, selon notre étude, 15 minutes. D'autre part, le support de traitement des spermatozoïdes choisi est la lame à puits, qui permet de concentrer très efficacement les spermatozoïdes.

Au total, le protocole retenu final est le suivant :

- préparation du culot de spermatozoïdes (extraction du liquide séminal, 2 lavages) puis fixation du culot;
- étalement des spermatozoïdes sur une lame à puits (2 à 3 μ L, x fois jusqu'à concentration optimale) ;
- bain dans une solution de Triton X-100 à 0,1% dans du citrate à 0,1% 15 minutes ;
- rinçage de la lame dans le PBS ;
- hybridation avec la solution de réaction, contre-coloration au DAPI, lecture.

Ce protocole technique a été appliqué à tous les prélèvements étudiés, tant pour l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique des fractions « sperme entier » que pour celle des fractions « sperme migré » et « après migration-congélation-décongélation ».

Le seuil à partir duquel l'analyse devient réalisable est ainsi de 30 000 spermatozoïdes/éjaculat.

Ce protocole présente l'avantage d'être simple, rapide et il est donc applicable en routine, même pour les spermatozoïdes de numération très basse. Il a ainsi été retenu et appliqué dès lors pour toutes les analyses de fragmentation de l'ADN réalisées dans cette étude, quelles que soient les caractéristiques du prélèvement spermatique, au détriment de l'ancienne méthode (moins simple et plus longue).

6. Analyse statistique

Afin d'établir les coefficients de corrélation, nous avons utilisé le test z de corrélation.

La force d'association entre deux variables était considérée respectivement comme très faible, faible, modérée, ou importante si l'indice de corrélation était inférieur à 0,2, compris entre 0,2 et 0,5, compris entre 0,5 et 0,8 ou compris entre 0,8 et 1.

Pour établir des comparaisons entre les différences potentielles entre les groupes de patients, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney pour

variables indépendantes du fait du faible effectif dans chaque groupe.

Pour déterminer les différences entre les paramètres spermatiques d'un même échantillon avant et après migration-congélation-décongélation, ainsi qu'avant et après migration, nous avons utilisé un test non paramétrique pour variables appariées : le test de Wilcoxon.

Les différences statistiques étaient considérées comme significatives dès lors que la valeur p était strictement inférieure à 0,05 ($p < 0,05$).

Le logiciel utilisé était StatView.

III. RESULTATS

1. Validation de la nouvelle technique de fragmentation mise au point par rapport à la technique « classique »

Le nouveau protocole a été validé par l'analyse en parallèle de 13 prélèvements (7 normospermiques, 6 oligospermiques) selon les 2 techniques (« classique » en suspension et « nouvelle » sur lame) qui montrent des taux de fragmentation de l'ADN (500 spermatozoïdes lus par lame) non significativement différents ($p = 0,889$).

2. Description des paramètres spermatiques du sperme entier

En ce qui concerne les paramètres spermatiques classiques avant traitement, les données sont résumées dans le **Tableau 1**.

Taux de fragmentation de l'ADN spermatique avant traitement

a) Répartition des taux de fragmentation de l'ADN spermatique selon les 4 groupes de patients

Les taux moyens de fragmentation de l'ADN sont représentés dans le **Tableau 2**.

Le taux de fragmentation est significativement plus bas dans le groupe 1 que dans les groupes 3 ($p < 0,05$) et 4 ($p < 0,05$). Les taux de fragmentation ne sont pas significativement différents entre les autres groupes.

b) Estimation de la valeur correspondant au 95^{ème} percentile du taux de fragmentation de l'ADN spermatique dans la population de patients étudiés

La répartition du nombre de patients de notre étude en fonction du taux de fragmentation de l'ADN (**Figure 3**) suit une distribution normale (test de Kolmogorov-Smirnov [$p < 0,05$]). Nous avons étudié l'ensemble de la

population des patients de ce travail et non uniquement de la population témoin, car celle-ci comprenait un effectif de patients trop limité pour pouvoir effectuer un calcul statistique significatif.

Nous avons essayé d'estimer la valeur « critique » du taux de fragmentation pour laquelle 95% des patients de la population (95^{ème} percentile) présentait un taux de fragmentation inférieur à cette valeur (valeur dite du 95^{ème} percentile).

Dans le sperme entier, la valeur médiane des taux de fragmentation de l'ADN obtenus pour l'ensemble des patients étudiés est de 6,5% ; l'écart-type est de 3,8%.

D'après la fonction de répartition de la loi normale, le 95^{ème} percentile correspond à une valeur du taux de fragmentation de l'ADN égal à 13% (médiane + 1,65 écart-type).

c) Corrélation entre les taux de fragmentation de l'ADN du sperme entier et les différents paramètres spermatiques initiaux

Il existe une corrélation négative significative entre le taux de fragmentation de l'ADN et les différents paramètres spermatiques initiaux, numération spermatique (indice de corrélation $r = -0,256$; $p = 0,0306$), mobilité progressive ($r = -0,407$; $p = 0,0004$), pourcentage de formes typiques ($r = -0,339$; $p = 0,0037$) et vitalité ($r = -0,372$; $p = 0,0045$).

3. Influence du processus complet de migration-congélation-décongélation sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique

a) Description des taux de fragmentation de l'ADN spermatique après migration-congélation-décongélation

L'effet du processus global de migration-congélation-décongélation sur les taux de fragmentation est représenté dans le **Tableau 3**.

Cet effet est différent pour le groupe témoin (groupe 1) où le taux moyen de fragmentation diminue après migration-congélation-décongélation comparé aux groupes de patients présentant des caractéristiques spermatiques altérées (groupes 2, 3 et 4) pour lesquels on constate une augmentation de ce taux après migration-congélation-décongélation.

b) Corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN du sperme migré-congelé-décongelé et les différents paramètres spermatiques initiaux

Il existe une corrélation négative significative entre le taux de fragmentation de l'ADN après décongélation et les différents paramètres spermatiques initiaux,

Tableau 1 : Paramètres spermatiques des 4 groupes de patients étudiés.

Groupes de patients	Groupe 1 (n=20)	Groupe 2 (n=24)	Groupe 3 (n=16)	Groupe 4 (n=12)
Numération totale (M/éj)	246 ± 143 (72- 558)	150 ± 104 (33- 430)	14 ± 5,5 (5,7- 20)	2,2 ± 1,3 (0,1- 4,1)
Mobilité progressive "a+b" (%)	52 ± 8 (40-70)	32 ± 13 (10- 60)	28 ± 11 (12- 50)	26 ± 19 (2-70)
Formes typiques (%)	34 ± 12 (16- 51)	14 ± 9 (4- 31)	8 ± 6 (2-21)	7 ± 8 (0- 24)
Vitalité (%)	78 ± 9 (62- 98)	69 ± 13 (37- 87)	66 ± 14 (40- 85)	56 ± 11 (33- 72)

Valeurs moyennes + écart-type et valeurs extrêmes entre ().

Groupe1 : groupe témoin ; groupe 2 : numération normale, asthéo et/ou tératospermie ; groupe 3 : oligospermie modérée (5 à 20M/éjaculat) ; groupe 4 : oligospermie sévère (<5M/éjaculat).

Tableau 2 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique dans les 4 groupes de patients.

Groupes de patients	Groupe 1 (n=20)	Groupe 2 (n=24)	Groupe 3 (n=16)	Groupe 4 (n=12)
Taux de fragmentation de l'ADN (%)	5,1 ± 2,5 (1,6-10,4)	6,8 ± 4,2 (0,9-19,2)	7,6 ± 3,5 (1,8-13,1)	8,7 ± 4,5 (2,4-15,6)

Valeurs moyennes + écart-type et valeurs extrêmes entre ().

Groupe1 : groupe témoin ; groupe 2 : numération normale, asthéo et/ou tératospermie ; groupe 3 : oligospermie modérée (5 à 20M/éjaculat) ; groupe 4 : oligospermie sévère (<5M/éjaculat).

Tableau 3 : Effet du processus de migration-congélation-décongélation sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique.

Groupes de patients	Groupe 1 (n=20)	Groupe 2 (n=24)	Groupe 3 (n=16)	Groupe 4 (n=12)
Taux de fragmentation de l'ADN du sperme entier (%)	5,1 ± 2,5 (1,6-10,4)	6,8 ± 4,2 (0,9-19,2)	7,6 ± 3,5 (1,8-13,1)	8,7 ± 4,5 (2,4-15,6)
Taux de fragmentation de l'ADN du sperme après migration-congélation-décongélation (%)	2,9 ± 1,4 (0,6-6,3)	10,5 ± 4,7 (3,2-21,8)	10,7 ± 5,4 (2,3-20,8)	15,2 ± 6 (6,5-25,6)
p (sperme entier vs sperme migré-congelé-décongelé)	<0,0001	<0,0001	<0,05	<0,005

Valeurs moyennes + écart-type et valeurs extrêmes entre ().

Groupe1 : groupe témoin ; groupe 2 : numération normale, asthéo et/ou tératospermie ; groupe 3 : oligospermie modérée (5 à 20M/éjaculat) ; groupe 4 : oligospermie sévère (<5M/éjaculat).

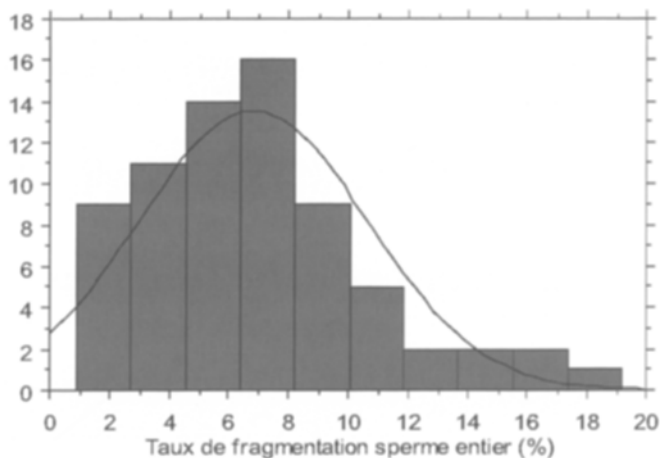


Figure 3 : Répartition du nombre de patients de l'étude en fonction de leur taux de fragmentation de l'ADN spermatique.

numération spermatique (indice de corrélation $r = -0,447$; $p < 0,0001$), mobilité progressive ($r = -0,571$; $p < 0,0001$), pourcentage de formes typiques ($r = -0,543$; $p < 0,0001$) et vitalité ($r = -0,471$; $p = 0,0002$).

Il semblerait donc exister une influence des paramètres spermatiques initiaux sur l'évolution du taux de fragmentation de l'ADN avant et après congélation.

4. Effet de la migration seule sur les paramètres spermatiques

Les résultats précédents concernaient l'effet global du processus de migration, congélation, décongélation sur les paramètres spermatiques. Nous avons étudié l'effet de la migration en elle-même sur le taux de

Tableau 4 : Effet de la migration sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique.

Groupes de patients	Groupe 1 (n=10)	Groupe 2 (n=10)
Taux de fragmentation de l'ADN dans le sperme entier (%)	4,7 ± 2,1 (2-7,9)	5,4 ± 3,1 (0,9-10,7)
Taux de fragmentation de l'ADN après migration (%)	1,9 ± 1,1 (0-3,5)	2,5 ± 1,4 (0,8-5,6)
Taux de fragmentation de l'ADN après migration-congélation-décongélation (%)	3,2 ± 1,6 (0,6-6,3)	9,5 ± 3,6 (3,9-14,4)
p (sperme entier vs sperme migré)	<0,05	<0,05
p (sperme migré vs sperme migré-congelé-décongelé)	<0,05	<0,05

Valeurs moyennes + écart-type et valeurs extrêmes entre ().
Groupe 1 : groupe témoin ; groupe 2 : numération normale, asthénospermie et/ou tératospermie.

fragmentation de 10 patients du groupe 1 et 10 du groupe 2 (**Tableau 4**).

Dans cette étude, la migration favorise la sélection des spermatozoïdes non fragmentés et donc diminue le taux de fragmentation observé par rapport à celui du sperme entier chez tous les patients à numération normale. Après décongélation, le taux de fragmentation remonte, mais beaucoup plus dans le groupe 2 que dans le groupe 1 ($p < 0,05$), de telle sorte qu'il est supérieur au taux initial dans le groupe 2 alors qu'il est inférieur au taux initial dans le groupe 1.

IV. DISCUSSION

1. La technique de fragmentation de l'ADN spermatique : intérêt, limites, corrélation aux paramètres spermatiques initiaux

a) Choix de la méthode utilisée pour l'évaluation des dommages nucléaires spermatiques causés par la cryoconservation

Différents tests sont disponibles pour étudier l'intégrité de l'ADN spermatique. Ces tests peuvent mettre en évidence une anomalie de structure de la chromatine, ou l'existence d'une fragmentation de l'ADN (caractérisée par la présence de cassures simple ou double brin de l'ADN) signe d'apoptose.

Plusieurs colorants permettent d'évaluer des défauts de condensation de la chromatine : le Feulgen [57, 58], la chromomycine A3 [30, 60, 70], le bleu d'aniline [4, 30, 31] ou le bleu de toluidine. D'autres tests tentent d'établir une relation entre la structure de la chromatine et sa fonction : test à l'acridine orange [12, 22, 34, 57], test « SCSA » (Sperm Chromatin Structure Assay) [21, 65]. On distingue par ailleurs les tests qui évaluent la fragmentation de l'ADN spermatique : test « COMET » (Single cell gel electrophoresis) [14, 18, 66, 67], test « Nick-translation » [70], test TUNEL.

Le test de fragmentation de l'ADN spermatique que nous avons choisi est la technique « TUNEL », qui quantifie l'incorporation de nucléotides dUTP aux extrémités des cassures simple ou double brin de l'ADN, au microscope à fluorescence ou par un cytomètre de flux. La technique TUNEL *in situ*, c'est-à-dire sur lame lue au microscope à fluorescence [9, 17, 25, 34, 63, 69, 76] est facile à mettre en place dans un laboratoire de routine, ne requiert pas de matériel particulier et est peu coûteuse. De plus, elle permet d'analyser des prélèvements oligospermiques sévères, puisque 300 à 500 spermatozoïdes sont analysés au microscope.

La technique TUNEL couplée au cytomètre de flux permet l'analyse rapide, automatisée et simple d'au

moins 10 000 spermatozoïdes [45, 52, 53, 61, 68]. Il est possible de rendre l'analyse plus spécifique en ajoutant un marqueur vital (l'iodure de propidium) pour distinguer apoptose et nécrose. Néanmoins un cytomètre de flux présente un coût important et l'analyse requiert classiquement une concentration spermatique de l'ordre d'un million de spermatozoïdes/mL. Cette technique n'était donc pas applicable dans notre étude.

C'est donc la technique TUNEL *in situ* qui a été choisie ; cependant une mise au point adaptée aux prélèvements oligospermiques a été nécessaire. Le principe a consisté à ne plus traiter l'échantillon sous forme d'une suspension soumise successivement à l'action de plusieurs réactifs (avec entre chaque traitement des centrifugations), mais à étaler le plus tôt possible le culot fixé sur lame puis à traiter la lame par les réactifs [25, 41, 69]. Cette nouvelle méthode, validée par le traitement en parallèle de plusieurs échantillons par l'ancienne et la nouvelle technique, a permis d'analyser des patients oligospermiques sévères (jusqu'à 30 000 spermatozoïdes au total). L'analyse a même pu être réalisée pour une paillette de sperme décongelée contenant une quantité de spermatozoïdes estimée à 400. De plus cette technique est simple, rapide, non coûteuse et ne nécessite pas d'appareillage lourd. Elle peut donc s'inscrire dans la pratique d'un laboratoire classique de biologie de la reproduction.

b) Limites de la technique utilisée : manque de spécificité

La technique TUNEL vise à mesurer l'apoptose ; cependant, la distinction entre apoptose et nécrose est parfois difficile. Il est donc possible que des noyaux issus de spermatozoïdes nécrosés soient considérés comme fragmentés, créant ainsi une erreur par excès dans l'évaluation de l'effet de la congélation sur l'intégrité de l'ADN spermatique. Nous avons effectué en parallèle sur les prélèvements décongelés des tests visant à mesurer le degré de nécrose qui peut interférer dans l'évaluation de la fragmentation de l'ADN.

• Estimation du degré de nécrose au niveau du noyau du spermatozoïde

Le DAPI est un moyen indirect d'estimer la dégénérescence de l'ADN nucléaire et donc d'appréhender la nécrose. En effet, la fluorescence bleue (DAPI+) serait le témoin de l'intégrité de la structure de l'ADN puisqu'elle provient de la liaison du fluorochrome aux doublets A-T de l'ADN. L'absence de fluorescence bleue (DAPI-), signe de l'absence de liaison du fluorochrome aux doublets A-T, ferait état au contraire de la dissociation de structure de l'ADN, et donc de la dégénérescence nucléaire [20, 39, 47, 64]. Nous

avons dénombré deux populations de spermatozoïdes : les spermatozoïdes « DAPI+ FITC- » (structure globale de l'ADN nucléaire intègre, absence de fragmentation de l'ADN) et les spermatozoïdes « DAPI+ FITC+ » (structure globale de l'ADN nucléaire intègre, présence de fragmentation de l'ADN). Une troisième population de spermatozoïdes a été constituée par les spermatozoïdes « DAPI- FITC+ » (structure globale de l'ADN dégradée, dégénérée ; présence de fragmentation nucléaire). Cependant, cette troisième population, quasiment absente dans le sperme entier, s'est révélée rare dans les prélèvements décongelés (0,4 à 2,7%).

• Estimation du degré de nécrose au niveau de la membrane du spermatozoïde

L'altération de l'intégrité de la membrane plasmique de la tête spermatique peut être mise en évidence par le test à l'éosine-nigrosine (qui donne une estimation de la « vitalité »).

La vitalité des spermatozoïdes congelés-décongelés a été évaluée à chaque fois que la numération spermatique le permettait. Cependant la technique « classique » d'évaluation de la vitalité s'est révélée irréalisable pour tous les prélèvements décongelés des patients oligospermiques sévères. Pour essayer néanmoins d'estimer le degré de nécrose dans ces prélèvements, il aurait pu être envisageable de réaliser pour chacun d'eux un test en milieu hypoosmotique (« test HOS »), test qui évalue l'intégrité membranaire du flagelle.

Néanmoins, les données de la littérature montrent la non pertinence de ce test dans l'évaluation des dommages causés par la cryoconservation [11, 32, 44, 74]. Cette incohérence entre le résultat du test HOS et la vitalité estimée par le test à l'éosine-nigrosine peut être due au fait que ces deux tests explorent la conservation de l'intégrité de la membrane plasmique après congélation à deux endroits différents, respectivement le flagelle (test HOS) et la tête (test à l'éosine), qui ne présentent peut-être pas la même sensibilité à la cryoconservation. Il serait peut-être judicieux de procéder à un test combinant les deux techniques, comme l'a exploré l'équipe de Ducci *et al.* chez le lapin (« HE test », test combiné HOS et éosine) [16]. D'une façon générale, les tests membranaires donnent des taux de spermatozoïdes « morts » beaucoup plus élevés que les taux de spermatozoïdes à noyaux fragmentés ; il existe cependant une corrélation entre ces tests.

L'idéal aurait été de coupler à la technique TUNEL, qui explore la phase tardive d'apoptose, une étude des phases plus précoces, par exemple l'externalisation de l'annexine V (« *annexin V binding* »). En effet, un des

premiers signes de l'apoptose est la translocation d'un phospholipide, la phosphatidyl sérine, de la partie interne à la partie externe de la membrane, phospholipide pour lequel l'annexine V possède une grande affinité [28, 73].

c) Corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN et les paramètres spermatiques initiaux

Notre étude confirme l'existence d'une corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN sur sperme entier et les différents paramètres spermatiques initiaux.

Ainsi, il existe une corrélation négative entre le taux de fragmentation de l'ADN du sperme entier et la numération spermatique. La plupart des études publiées montrent en effet que plus la numération spermatique est basse, plus le taux de fragmentation est élevé [21, 52, 63, 65, 76]. Certaines équipes cependant n'aboutissent pourtant pas aux mêmes conclusions [43, 48]. La mobilité est également corrélée de manière inverse avec le taux de fragmentation spermatique dans notre étude, ce qui rejoint les observations des différents travaux effectués [7, 21, 63, 76]. De même, une corrélation positive est observée dans notre travail entre taux de fragmentation de l'ADN et pourcentage d'atypies spermatiques. Ce résultat, cohérent avec les constatations de certaines équipes [7, 63, 65, 76] est cependant contradictoire avec les conclusions d'autres études [43]. Enfin la vitalité est corrélée négativement au taux de fragmentation de l'ADN selon notre étude, ce qui est conforme aux observations retrouvées dans la littérature [63].

Ainsi, un prélèvement spermatique présentant un taux élevé de fragmentation de l'ADN serait associé à des caractéristiques spermatiques altérées. En effet, la présence de fragmentation de l'ADN nucléaire serait le témoin de plusieurs processus pathologiques possibles (défaut dans le remodelage et la compaction de la chromatine, production de radicaux libres de l'oxygène, apoptose lors de la spermatogénèse [59, 62]) et constituerait donc un élément péjoratif en terme de qualité du prélèvement spermatique. Donc un taux de fragmentation de l'ADN élevé, témoin d'un ou de plusieurs processus pathologiques spermatiques, serait associé à d'autres anomalies telles qu'une numération spermatique abaissée, une mobilité diminuée, un nombre d'atypies augmenté et/ou une vitalité amoindrie. Réciproquement, on peut également penser qu'une altération des paramètres spermatiques, tels que par exemple une mobilité diminuée ou une élévation du nombre d'atypies, soient le reflet d'une atteinte de l'intégrité de l'ADN nucléaire spermatique.

2. Effet de la congélation sur le taux de fragmentation

de l'ADN spermatique des différents groupes de patients étudiés.

La première question qui était le point de départ de cette étude était la suivante : la cryoconservation de sperme, systématiquement proposée dans notre centre aux patients oligospermiques sévères et cryptozoospermiques, est-elle délétère pour ces spermatozoïdes présentant des caractéristiques déjà altérées initialement?

a) Effet de la congélation sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des patients du groupe témoin

Concernant l'impact de la congélation sur la qualité de l'ADN spermatique, les différentes études divergent. Il est parfois difficile de comparer ces travaux entre eux car, d'une part la congélation du sperme ne s'effectue pas dans les mêmes conditions (migration préalable à la cryoconservation ou congélation du sperme entier), et d'autre part ils n'utilisent pas tous la même technique d'évaluation de l'intégrité de l'ADN. Donnelly *et al.* [15] ont ainsi montré que l'intégrité de l'ADN spermatique, évaluée par le test « COMET », n'est pas modifiée par la cryoconservation chez les patients fertiles (ce qui n'est pas le cas chez les patients infertiles), rejoignant les observations d'Isachenko *et al.* [37]. Duru *et al.* [17] ainsi que Paasch *et al.* [53] présentent les mêmes conclusions, en utilisant la méthode TUNEL *in situ* [17] ou couplée à la cytométrie de flux [53]. Au contraire, les études évaluant l'influence de la congélation à l'aide du test à l'acridine orange ont rapporté un effet délétère de la cryoconservation sur les spermatozoïdes témoins [12, 65]. De même, les études évaluant l'état de compaction de la chromatine après cryoconservation observent un effet plutôt néfaste de ce procédé sur l'intégrité de l'ADN, que l'évaluation soit faite en utilisant le bleu d'aniline [30] ou le Feulgen [57].

Dans notre étude, le taux de fragmentation de l'ADN du sperme migré-congelé-décongelé était diminué par rapport à celui du sperme entier dans le groupe témoin. Or le sperme subit préalablement à la congélation une migration. Il était donc difficile de distinguer la responsabilité de la sélection par le gradient de densité de celle de la congélation dans l'amélioration de la fragmentation évaluée après l'ensemble du processus. C'est pourquoi, dans un second temps, nous avons déterminé le taux de fragmentation dans les trois situations, sperme entier, après migration ainsi qu'après congélation-décongélation sur des échantillons à numération normale.

Nous avons ainsi montré que la migration améliore la fragmentation de l'ADN spermatique. Il semblerait donc que dans le groupe témoin, la migration préalable à la

congélation favorise la sélection des spermatozoïdes non « fragmentés », abaissant ainsi le taux de fragmentation du migrat, et qu'ensuite la congélation conduise à une augmentation de ce taux mais cependant modérée, de telle sorte que le taux de fragmentation après décongélation se révèle inférieur au taux initial. Ainsi, globalement, le processus de cryoconservation ne paraît pas présenter d'effet délétère sur l'intégrité de l'ADN spermatique des spermés témoins ; de plus la migration préalable pourrait améliorer la résistance du sperme à la congélation, du fait de la sélection de spermatozoïdes les plus mobiles et présentant un taux de fragmentation moindre.

Si on reprend les données de la littérature précédemment citées, on constate que dans toutes les études qui montrent une absence d'influence de la cryoconservation sur l'intégrité de l'ADN [15, 17, 37, 53] le sperme est congelé après avoir subi une migration préalable (à travers un gradient de densité ou par « swim-up »). On citera en particulier le travail de Donnelly *et al.* [15] qui aboutit à des conclusions identiques à nos observations. Dans les travaux qui mettent en évidence un effet délétère de la cryoconservation sur le sperme [12, 30, 57, 65], on remarque que le sperme est congelé sans migration préalable.

Au total, la congélation ne semble pas présenter d'effet délétère notable sur la fragmentation de l'ADN des spermés normaux, observation rassurante car ceux-ci correspondent à la grande majorité des spermés cryoconservés (autoconservation avant traitement stérilisant, don de sperme).

b) Effet de la congélation sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des patients présentant des paramètres spermatiques altérés

Peu d'études s'intéressent à l'influence de la congélation sur l'intégrité de l'ADN des spermés altérés. Il s'agit le plus souvent de patients « infertiles » (comparés à des patients fertiles ou à des donneurs de sperme) mais qui ne présentent pas forcément des perturbations importantes du spermogramme. La majorité de ces études confirme cependant qu'il existe un effet délétère de la cryoconservation sur le sperme de ces patients [14, 15] (technique COMET), [30] (test au bleu d'aniline), effet observé que le sperme ait subi une migration préalable [14, 15] ou non [30]. Seules deux études concluent au contraire à l'innocuité de la cryoconservation sur l'intégrité de l'ADN spermatique ; elles concernent en fait pour l'une, des patients dits « infertiles » (comparés à des patients fertiles) mais présentant une numération normale [17], et pour l'autre des patients « subfertiles » dont les caractéristiques spermatiques ne sont pas explicitement mentionnées

[18].

Notre travail montre que la congélation présente un effet délétère sur la fragmentation de l'ADN lorsque le sperme est altéré, qu'il s'agisse d'une asthénospermie et/ou d'une tératospermie associée(s) à une numération normale (groupe 2), d'une oligospermie modérée (groupe 3) ou sévère (groupe 4). Dans le groupe 2, après migration, le taux de fragmentation diminue par rapport au taux initial, puis s'élève après congélation à un taux supérieur à celui du sperme entier, résultats en accord avec ceux de Donnelly *et al.* [14, 15].

A notre connaissance, il existe une seule étude, récente, dans la littérature évaluant l'influence de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN spermatique de patients oligospermiques sévères [13]. L'équipe observe ainsi une élévation du taux de fragmentation nucléaire (technique TUNEL) après cryoconservation, mais aussi bien dans le groupe de patients normospermiques que dans le groupe de patients oligospermiques. Cependant l'absence de migration préalable à la congélation ne permet pas de comparer ces résultats avec ceux de notre étude.

Notre travail montre un effet délétère de la cryoconservation sur la fragmentation de l'ADN des spermés présentant des numérations très basses : 10,7% (sperme décongelé) *versus* 7,6% (sperme entier) dans le groupe de patients oligospermiques modérés et 15,2% *versus* 8,7% dans le groupe de patients oligospermiques sévères. Cependant, cet effet délétère reste modéré. Notons que seulement un tiers des patients des groupes 3 et 4 (10/28) présente un taux de fragmentation de l'ADN après décongélation supérieur à la valeur correspondant au 95ème percentile (13%).

D'autre part, si on s'intéresse plus particulièrement à l'évolution du pourcentage de fragmentation de l'ADN après cryoconservation des spermatozoïdes des patients oligospermiques sévères (groupe 4), qui correspondent à la population candidate à l'autoconservation de paillettes dites de secours, on constate que la numération spermatique de départ n'est pas prédictive de l'altération de l'intégrité de l'ADN induite par la congélation. Ainsi, pour le patient présentant les paramètres spermatiques les plus sévèrement altérés de notre étude (numération totale à 0,096 M/éjaculat, mobilité progressive à 2%), le taux de fragmentation de l'ADN n'augmente que de 5% après cryoconservation (passant de 15,5 à 20,8%). Singulièrement, le prélèvement spermatique qui semble le plus affecté par le processus de congélation (pour lequel le taux de fragmentation de l'ADN s'élève à 25,6% après décongélation contre 8,7% dans le sperme entier) correspond à un patient présentant les caractéristiques spermatiques les moins sévèrement

perturbées du groupe 4 (numération totale à 3,64 M/éjaculat, mobilité progressive à 22%).

Ainsi, il n'est pas possible de prédire si la cryoconservation sera délétère ou non dans les cas d'altérations les plus sévères des paramètres spermatiques. Néanmoins, seule la poursuite de l'étude sur un plus grand nombre de patients oligospermiques sévères permettrait de confirmer cette hypothèse.

En conclusion, la cryoconservation entraîne des dommages nucléaires sur les spermatozoïdes des patients présentant des caractéristiques spermatiques altérées, cela même si une migration préalable permet la sélection des spermatozoïdes les moins fragmentés. Cependant cet effet reste modéré.

La « résistance » du sperme à la cryoconservation semble être dépendante des caractéristiques spermatiques initiales : plus le patient présente des anomalies au spermogramme, plus ses spermatozoïdes seront sensibles aux dommages nucléaires induits par la cryoconservation, qui ne semblent néanmoins pas si alarmants d'après les résultats de cette étude.

Cependant il faut garder à l'esprit que la technique TUNEL met en évidence des spermatozoïdes apoptotiques, mais seulement à un stade tardif de ce phénomène. Il est probable que les prélèvements cryoconservés contiennent des spermatozoïdes « moribonds », dans la phase précoce du processus apoptotique, non détectés par la technique TUNEL. On pourrait envisager d'améliorer la sensibilité de la technique de détection des spermatozoïdes apoptotiques en couplant l'analyse de fragmentation de l'ADN en technique TUNEL à un autre test de dépistage d'une phase plus précoce de l'apoptose, comme le marquage à l'annexine V.

Un autre point important à souligner est que l'analyse de la fragmentation d'ADN a été réalisée sur l'ensemble de la population spermatique présente, comprenant donc des spermatozoïdes mobiles ou non. Or les spermatozoïdes qui sont utilisés en ICSI sont les spermatozoïdes mobiles, ou vivants au test HOS en cas d'absence totale de mobilité. Il est donc vraisemblable que le taux de fragmentation correspondant aux spermatozoïdes mobiles, ou du moins « HOS + », qui sont injectés en ICSI, est inférieur au taux de fragmentation évalué sur l'ensemble du prélèvement.

3. Intérêt pronostique de l'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique avant et après cryoconservation dans la prise en charge des patients en AMP

La deuxième question qui se posait était la suivante: fait-on perdre des chances aux couples en ICSI en utilisant

de tels spermatozoïdes cryoconservés ?

Il est plus difficile de répondre avec certitude à cette interrogation, à laquelle nous ne pouvons apporter que quelques éléments de réponse. Il n'est pas clairement établi qu'une élévation modérée des taux de fragmentation de l'ADN compromette nécessairement l'issue des ICSI. Cette question reste encore très débattue [1, 7, 9, 26, 60, 62, 68, 69].

Peu de travaux ont étudié l'impact de l'utilisation de spermatozoïdes éjaculés puis cryoconservés dans le cadre d'une oligospermie sévère sur l'issue des tentatives d'ICSI effectuées dans un tel contexte. On peut néanmoins se baser sur l'expérience des tentatives d'ICSI réalisées avec des spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires cryoconservés. Les travaux de Friedler [24, 23], Palermo [54], Ben Yosef [8], Ron-El [50], Cayan [10] et Tournaye [71] montrent ainsi que la congélation ne présente pas d'effet néfaste en terme de fécondation, clivage, grossesse évolutive par rapport aux ICSI réalisées avec des spermatozoïdes « frais ». Deux études assez récentes confirment que la cryoconservation de spermatozoïdes épидидymaires et testiculaires ne semble pas faire perdre de chances aux couples bénéficiant d'une telle prise en charge [33, 72].

Peu de données ont été publiées sur l'influence de la congélation sur les résultats des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes cryoconservés chez des patients oligospermiques sévères. L'équipe de Lahav-Baratz [42] montre que les ICSI réalisées avec le sperme préalablement cryoconservé donnent des résultats comparables en terme de taux de fécondation, de grossesse clinique et d'implantation à ceux des ICSI pratiquées à l'aide de spermatozoïdes « frais » retrouvés le jour de la tentative. Les résultats d'une étude multicentrique menée auprès de 6 centres d'AMP au sujet de la prise en charge des cryptozoospermies et des oligospermies extrêmes [2, 5] montrent que sur les 9 tentatives d'ICSI (sur 235 étudiées au total) réalisées avec des spermatozoïdes cryoconservés issus de « paillettes de secours », une grossesse a abouti à la naissance d'un enfant bien portant. Cependant le faible effectif de tentatives réalisées avec des spermatozoïdes congelés dans cette série ne nous permet pas d'en tirer des conclusions.

Il est donc difficile de préciser si l'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN induite par la cryoconservation compromet l'issue des ICSI réalisées avec ces spermatozoïdes très pathologiques.

Au total, tous ces éléments sont plutôt en faveur de la pratique de l'autoconservation de sperme chez les

patients oligospermiques sévères, pour lesquels la constitution de ces paillettes « de secours » présentent un bénéfice certain, puisque dans un pourcentage non négligeable de cas, elles peuvent être utilisées le jour de la tentative pour pallier l'azoospermie transitoire auquel le patient peut être confronté le jour de l'ICSI.

Enfin, il faut souligner l'intérêt psychologique important de la constitution de ces paillettes, qui permettent de rassurer les patients, moins stressés à l'idée du risque et des conséquences d'une azoospermie le jour de la tentative. Le prélèvement de sperme effectué dans un tel contexte psychologique le jour de l'ICSI pourrait ainsi même s'en trouver amélioré.

Notes

* « a » : spermatozoïdes mobiles progressifs rapides
« b » : spermatozoïdes mobiles progressifs « lents »

** la dichotomie entre les 2 derniers groupes de patients oligospermiques repose sur un seuil « critique » de numération totale spermatique fixé dans cette étude à 5 millions de spermatozoïdes/éjaculat.

REFERENCES

1. AGARWALA., ALLAMANENI S.S. : The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.*, 2004, 56 : 235-245.
2. ALBERT M.: Prise en charge des cryptozoospermies et des oligospermies sévères 3. Modalités techniques de récupération et de congélation des spermatozoïdes. *Andrologie*, 2005, 15: 223-226.
3. ANGER J.T., GILBERT B.R., GOLDSTEIN M. : Cryopreservation of sperm : Indications, methods and results. *J. Urol.*, 2003, 170 : 1079-1084.
4. AUGER J., MESBAH M., HUBER C. et al. : Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.*, 1990, 13 : 452-462.
5. BAILLY M. : Prise en charge des cryptozoospermies et des oligospermies sévères 4. Résultats des ICSI pratiquées dans les cryptozoospermies. *Andrologie*, 2005, 15 : 227-230.
6. BARTHELEMY C., ROYERE D., HAMMAHAH S. et al. : Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch. Androl.*, 1990, 25 : 29-40.
7. BENCHAIB M., BRAUN V., LORNAGE J. et al. : Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.*, 2003, 18 : 1023-1028.
8. BEN-YOSEF D., YOGEV L., HAUSER R. et al. : Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1794-1801.
9. CARRELL D.T., LIU L., PETERSON C.M. et al. : Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.*, 2003, 49 : 49-55.
10. CAYAN S., LEE D., CONAGHAN J. et al. : A comparison of icsi outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 495-499.
11. CHAN S.Y., PEARLSTONE A., UHLER M. et al. : Human spermatozoal tail hypo-osmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline, and survival of spermatozoa after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 1993, 8 : 717-721.
12. CHOHAN K.R., GRIFFIN J.T., CARRELL D.T. : Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, 2004, 36 : 321-326.
13. DE PAULA T.S., BERTOLLA R.P., SPAINE D.M. et al. : Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, 2006, 86 : 597-600.
14. DONNELLY E.T., MCCLURE N., LEWIS S.E. : Cryopreservation of human semen and prepared sperm : Effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril.*, 2001, 76 : 892-900.
15. DONNELLY E.T., STEELE E.K., MCCLURE N. et al. : Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1191-1199.
16. DUCCI M., GAZZANO A., VILLANI C. et al. : Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, 102 : 53-56.
17. DURU N.K., MORSHEDI M.S., SCHUFFNER A. et al. : Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J. Androl.*, 2001, 22 : 646-651.
18. DUTY S.M., SINGH N.P., RYAN L. et al. : Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 1274-1280.
19. ESCALIER D.P., BISSON J.P. : Quantitative ultrastructural modifications in human spermatozoa after freezing. In : David G., Price W.S. eds. *Human artificial insemination and semen preservation*. New York, Plenum Press, 1980 : 107-122.
20. EVENSON D., DARZYNKIEWICZ Z., JOST L. et al. : Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry*, 1986, 7 : 45-53.
21. EVENSON D.P., JOST L.K., MARSHALL D. et al. : Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1039-1049.
22. EVENSON D.P., LARSON K.L., and JOST L.K. : Sperm chromatin structure assay : Its clinical use for detecting sperm

- DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 2002, 23 : 25-43.
23. FRIEDLER S., RAZIELA., SOFFER Y. et al. : Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia—a comparative study. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 892-897.
 24. FRIEDLER S., RAZIEL A., SOFFER Y. et al. : The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia—a comparative study. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 1872-1877.
 25. GANDINI L., LOMBARDO F., PAOLI D. et al. : Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 830-839.
 26. GANDINI L., LOMBARDO F., PAOLI D. et al. : Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 1409-1417.
 27. GAO D.Y., LIU J., LIU C. et al. : Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 1109-1122.
 28. GLANDER H.J., SCHALLER J. : Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa : A rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 109-115.
 29. GUTHAUSER B., BAILLY M., ALBERT M. et al. : Peut-on optimiser la congélation des spermatozoïdes testiculaires ? L'expérience du Centre Hospitalier de Poissy Saint-Germain. *Andrologie*, 2002, 12 : 342-346.
 30. HAMMADEH M.E., ASKARIA S., GEORG T. et al. : Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int. J. Androl.*, 1999, 22 : 155-162.
 31. HAMMADEH M.E., STIEBER M., HAIDL G. et al. : Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*, 1998, 30 : 29-35.
 32. HAUSER R., YAVETZ H., PAZ G. F. et al. : The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (host) for fresh and cryopreserved sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1992, 9 : 265-270.
 33. HAUSER R., YOGEV L., AMIT A. et al. : Severe hypospermatogenesis in cases of nonobstructive azoospermia: Should we use fresh or frozen testicular spermatozoa ? *J. Androl.*, 2005, 26 : 772-778.
 34. HENKEL R., HAJIMOHAMMAD M., STALF T. et al. : Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil. Steril.*, 2004, 81 : 965-972.
 35. HENRY M.A., NOILES E.E., GAO D. et al. : Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil. Steril.*, 1993, 60 : 911-918.
 36. HOVAV Y., YAFFE H., ZENTNER B., et al. : The use of ICSI with fresh and cryopreserved electroejaculates from psychogenic anejaculatory men. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 390-392.
 37. ISACHENKO E., ISACHENKO V., KATKOV I.I. et al. : DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 932-939.
 38. JANZEN N., GOLDSTEIN M., SCHLEGEL P.N. et al. : Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with ivf and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 696-701.
 39. KESSEL A., YEHUDAI D., PERI R. et al. : Increased susceptibility of cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, 145 : 563-570.
 40. KUPKER W., SCHLEGEL P.N., AL-HASANI S. et al : Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2000, 73 : 453-458.
 41. LACHAUD C., TESARIK J., CANADAS M.L. et al. : Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 607-610.
 42. LAHAV-BARATZ S., ROTHSCCHILD E., GRACH B. et al. : The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 157-160.
 43. LARSON K.L., DEJONGE C.J., BARNES A.M. et al. : Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1717-1722.
 44. LIN M.H., MORSHEDI M., SRISOMBUT C. et al. : Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm : An investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-y staining. *Fertil. Steril.*, 1998, 70 : 1148-1155.
 45. MARCHETTI C., OBERT G., DEFFOZEZ A. et al. : Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 1257-1265.
 46. MCLAUGHLIN E.A., FORD W.C. HULL M.G. : Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, 95 : 527-534.
 47. MINJIE X., WEI W., ZHOU Z. et al. : Capillary electrophoresis analysis of hydrogen peroxide induced apoptosis in PC12 cells. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 39 : 853-860.
 48. MURATORI M., PIOMBONI P., BALDI E. et al. : Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.*, 2000, 21 : 903-912.
 49. NICOPOULLOS J.D., GILLING-SMITH C., ALMEIDA P.A. et al. : Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men : A meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 2004, 82 : 691-701.
 50. OATES R.D., LOBEL S.M., HARRIS D.H. et al. : Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 133-138.
 51. OETTL E.E., SOLEY J.T. : Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing : A pilot trial. *Arch. Androl.*, 1986, 17 : 145-150.

52. OOSTERHUIS G.J., MULDER A.B., KALSBEK-BATENBURG E. et al. : Measuring apoptosis in human spermatozoa : A biological assay for semen quality ? *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 245-250.
53. PAASCH U., SHARMA R.K., GUPTA A.K. et al. : Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2004, 71 : 1828-1837.
54. PALERMO G.D., SCHLEGEL P.N., HARIPRASHAD J.J. et al. : Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 741-748.
55. RON-EL R., STRASSBURGER D., FRIEDLER S. et al. : Extended sperm preparation : An alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 1222-1226
56. RNOT X., AUGER J. : Flow and image cytometry for quality assessment of fresh and frozen human sperm samples. *Anal. Cell. Pathol.*, 1990, 2 : 313-322.
57. ROYERE D., HAMAMAH S., NICOLLE J.C. et al. : Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa : Fluorescence acridine orange staining and feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.*, 1988, 21 : 51-57.
58. ROYERE D., HAMAMAH S., NICOLLE J.C. et al. : Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int. J. Androl.*, 1991, 14 : 328-332.
59. SAKKAS D., MARIETHOZ E., MANICARDI G. et al. : Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*, 1999, 4 : 31-37.
60. SAKKAS D., URNER F., BIANCHI P.G. et al. : Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 837-843.
61. SELI E., GARDNER D.K., SCHOOLCRAFT W.B. et al. : Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 2004, 82 : 378-383.
62. SERGERIE M., BLEAU G., TEULE R. et al. : [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2005, 33 : 89-101.
63. SHEN H.M., DAI J., CHIA S.E. et al. : Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 1266-1273.
64. SODJA C., WALKER P.R., BROWN D. et al. : Unique behaviour of NuMA during heat-induced apoptosis of lymphocytes. *Biochem. Cell Biol.*, 1997, 75 : 399-414.
65. SPANO M., CORDELLI E., LETER G. et al. : Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 29-37.
66. STEELE E.K., MCCLURE N., LEWIS S.E. : Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 450-453.
67. STEELE E.K., MCCLURE N., MAXWELL R.J. et al. : A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 831-835.
68. SUN J.G., JURISICOVA A., CASPER R.F. : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : Correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, 1997, 56 : 602-607.
69. TESARIK J., GRECO E., MENDOZA C. : Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 611-615.
70. TOMLINSON M.J., MOFFATT O., MANICARDI G.C. et al. : Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation : Implications for assisted conception. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 2160-2165.
71. TOURNAYE H. : Non-surgical sperm recovery : Part 1. *Hum. Reprod. Update*, 1999, 5 : 210.
72. ULUG U., BENER F., KARAGENC L. et al. : Outcomes in couples undergoing ICSI: Comparison between fresh and frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 2005, 28 : 343-349
73. VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H. et al. : A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods*, 1995, 184 : 39-51.
74. VOLTPE A., SAMMARTANO F., COFFARO F. et al. : Is it possible to use the hypoosmotic swelling test as criteria for "freezeability" of human semen in an aid program ? *Acta Eur. Fertil.*, 1992, 23 : 191-194.
75. WATSON P.F. : The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 60-61 : 481-492.
76. ZINIA., BIELECKI R., PHANG D. et al. : Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, 2001, 75 : 674-677.

Manuscrit reçu : juillet 2006 ; accepté décembre 2006.

ABSTRACT

Influence of cryopreservation on DNA fragmentation for normal to severely altered sperm

Célia SABBAGH, Martine ALBERT, François VIALARD, Ibrahim HAMMOUD, Marianne BERGERE, Vincent DELABROYE, Denise MOLINA-GOMES, Marc BAILLY, Raoul LOMBROSO, Jacqueline SELVA

positively select spermatozoa, accelerating elimination of senescent spermatozoa by necrosis, so that early apoptotic spermatozoa from fresh ejaculate are not found in thawed samples.

These results, that need to be completed by a study on a larger sample of oligospermic patients, encourage us to continue cryopreserving severely altered sperms.

Key-Words: sperm cryopreservation, severe oligozoospermia, DNA fragmentation, TUNEL, spermatoc migration, ICSI

Ejaculated sperm cryopreservation can be proposed in the course of an ART procedure, particularly in the case of severe oligozoospermia likely to deteriorate. The aim of this study was to evaluate the influence of the freezing-thawing process on sperm DNA fragmentation (analysed by the TUNEL technique).

The first step of this work consisted of adapting the TUNEL technique to perform this analysis on very poor quality sperm. A study was then performed on 72 patients divided into 4 groups according to their spermatoc characteristics: group 1 [n=20] ("normal" parameters according to WHO), group 2 [n=24] (normal sperm count associated with asthenospermia and/or teratospermia), group 3 [n=16] (total sperm count between 5 and 20 M) and group 4 [n=12] (total sperm count below 5 M). Spermatoc parameters and DNA fragmentation (performed by TUNEL in situ technique, 400 spermatozoa read per slide) were evaluated on raw semen - for all patients -, raw migrated sperm - for patients of group 1 and 2 -, migrated frozen-thawed sperm - for all patients-.

A TUNEL technique adapted to oligospermic samples was developed, manipulating spermatozoa directly on the slide rather than in suspension, to limit spermatoc sample loss. After the whole migration-freezing-thawing process, the mean DNA fragmentation rate decreased for patients in group 1 (2.9 vs 5.1%, $p<0.0001$) whereas this rate increased for patients in groups 2 (10.5 vs 6.8%, $p<0.0001$), 3 (10.7 vs 7.6%, $p<0.05$) and 4 (15.2 vs 8.7%, $p<0.005$). DNA fragmentation rates from thawed samples were also correlated with initial spermatoc parameters. At the intermediary step, migration decreased DNA fragmentation rate in comparison with raw semen rate in both groups (1.9 vs 4.7% [$p<0.05$] in group 1; 2.5 vs 5.4% [$p<0.05$] in group 2).

DNA fragmentation rate decreases after migration and then increases after freezing-thawing so that this rate is lower than the raw semen rate for "normal" sperms and higher than the raw semen rate for altered sperms. Nevertheless, this DNA damage induced by cryopreservation on altered sperms remains moderate. Sperm "resistance" to cryopreservation also appears to depend on spermatoc parameters. Cryopreservation may