Comment identifier le spermatozoïde vivant ?

Nathalie RIVES¹, Louis SIBERT², Sophie MAZURIER¹, Jean-Pierre MILAZO¹,

Nathalie MOUSSET-SIMEON¹, Brigitte CLAVIER³, Bertrand MACE¹

1 Laboratoire de Biologie de la Reproduction, 2 Service d'Urologie,

3 Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Charles Nicolle, Rouen

RESUME

Les spermatozoïdes testiculaires ont une mobilité souvent diminuée voire nulle qui est considérablement altérée par le processus de congélation-décongélation. La difficulté, face à des spermatozoïdes immobiles, est de faire la distinction entre un spermatozoïde vivant et un spermatozoïde mort. La plupart des tests de vitalité spermatique explorent l'intégrité fonctionnelle et structurale de la membrane plasmique, comme les tests d'exclusion des colorants vitaux ou le test de gonflement hypo-osmotique.

La mobilité spermatique est le seul paramètre qui permet d'avoir la certitude de la vitalité spermatique. Nous avons évalué les effets de la Pentoxifylline (PTX), inhibiteur de la phosphodiestérase de l'AMPc, sur les spermatozoïdes testiculaires décongelés (n=14), afin de démontrer que ce stimulant chimique est capable d'induire ou d'augmenter leur mobilité. La PTX augmente significativement le nombre de spermatozoïdes testiculaires mobiles après décongélation dans les prélèvements de patients présentant une azoospermie sécrétoire (n=8) ou excrétoire (n=6). L'action maximale est atteinte entre 60 et 120 minutes. L'effet de la PTX sur la mobilité est supérieure lorsque les spermatozoïdes sont issus de sujets présentant une azoospermie excrétoire. L'association PTX-gradient de migration amplifie cet effet sur la mobilité dans les prélèvements d'origine excrétoire. Cet effet cumulatif n'est pas observé sur les spermatozoïdes des azoospermies sécrétoires.

Sur les 100 cycles d'ICSI réalisés à l'aide de spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires décongelés et traités par la PTX à 3,5mM, aucune différence significative n'a été observée entre les taux de fécondation, le nombre d'embryons obtenus,

transférés ou congelés ainsi que les taux de grossesse entre les cycles d'ICSI utilisant des spermatozoïdes testiculaires des azoospermies sécrétoires et ceux des azoospermies excrétoires.

Le Pentoxifylline, en induisant et augmentant la mobilité des spermatozoïdes testiculaires décongelés, facilite la sélection des spermatozoïdes vivants en vue de leur utilisation ultérieure.

Mots clés : *pentoxifylline, spermatozoïdes immobiles, spermatozoïdes testiculaires, vitalité spermatique*

I. INTRODUCTION

L'injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI) a largement démontré son efficacité dans la stratégie de prise en charge des altérations spermatiques les plus sévères [26]. Des taux élevés de fécondation, de clivage et de grossesse ont très rapidement été rapportés après ICSI effectuées avec des spermatozoïdes éjaculés [22], épидидymaires et testiculaires [23]. L'extraction de spermatozoïdes à partir de fragments testiculaires (TESE) est donc proposée non seulement dans les azoospermies excrétoires mais aussi dans les azoospermies sécrétoires. Les spermatozoïdes testiculaires peuvent être utilisés directement après l'extraction ou être congelés et stockés dans l'azote liquide [12]. La congélation des spermatozoï-

Correspondance :

Dr Nathalie Rives - Laboratoire de Biologie de la Reproduction. Hôpital Charles Nicolle, 76031 ROUEN - Tel 02.32.88.82.25 - Fax 02.35.98.20.07 - Email nathalie.rives@chu-rouen.fr

des testiculaires évite la répétition des prélèvements chirurgicaux testiculaires chez un même patient et les complications qui peuvent en découler (hématome, infection, dévascularisation du testicule,...) [30]. La biopsie testiculaire peut ainsi être réalisée de manière asynchrone au jour de la ponction ovocytaire, plus particulièrement dans les azoospermies sécrétoires où l'isolement de spermatozoïdes peut-être infructueux dans 40% des cas.

Les spermatozoïdes testiculaires décongelés ont une mobilité très altérée voire nulle. Cependant, les taux de fécondation et de grossesse ne semblent pas être affectés par le processus de congélation-décongélation, même lorsque la concentration et la mobilité des spermatozoïdes est très faible [24]. Or, la vitalité des spermatozoïdes est le paramètre majeur qui retentit directement sur les taux de fécondation et de grossesse en ICSI. La difficulté, face aux spermatozoïdes immobiles, est de faire la distinction entre les spermatozoïdes vivants et les spermatozoïdes morts. Cette étape d'identification du spermatozoïde vivant est un préalable indispensable avant son utilisation en ICSI.

L'identification des spermatozoïdes vivants ou morts fait intervenir des propriétés de la cellule qui sont altérées au cours de la mort cellulaire. Une définition de la mort cellulaire est cependant nécessaire pour comprendre les approches méthodologiques de reconnaissance du spermatozoïde vivant. Deux types de mort cellulaire sont habituellement proposées : la nécrose et l'apoptose. Ces deux processus vont affecter de manière différente la membrane plasmique et le noyau de la cellule.

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui survient secondairement à une agression et au décours d'un processus pathologique. Elle se caractérise sur le plan morphologique par un gonflement puis une lyse cellulaire qui s'accompagne d'une perte de l'intégrité membranaire et d'une compaction légère de la chromatine. La nécrose s'accompagne d'une réaction inflammatoire importante et affecte des groupes de cellules voisins [19]. La vitalité des spermatozoïdes est le paramètre qui permet de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morts par nécrose. Les méthodologies employées se réfèrent à la perte de l'intégrité membranaire observée au cours de la nécrose. La vitalité peut s'apprécier par l'exclusion des colorants vitaux ou la capacité de régulation osmotique de la membrane spermatique évaluée dans des conditions hypoosmotiques [40].

L'apoptose est une forme particulière de mort cellulaire programmée. Ce processus physiologique a pour but de maintenir l'homéostasie au sein des tissus. L'apoptose ne s'accompagne pas de réaction inflammatoire. L'intégrité de la membrane plasmique est longtemps préservée. La chromatine se condense et se marginalise, au niveau moléculaire, l'activation d'une DNase endogène spécifique entraîne un clivage internucléosomique de l'ADN générant des frag-

ments de 180 à 200 paires de bases. L'apoptose affecte une cellule unique. Les méthodes d'évaluation du processus apoptotique, telles que la méthode TUNEL (noyau) ou la détection des phosphatidyl sérines membranaires par l'Annexine V (membrane plasmique), ne permettent pas actuellement d'envisager une utilisation ultérieure des spermatozoïdes en ICSI [19].

Ainsi, les différentes approches méthodologiques que nous développerons auront pour but de distinguer le spermatozoïde vivant du spermatozoïde mort par nécrose. Un spermatozoïde vivant peut être mobile ou immobile : nous évaluerons l'intérêt de traiter par la Pentoxifylline les spermatozoïdes testiculaires décongelés pour induire ou augmenter leur mobilité. Nous comparerons ces résultats aux tests de vitalité colorimétriques et test de gonflement hypoosmotique (HOS-test).

II. MATERIEL ET METHODES

1. Etude A : Action de la Pentoxifylline sur les spermatozoïdes testiculaires après décongélation

a) Sujets étudiés

Quatorze hommes, âgés entre 27 et 39 ans consultant pour l'exploration d'une infertilité primaire, ont subi une biopsie testiculaire bilatérale avec extraction de spermatozoïdes.

Six patients présentaient une azoospermie excrétoire liée à une absence congénitale bilatérale des canaux déférents (A B C D, n=5) ou à une anéjaculation dans le cadre d'un traumatisme rachidien (n=1). Les dosages plasmatiques de FSH étaient normaux.

Huit patients présentaient une azoospermie sécrétoire à pH et volume normaux. Parmi leurs antécédents, on note une cryptorchidie uni- (n=1) ou bilatérale (n=3), une torsion testiculaire (n=1) et une varicocèle bilatérale (n=1). Deux patients n'avaient aucun antécédent andrologique. L'examen clinique et l'échographie génitale confirme la varicocèle, révèle une hypotrophie testiculaire chez trois patients et confirme l'absence de pathologie andrologique obstructive chez tous les patients. Les dosages plasmatiques de FSH étaient augmentés chez deux patients (18,8mUI/mL et 19mUI/ml respectivement).

b) Extraction des spermatozoïdes testiculaires (TESE)

La biopsie testiculaire est réalisée sous anesthésie générale. Après incision du scrotum et de la vaginale, une biopsie chirurgicale bilatérale (200 à 300mg) est réalisée. Les fragments testiculaires sont transportés au laboratoire dans du milieu IVF (Medicult®, France). La dilacération des tubes séminifères s'effectue sous loupe dans une boîte de Pétri (Falcon® 2003, Becton Dickinson Co, Angleterre) à l'aide de deux seringues à insuline et finalement à l'aide de deux lames de verre stérilisées. La suspension est alors mélangée

à l'aide d'un vortex. Une première recherche de spermatozoïdes est effectuée dans un échantillon de 10µL avec un microscope à contraste de phase. En l'absence d'isolement de spermatozoïdes, une deuxième recherche est réalisée après une incubation de deux à trois heures dans une étuve à 37°C 5% CO₂ sur l'ensemble de l'échantillon si besoin.

Une estimation du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité avant congélation est pratiquée dans un échantillon de 10µL.

c) Congélation des spermatozoïdes testiculaires

La suspension est diluée (v/v) dans un milieu cryoprotecteur sans jaune d'œuf (Spermfreeze®, JCD, France), aspirée dans des paillettes avant d'être congelée à l'aide d'un Minicool (LC 40®, Air Liquide Santé, France). Les paillettes sont stockées à -196°C dans l'azote liquide.

d) Préparation des échantillons et stimulation de la mobilité

Pour chaque patient, une paillette est décongelée pendant 5 minutes à 37°C avant d'être divisée en trois aliquotes de volume égal. L'un des aliquotes est utilisé comme contrôle et ne subit aucun traitement, le deuxième est traité à l'aide d'une solution de Pentoxifylline (Torental®) à la concentration finale de 3,5mM. Le dernier échantillon subira une migration préalable sur gradient de Percoll (KABI Pharmacia®, Uppsala, Suède) deux couches (70% et 90%), le culot de migration est divisé en deux aliquotes, l'un subissant un traitement à la Pentoxifylline (PTX) à la même concentration que précédemment et le second aucun traitement supplémentaire.

e) Analyse des prélèvements

Dix µL de chaque échantillon sont dilués dans 20µL de milieu de culture (IVF, Medicult®, France), placés dans une boîte de Pétri et observés sous huile détoxifiée à l'aide d'un microscope inversé. Le nombre de spermatozoïdes mobiles (mobilité sur place et progressive) est évalué à 15, 30, 60, 120 minutes et 24 heures après mise en contact avec la Pentoxifylline. La même observation est effectuée dans les échantillons non traités.

Le nombre de spermatozoïdes mobiles obtenu dans les échantillons avec et sans traitement par PTX est analysé à l'aide du test de Mann-Whitney (logiciel Statview® for Windows). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

2. Etude B : Etude rétrospective portant sur l'analyse de 100 tentatives d'ICSI utilisant des spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires décongelés et traités par Pentoxifylline

Cette étude rétrospective porte sur cent tentatives de fécondation *in vitro* par microinjection (ICSI) utilisant des sper-

matozoïdes épидидymaires ou testiculaires décongelés traités préalablement par PTX à la concentration finale de 3,5mM pendant 15 minutes. La congélation utilisée était la même que celle décrite pour l'étude A. La chronologie de prise en charge des patients présentant une azoospermie sécrétoire ou excrétoire et devant subir une biopsie testiculaire est la suivante :

- 1^{er} temps : diagnostic et exploration de l'azoospermie,
- 2^e temps : biopsie chirurgicale avec extraction et congélation des spermatozoïdes,
- 3^e temps : ICSI asynchrone.

Les spermatozoïdes extraits sont issus de patients présentant une azoospermie sécrétoire (AS) ou excrétoire (AE). Pour chacun des prélèvements testiculaires, un test de décongélation est effectué préalablement à la tentative d'ICSI. La mobilité est appréciée avant et après traitement par la PTX. Pour chacune des tentatives réalisées, seront pris en compte l'âge de l'homme le jour de la biopsie et de la femme le jour de la tentative, le nombre d'ovocytes recueillis, le taux de fécondation, le nombre d'embryons obtenus, le nombre et la qualité des embryons transférés, le taux de grossesse après transfert des embryons frais ainsi que le nombre d'embryons congelés.

La mobilité des spermatozoïdes est analysée à l'aide d'un test de Student afin de comparer entre les deux groupes (AE et AS) la mobilité avant et après traitement par PTX. La même analyse est pratiquée sur les différents paramètres des tentatives d'ICSI. Une valeur de $p < 0,05$ sera considérée comme significative.

III. RESULTATS

1. Etude A

Après décongélation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est plus élevé chez les sujets présentant une azoospermie excrétoire ($p = 0,003$). La migration sur gradient de Percoll permet d'initier la mobilité des spermatozoïdes testiculaires après décongélation (Figure 1). Cependant, sur les échantillons des azoospermies sécrétoires, cette préparation entraîne une réduction importante du nombre de spermatozoïdes qui sont perdus au cours de la migration.

La Pentoxifylline augmente la mobilité des spermatozoïdes testiculaires après décongélation avec ou sans migration préalable sur gradient de Percoll ($p < 0,0001$, Tableau 1 et Tableau 2). Un effet maximal est observé 60 à 120 minutes après la mise en contact avec la PTX ($p < 0,001$). Dans certains échantillons, une mobilité progressive a pu être observée.

L'effet de la PTX sur la mobilité semble supérieure lorsque les spermatozoïdes sont issus de sujets présentant une azoospermie excrétoire. De la même façon, l'association

Figure 1 : Effet de la Pentoxifylline et de la migration sur gradient de Percoll sur la mobilité des spermatozoïdes testiculaires après décongélation.

Tableau 1 : Mobilité des spermatozoïdes testiculaires décongelés traités par Pentoxifylline.

AZOOSPERMIE	SANS PENTOXIFYLLINE					AVEC PENTOXIFYLLINE				
	15 min	30 min	60 min	2h	24 h	15 min	30 min	60 min	2h	24 h
SECRETOIRE	6.38	5.25	7.38	7.13	2.50	26.63	24.25	24.00	22.38	14.29
EXCRETOIRE	7.33	7.17	6.67	5.67	7.33	24.50	29.17	30.17	31.67	26.00
MOYENNE	6.88	6.07	7.07	6.50	4.57	25.71	26.36	26.64	26.36	19.69

Tableau 2 : Mobilité des spermatozoïdes testiculaires décongelés migrés sur gradient de percoll et traités par Pentoxifylline.

AZOOSPERMIE	SANS PENTOXIFYLLINE					AVEC PENTOXIFYLLINE				
	15 min	30 min	60 min	2h	24 h	15 min	30 min	60 min	2h	24 h
SECRETOIRE	11.38	8.50	8.00	7.38	5.63	17.13	15.75	17.63	15.86	13.67
EXCRETOIRE	18.33	19.00	22.17	19.17	16.33	44.33	41.83	42.00	41.50	27.67
MOYENNE	14.36	13.00	14.08	12.43	10.21	28.79	26.93	28.07	27.43	19.27

migration sur gradient de Percoll suivi d'un traitement par PTX amplifie cet effet sur la mobilité dans les azoospermies excrétoires par comparaison au simple traitement par PTX ($p=0,002$) (Figure 1).

Dans les azoospermies sécrétoires, cet effet cumulatif entre le Percoll et la PTX n'est pas observé. Le Percoll semble plutôt réduire le recrutement des spermatozoïdes mobiles.

2. Etude B

Parmi les cent tentatives d'ICSI utilisant des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement, 72 tentatives ont utilisé des spermatozoïdes testiculaires provenant de patients présentant une azoospermie sécrétoire ($n=53$) ou une azoospermie excrétoire ($n=19$), et 28 ont intéressé des spermatozoïdes épидидymaires dans le cadre d'une azoospermie excrétoire. Les résultats d'ICSI avec spermatozoïdes épидидymaires ont été regroupés avec ceux des spermatozoïdes testiculaires du groupe azoospermie excrétoire car les différents résultats de l'AMP ne variaient pas entre les deux groupes.

Les tests de décongélation réalisés avant la tentative d'ICSI confirment les résultats de l'étude A. La PTX augmente significativement la mobilité des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires. La mobilité initiale est plus faible pour les spermatozoïdes de patients présentant une azoospermie sécrétoire. L'âge des hommes et des femmes,

le taux de fécondation, le nombre d'embryons obtenus, transférés et congelés ainsi que les taux de grossesse ne varient pas significativement entre les deux groupes (sécrétoire ou excrétoire, Tableau 3).

La seule différence significative observée intéresse le nombre d'ovocytes recueillis et injectés, plus faible dans le groupe sécrétoire.

IV. DISCUSSION

L'identification des spermatozoïdes vivants peut s'effectuer par l'analyse de deux paramètres : la vitalité et la mobilité.

1. La vitalité

La vitalité des spermatozoïdes peut s'apprécier par les modifications des propriétés de la membrane plasmique survenant au cours de la nécrose. Différents tests sont actuellement disponibles pour vérifier l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique spermatique. La vitalité des spermatozoïdes, comme définie selon les critères de l'O.M.S, reflète la proportion de spermatozoïdes « vivants » déterminée par l'exclusion de colorants ou par leur capacité de régulation osmotique dans des conditions hypo-osmotiques. La membrane plasmique lésée devient perméable à certains colorants et ne répond plus aux variations de pression osmotique [40].

Tableau 3 : Résultats de 100 tentatives d'ICSI réalisées à l'aide de spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires décongelés traités par Pentoxifylline.

	AZOOSPERMIE EXCRETOIRE		AZOOSPERMIE SECRETOIRE
Age Mr	33,40 ± 0,99	NS	33,36 ± 0,63
Age Me	30,29 ± 0,47	NS	31,57 ± 0,69
Ovocytes recueillis	14,30 ± 0,97	$p<0,001$	11,23 ± 0,95
Ovocytes injectés	10,28 ± 0,74	$p<0,001$	7,53 ± 0,65
Embryons obtenus	6,34 ± 0,59	NS	4,02 ± 0,35
Taux de fécondation	58,81 ± 3,62	NS	55,48 ± 3,33
Embryons transférés	1,96 ± 0,11	NS	1,89 ± 0,10
Embryons congelés	1,10 ± 0,32	NS	0,60 ± 0,20
Taux de grossesses par transfert (%)	27,30 ± 0,07	NS	25,50 ± 0,06
Embryons remplacés			
C1/E1	3,45 ± 0,26/15,04 ± 1,95	NS	3,24 ± 0,19/10,98 ± 2,16
C2/E2	3,41 ± 0,25/16,67 ± 2,63	NS	3,30 ± 0,23/12,13 ± 2,09
C3/E3	3,38 ± 0,60/22,50 ± 3,90	NS	3,33 ± 0,24/14,44 ± 5,68
Test de décongélation			
Mobilité sans PTX	3,00 ± 0,83	$p<0,001$	0,46 ± 0,22
Mobilité avec PTX	23,68 ± 2,56	NS	22,89 ± 4,19

Les résultats rapportent les moyennes (±SEM)

C : nombre de blastomères. E : pourcentage d'exsudats (%). NS : différence non significative.

a) Exclusion des colorants vitaux

Les colorants vitaux permettent d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique au niveau de la tête des spermatozoïdes. Le spermatozoïde vivant exclut le colorant et le spermatozoïde mort laisse passer le colorant. La coloration vitale la plus fréquemment utilisée associe l'Eosine Y et la Nigrosine (O.M.S). L'observation s'effectue à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Le pourcentage de spermatozoïdes colorés doit être inférieur ou égal au pourcentage de spermatozoïdes mobiles. D'autres colorants sont actuellement disponibles pour étudier la vitalité spermatique : nous ne citerons que le Iodure de Propidium et l'Hoechst 33258 [4, 33]. Les spermatozoïdes sont observés avec un microscope à fluorescence. La coloration au Iodure de Propidium offrirait une plus grande sensibilité dans la détection des spermatozoïdes morts que l'Eosine Y-Négrosine [33]. La coloration Eosine Y-Nigrosine comme le Iodure de Propidium ne permettent pas une utilisation ultérieure des spermatozoïdes en ICSI. Même si le Hoechst autorise une utilisation des échantillons traités, la reconnaissance des spermatozoïdes morts n'est réalisable qu'à l'aide d'un microscope à fluorescence. Par ailleurs, les tests colorimétriques sont difficilement interprétables en présence d'un faible nombre de spermatozoïdes, donc sur des prélèvements testiculaires.

b) Test de gonflement hypo-osmotique

Le test de gonflement hypo-osmotique ou « HOS test » ou « Curling test » est basé sur le fait que la membrane de la cellule intacte est semi-perméable. Le spermatozoïde vivant placé dans un milieu hypo-osmotique va augmenter de volume du fait de l'influx d'eau. Le spermatozoïde va gonfler et un enroulement plus ou moins important du flagelle sera observé [39]. L'HOS-test serait un indicateur de la conservation de l'intégrité membranaire au niveau du flagelle du spermatozoïde. Les milieux hypo-osmotiques utilisés sont habituellement un mélange Fructose (150mOsmol)/Citrates de Sodium (150mOsmol) [15, 4], milieu de culture/eau distillée (v/v) [42] ou eau distillée uniquement dans le « Water test » [21]. Le test de gonflement hypo-osmotique est applicable sur une suspension de spermatozoïdes [16] ou sur spermatozoïde isolé [1]. Une corrélation existe entre la concentration de spermatozoïdes mobiles, le pourcentage de spermatozoïdes vivants et l'HOS-test [16]. Les limites d'utilisation de ce test de vitalité serait la congélation des spermatozoïdes. Son efficacité serait réduite voire nulle sur les spermatozoïdes décongelés : aucune corrélation n'est retrouvée entre l'HOS-test et la coloration vitale Eosine-Nigrosine ou Hoechst 33258 après décongélation [11]. Le même constat est effectué sur des spermatozoïdes éjaculés ou testiculaires immobiles après décongélation, 33% des spermatozoïdes répondent à l'HOS-test dont 24% sont colorés par l'Eosine-Nigrosine

[20]. La congélation altère l'intégrité membranaire spermatique, ces altérations débuteraient plus précocement au niveau de la tête qu'au niveau du flagelle. Cependant, Bachtell *et al.* [4] démontrent la supériorité de l'HOS-test sur la mobilité comme indicateur de vitalité sur des spermatozoïdes testiculaires, épididymaires ou déférentiels frais ou congelés. Dans cette étude, la mobilité des spermatozoïdes après décongélation n'est pas nulle, ce qui probablement reflète une meilleure préservation de l'intégrité membranaire. Il conviendrait de réserver l'HOS-test pour les spermatozoïdes non congelés éjaculés, épididymaires ou testiculaires et pour les échantillons décongelés présentant une mobilité résiduelle. L'HOS-test faciliterait la sélection des spermatozoïdes vivants en vue de leur utilisation ultérieure en ICSI. Casper *et al.* [6] présélectionnent par l'HOS-test des spermatozoïdes immobiles éjaculés ou épididymaires avant l'ICSI. Les taux de fécondation (43% vs 23%) et de clivage embryonnaire (39% vs 23%) sont plus élevés dans le groupe où une présélection des spermatozoïdes avant injection est pratiquée.

2. La mobilité

La mobilité est un paramètre qui permet d'avoir la certitude de la vitalité du spermatozoïde. Cependant, les spermatozoïdes extraits des testicules sont en faible quantité et leur mobilité initiale est très diminuée voire nulle. Leur congélation réduit considérablement les chances de retrouver des spermatozoïdes mobiles. Même si des grossesses peuvent être obtenues après injection de spermatozoïdes testiculaires immobiles [31, 29], la réalisation et les résultats de l'ICSI sont sans équivoque meilleurs après injection de spermatozoïdes mobiles [24].

a) Techniques de migration

L'initiation ou l'augmentation de la mobilité peut-être obtenue après migration qu'elle soit descendante (gradient de Percoll® ou de Puresperm®) ou ascendante (Swim up). Cependant, même si le gradient est réalisable pour les spermatozoïdes testiculaires, une perte importante de spermatozoïdes est observée, comme nous avons pu le constater dans l'étude A. Le Swim up est encore plus irréaliste pour les spermatozoïdes testiculaires.

b) Culture in vitro

L'incubation des prélèvements testiculaires à 37°C, avec 5% de CO₂, durant quelques heures dans un milieu de culture utilisé pour la fécondation *in vitro* [23], voire la culture *in vitro* des spermatozoïdes pendant 24 à 72 heures, permet d'initier cette mobilité sur des spermatozoïdes initialement immobiles [9]. De même, la culture des prélèvements avant leur congélation augmenterait la résistance des spermatozoïdes à la congélation [10]. La culture des spermatozoïdes pendant 48 heures dans le fluide tubaire stimulerait également leur mobilité [2]. Dans l'étude A, la mobilité des

spermatozoïdes testiculaires décongelés traités ou non par la Pentoxifylline diminue après une culture de 24 heures à 37°C, avec 5% de CO₂. L'absence d'élimination du milieu de congélation de même que l'incubation prolongée avec la PTX peuvent probablement avoir un effet délétère sur la survie des spermatozoïdes à 24 heures et expliquer ces résultats.

c) Stimulants chimiques : la Pentoxifylline

Une autre alternative pour augmenter la mobilité des spermatozoïdes est d'utiliser des stimulants chimiques, parmi lesquels on peut citer la caféine, la déoxyadénosine mais surtout la Pentoxifylline [13]. Une autre molécule, le 17b-Oestradiol, peu employée jusqu'à présent, aurait également un effet bénéfique sur la mobilité spermatique [7, 14].

La Pentoxifylline (PTX) appartient à la famille des méthylxanthines dont font partie également la caféine et la théophylline. Cette molécule augmente la concentration intracellulaire de l'AMPc par inhibition de la phosphodiesterase de l'AMPc. Elle améliore la microcirculation en agissant comme vasodilatateur périphérique, elle diminue aussi la viscosité sanguine et l'agrégation des plaquettes. De ce fait, elle fut utilisée initialement dans le traitement de l'artériopathie des membres inférieurs et est habituellement connue sous le nom de Torental®. La PTX agit également sur les fonctions du spermatozoïde : elle augmente la mobilité des spermatozoïdes frais et congelés et plus particulièrement dans les asthénospermies [39], elle induit l'hyperactivation spermatique [38, 27, 17]. Elle facilite la pénétration des spermatozoïdes dans la glaire cervicale [25, 8], induit la réaction acrosomique [38], améliore les résultats de la fécondation *in vitro* [39, 36].

Aucun effet tératogène de la PTX n'a été observé chez la ratte [3] et la souris [18] à des doses comparables à celles administrées *per os* chez l'Homme. Aucune étude épidémiologique portant sur les anomalies congénitales observées dans la descendance de femmes traitées par PTX durant la grossesse n'est rapportée dans la littérature. *In vitro*, la toxicité de la Pentoxifylline en AMP peut s'envisager à trois niveaux : les spermatozoïdes, les ovocytes et les embryons. La toxicité sur les spermatozoïdes se développe à des concentrations de PTX supérieures à 5mg/ml avec un effet maximal au delà de 20mg/ml. La dose habituellement recommandée est de 2,5mg/mL [8] et correspond à la dose utilisée dans notre étude. L'effet toxique du temps d'exposition se manifeste au delà de deux heures, ce qui a pu être observé dans notre étude. Un effet maximale de la PTX sur les spermatozoïdes testiculaires apparaît entre une et deux heures après le début de l'incubation. En fécondation *in vitro* chez la souris, une activation ovocytaire spontanée est observée au-delà de 1mM de PTX avec un effet maximal au-delà de 5mM. L'incubation des ovocytes fécondés dans un milieu contenant des concentrations croissantes de PTX

entraîne un arrêt du clivage embryonnaire, un retard du développement embryonnaire voire une lyse embryonnaire, avec un effet dose au-delà de 0.16mM [32]. Dans l'étude B, les spermatozoïdes testiculaires décongelés sont incubés dans un milieu de culture contenant de la PTX et sont rincés avant d'être injectés dans l'ovocyte. La concentrations de PTX en contact avec l'ovocyte est donc infime tout en sachant que cette concentration n'a pas été mesurée objectivement.

L'étude A démontre l'efficacité de la PTX sur la mobilité des spermatozoïdes testiculaires décongelés, même lorsque la mobilité initiale est nulle. Cette initiation de la mobilité est rapportée dans une étude portant sur dix échantillons de spermatozoïdes testiculaires immobiles traités par PTX avec un effet maximal à 90 minutes [35]. Terriou *et al.* [37] incubent avec de la PTX dix échantillons de spermatozoïdes épидидymaires (n=5) et testiculaires (n=5) immobiles frais et congelés, et observent l'apparition d'une mobilité dans ces prélèvements. Les mêmes résultats sont rapportés par Calamera *et al.* [5] sur des spermatozoïdes testiculaires immobiles frais (n=17) et congelés (n=55). L'effet cumulatif de la PTX et du gradient de migration sur les spermatozoïdes testiculaires d'origine excrétoire n'est, à notre connaissance, pas rapporté dans la littérature. Mais, ce résultat peut s'interpréter aussi par une meilleure qualité des spermatozoïdes testiculaires, en terme de vitalité et de mobilité, dans les azoospermies obstructives [28]. L'association PTX-gradient de migration ne semble pas indiquée pour les spermatozoïdes testiculaires des azoospermies non obstructives. Le nombre et la vitalité étant initialement très faibles, une importante perte cellulaire est observée au cours de la migration.

L'analyse des cent tentatives d'ICSI réalisées à l'aide de spermatozoïdes testiculaires (ST) décongelés et traités par PTX révèle des taux de fécondation et de grossesse satisfaisants et peu différents des taux obtenus au sein de notre Laboratoire en ICSI à l'aide de spermatozoïdes éjaculés (SE) non traités par PTX (57,15% (ST) vs 63,24% (SE) et 26,9% (ST) vs 29,92% (SE) respectivement). Les mêmes constatations sont effectuées pour les taux de fécondation et de grossesse entre les prélèvements d'azoospermie obstructive et d'azoospermie non obstructive. Terriou *et al.* [37] obtiennent des résultats identiques en ICSI en injectant des spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires spontanément mobiles ou à mobilité induite par la PTX.

V. CONCLUSION

L'identification du spermatozoïde testiculaire vivant fait appel à différents artifices techniques qui peuvent être associés les uns les autres pour en améliorer leur efficacité. La stratégie qui pourrait être proposée en

présence de spermatozoïdes testiculaires immobiles pourrait être la suivante :

- **Le maintien en culture durant deux à trois heures à 37°C, avec 5% de CO₂ et le traitement secondaire par PTX (3,5mM) pendant une heure en l'absence de mobilité.**
- **Si les deux traitements précédents sont inefficaces, l'HOS-test peut s'envisager sur des spermatozoïdes isolés ou sur des petits groupes de spermatozoïdes.**
- **En cas d'échec complet, la réalisation de l'ICSI ne pourra être empêchée, des grossesses pouvant être obtenues par injection de spermatozoïdes immobiles non présélectionnés [41, 29].**

La vitalité spermatique n'est plus, cependant, le seul critère suffisant pour caractériser le spermatozoïde apte à féconder l'ovocyte en ICSI. Des altérations du noyau spermatique voire de la membrane plasmique non détectées par les tests de vitalité habituels et présentes aussi dans les spermatozoïdes mobiles sont susceptibles d'entraver le développement embryonnaire et de réduire le taux de grossesse après transfert [34].

REFERENCES

1. AHMADI A., NG S.C. : The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1997, 68 : 346-355.
2. ANGELOPOULOS T., ADLER A., KREY L., LICCIARDI F., NOYES N., MC CULLOUGH A. : Enhancement or initiation of testicular sperm motility by *in vitro* culture of testicular tissue. *Fertil. Steril.*, 1999, 71 : 240-243.
3. AVIADO D.M., PORTER J.M. : Pentoxifylline : a new drug for the treatment of intermittent claudication. Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse effects. *Pharmacotherapy*, 1984, 4 : 297-307.
4. BACHTELL N.E., CONAGHAN J., TUREK P.J. : The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 3048-3051.
5. CALAMERA J., DE VINCENZI S., NODAR F., FISZBAJN G., CHILLIK C., BRUGO-OLMEDO S. : Impact of cryopreservation on sperm motility and pentoxifylline efficiency on fresh and cryopreserved immotile sperm obtained from azoospermic patients. 18th annual meeting of the ESHRE, Vienna, Austria 2002.
6. CASPER R.F., MERIANO J.S., JARVI K.A., COWAN L., LUCATO M.L. : The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil. Steril.*, 1996, 65 : 972-976.
7. CHENG C.Y., BOETTCHER B. : The effect of steroids on the *in vitro* migration of washed human spermatozoa in modified Tyrode's solution or in fasting human blood serum. *Fertil. Steril.*, 1979, 32 : 566-570.
8. CENTOLA G.M., CARTIE R.J., COX C. : Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifylline with demonstration of toxicity. *J. Androl.*, 1995, 16 : 136-142.
9. EDIRISINGHE W.R., JUNK S.M., MATSON P.L., YOVICH J.L. : Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 2474-2476.
10. EMILIANI S., VAN DEN BERGH M., VANNIN A.S., BIRAMANE J., VERDOODT M., ENGLERT Y. : Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2371-2374.
11. ESTEVES S.C., SHARMA R.K., THOMAS A.J. JR, AGARWAL A. : Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertil. Steril.*, 1996, 66 : 798-804.
12. GIL-SALOM M., ROMERO J., MINGUEZ Y. et al. : Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1309-1313.
13. HAMMITT D.G., BEDIA E., ROGERS P.R., SYROP C.H., DONOVAN J.F., WILLIAMSON R.A. : Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen. *Fertil. Steril.*, 1989, 52 : 495-502.
14. IDAOMAR M., GUERIN J.F., LORNAGE J., CZYBA J.C. : Stimulation of motility and energy metabolism of spermatozoa from asthenozoospermic patients by 17 beta-estradiol. *Arch. Androl.*, 1989, 22 : 197-202.
15. JIYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J. : Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 1984, 70 : 219-228.
16. JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., ZANEVELD L.J. : The hypoosmotic swelling test : an update. *Arch. Androl.*, 1992, 29 : 105-116.
17. KAY V.J., COUTTS J.R., ROBERTSON L. : Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1993, 8 : 727-731.
18. LEAZER T.M., DASTON G.P., KEEN C., ROGERS J.M. : Lipopolysaccharide (LPS)-induced embryo lethality in the CD-1 mouse : Effects of inhibition of tumor necrosis-alpha (TNF-alpha). *Teratology*, 1998, 57 : 235.
19. LEVY R. : Apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé. *Andrologie*, 1999, 3 : 449-458.
20. LIN M.H., MORSHEDI M., SRISOMBUT C., NASSAR A., OEHNINGER S. : 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.
21. LOMEO A.M., GIAMBERSIO A.M. : "Water-test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int. J. Androl.*, 1991, 14 : 278-282.
22. NAGY Z.P., LIU J., JORIS H. et al. : The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 1123-1129.
23. NAGY Z., LIU J., CECILE J. et al. : Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1995, 63 : 808-815.

24. NAGY Z.P., JORIS H., VERHEYEN G., TOURNAYE H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A.C. : Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 890-895.
25. NASSAR A., MORSHEDI M., MAHONY M., SRISOMBUT C., LIN M.H., OEHNINGER S. : Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia*, 1999, 31 : 9-15.
26. PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A.C. : Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340 : 17-18.
27. PANG S.C., CHAN P.J., LU A. : Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil. Steril.*, 1993, 60 : 336-343.
28. PRINS G.S., DOLGINA R., STUDNEY P., KAPLAN B., ROSS L., NIEDERBERGER C. : Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J. Urol.*, 1999, 161 : 1504-1508.
29. RIVES N., SIBERT L., CLAVIER B., DELABROYE V., MARPEAU L., MACIÉ B. : Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed immotile testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 3399-3401.
30. SCHLEGEL P.N., SU L.M. : Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 1688-1692.
31. SHULMAN A., FELDMAN B., MADGAR I., LEVRON J., MASHIACH S., DOR J. : In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 749-752.
32. SCOTT L., SMITH S. : Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil. Steril.*, 1995, 63 : 166-175.
33. SION B., GRIZARD G., BOUCHER D., JANNY L. : Annexin V binding to plasma membrane predicts the outcome of cryopreservation of human sperm. 18th annual meeting of the ESHRE, Vienna, Austria 2002.
34. STEELE E.K., MC CLURE N., MAXWELL R.J., LEWIS S.E. : A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 831-835.
35. TASDEMIR I., TASDEMIR M., TAVUKCUOGLU S. : Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1998, 15 : 90-99.
36. TASDEMIR M., TASDEMIR I., KODAMA H., TANAKA T. : Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 1993, 8 : 2102-2107.
37. TERRIOU P., HANS E., GIORGETTI C., et al. : Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2000, 17 : 194-199.
38. TESARIK J., THIEBAULT A., TESTART J. : Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum. Reprod.*, 1992, 7 : 1257-1263.
39. TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A.C., DEVROEY P. : Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Hum. Reprod.*, 1994, 9 : 996-1000.
40. WHO : WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge UK, 1999.
41. WANG C.W., LAI Y.M., WANG M.L., LEE J.D., SOONG Y.K. : Pregnancy after intracytoplasmic injection of immotile sperm. A case report. *J. Reprod. Med.*, 1997, 42 : 448-450.
42. VERHEYEN G., JORIS H., CRITS K., NAGY Z., TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A. : Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Update*, 1997, 3 : 195-203.

ABSTRACT

How to identify living spermatozoa?

**Nathalie RIVES, Louis SIBERT,
Sophie MAZURIER, Jean-Pierre MILAZO,
Nathalie MOUSSET-SIMEON, Brigitte CLAVIER,
Bertrand MACE**

Testicular sperm extraction (TESE) has been used to retrieve spermatozoa in patients with secretory azoospermia for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). However, testicular spermatozoa have poor motility that significantly decreases after cryopreservation and thawing. The major difficulty with testicular spermatozoa is to distinguish between living and dead spermatozoa, as most spermatozoa are immotile. The aim of this study was firstly to report the various methods used to explore spermatozoa vitality. Most tests assess the functional and structural integrity of the sperm membrane, such as staining methods and hypo-osmotic swelling test (HOS-test). We then evaluate the potential of pentoxifylline (PTX), a phosphodiesterase inhibitor of the methylxanthine group, to improve the distinction between living and dead immotile testicular spermatozoa by increasing the number of post-thawed motile spermatozoa. We also analysed the results of 100 ICSI cycles performed with frozen-thawed testicular (n=72) and epididymal (n=28) spermatozoa treated with 3.5 mM PTX.

To test the effect of PTX on motility, 14 samples of frozen-thawed testicular spermatozoa from eight patients with secretory azoospermia and six patients with excretory azoospermia were divided into three equal samples : one sample treated with 3.5 mM PTX, one sample initially migrated on two-layer Percoll gradient and then divided into two aliquots (one treated with 3.5 mM PTX, one without treatment), and the last sample without migration and

without PTX treatment. The number of motile spermatozoa was evaluated in 10 μ L of each sample with an inverted microscope at 15, 30, 60, 120 minutes and 24 hours. We also compared the outcome of ICSI in 100 cycles using frozen-thawed epididymal or testicular spermatozoa between secretory and excretory patients.

PTX significantly increased the number of motile frozen-thawed testicular spermatozoa in secretory and excretory azoospermia. In excretory azoospermia, the number of motile spermatozoa was further increased when PTX was associated with migration on Percoll gradient, while PTX alone gave the best results in secretory azoospermia. Fertilization and pregnancy rates as well as embryo quality and division stages were comparable in the two groups.

By increasing the number of motile frozen-thawed testicular spermatozoa, PTX improves the selection of living spermatozoa.

Key-Words: *immotile spermatozoa, pentoxifylline, testicular spermatozoa, spermatozoa vitality*