

PRISE EN CHARGE DES CRYPTOZOOSPERMIES ET DES OLIGOSPERMIES EXTRÊMES

3. Modalités techniques de récupération et de congélation des spermatozoïdes

Martine ALBERT

Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Biologie de la Reproduction et Génétique Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint Germain

I. INTRODUCTION

L'enquête réalisée auprès des six centres sollicités s'est intéressée à ces deux aspects, essentiels en pratique et qui sont par ailleurs, rarement évoqués dans la littérature [6].

Concernant les **modalités techniques de récupération des spermatozoïdes**, le problème qui se pose d'emblée dans le cas des cryptozoospermies et des oligospermies inférieures à 100.000 spermatozoïdes dans la totalité de l'éjaculat, est le plus souvent l'absence de spermatozoïde observé lors d'un examen conventionnel, tel qu'il est préconisé par l'OMS [8]. Tout devra donc être mis en œuvre, lors du bilan, pour déceler quelques spermatozoïdes, évaluer la possibilité de les utiliser en ICSI et permettre peut-être ainsi d'éviter le recours à une biopsie testiculaire. Dans l'hypothèse, favorable, où une tentative d'ICSI est envisageable, la question se pose alors de proposer et de réaliser une **autoconservation** préalable, afin de pallier à une éventuelle absence de spermatozoïdes injectables le jour de l'ICSI.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'enquête a été réalisée auprès de six centres d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Elle concernait tous les patients présentant moins de 100 000 spermatozoïdes totaux dans leur éjaculat lors des bilans préalables à la tentative d'AMP et qui ont été pris en charge en ICSI entre le 1 janvier 1998 et le 31 décembre 2002.

Concernant la récupération et la congélation de spermatozoïdes dans ces situations, le questionnaire qui a été soumis à chaque centre avait pour premier objectif de recenser les techniques particulières mises en œuvre, concernant tant l'examen direct des rares spermatozoïdes éjaculés que leur recherche approfondie (voir présent numéro page 212). Le deuxième volet du questionnaire s'intéres-

sait à la congélation éventuelle de spermatozoïdes dans ces indications, à savoir notamment le type de fraction congelée, le cryoconservateur et le type de paillettes utilisées. Enfin, le questionnaire visait à recenser les autoconservations réalisées dans chaque centre et la qualité des paillettes congelées (voir présent numéro page 215).

III. RÉSULTATS

Le recueil de sperme ne fait pas l'objet de consignes particulières ; la plupart des centres privilégient le recueil d'un éjaculat unique dans les oligospermies extrêmes et ne proposent de recueil double qu'en cas d'hypospermie ou de cryptozoospermie afin d'optimiser la probabilité de retrouver des spermatozoïdes.

1. Examen direct

L'examen direct est standardisé dans chaque centre.

Il consiste à déposer après liquéfaction entre lame et lamelle 1 à 3 gouttes de sperme de 10 à 20µl chacune qui sont ensuite examinées dans leur totalité. Il est aussi possible d'utiliser une cellule de Thoma ou une chambre de Makler. Dans tous les cas, l'observation se fait au microscope photonique aux grossissements 200 ou 400.

Lors de cette observation, dans chaque centre, on procède à un comptage précis des spermatozoïdes, ce qui, rapporté au volume total, permet d'estimer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

La mobilité de chaque spermatozoïde est analysée dans le

Correspondance :

Dr Martine ALBERT – Service de Biologie de la Reproduction et de Génétique, CHIPS, 10 Rue du Champ Gaillard, 78303 POISSY cédex – Tel 01 39 27 51 55 – Fax 01 39 27 44 25 – Email mapoissy@wanadoo.fr

même temps, et classée en progressif rapide (a), progressif lent (b), mobile sur place (c) et immobile (d), conformément aux critères de l'OMS [8].

La vitalité n'est appréciée dès l'examen direct que dans un seul centre en colorant les spermatozoïdes à l'éosine nigrosine.

En dehors de la vitalité dont l'estimation fait l'objet de divergences entre les 6 centres, il semble que globalement la méthodologie de l'examen direct soit comparable.

2. Recherche approfondie de spermatozoïdes

a) Préparation d'une fraction concentrée

De façon à concentrer les spermatozoïdes dans un volume faible, elle consiste pour cinq des six centres à centrifuger la totalité de l'éjaculat à deux reprises (1500 à 3500 tr/mn pendant 5 à 20 mn). Si le nombre de spermatozoïdes semble suffisant, ces centrifugations-lavages sont suivies d'une migration ascendante (mini swim-up) ou sur gradient de percoll.

Un seul centre effectue de manière systématique une migration directe sur un gradient de PureSperm (Nidacon, Gothenburg, Suède, distribué par J. C. Diffusion, Lyon, France). La totalité de l'éjaculat est répartie par aliquots de 1 à 1,5ml sur 2 couches de gradients 90/45 qui sont centrifugés à 1400tr/mn pendant 20 minutes. Après lavage en milieu P1 (Médicult, France), les spermatozoïdes sont concentrés dans un culot compris entre 100 et 150 µl.

b) Analyse de la fraction concentrée

Pour chaque centre, l'analyse de cette fraction est réalisée selon la même procédure que celle de l'examen direct. Elle est associée dans 3 centres à l'observation d'une goutte de 3 à 10µl au microscope inversé, sous huile. Dans tous les cas, le nombre et la mobilité des spermatozoïdes sont à nouveau évalués sur cette préparation.

Dans tous les cas d'asthénospermie importante (mobilité a + b) ou totale (100% immobiles), la vitalité des spermatozoïdes devient un paramètre indispensable [5] et elle est estimée soit par hypo-osmotic swelling test (HOS) soit par un test à la pentoxyphylline [8]

3. Congélation de sperme

Selon les centres interrogés et en cas de cryptozoospermie, elle est quasi systématique dans certains centres ou ciblée sur des indications spécifiques pour d'autres. Elle est alors proposée en cas de fluctuation importante des paramètres spermatiques, de crainte d'aggravation ou de difficultés de recueil. La mise en évidence lors du bilan de microdélétion du chromosome Y ou de remaniement chromosomique constitue également une indication à l'autoconservation.

Un centre n'ayant pas pratiqué d'autoconservations chez les patients présentant une cryptozoospermie dans la période considérée, la congélation de sperme a concerné 70 patients sur 99 (70,7%) dans les cinq autres centres. Elle a été proposée à 81,5% des patients présentant les numérations les plus basses (Groupe 1) et à 65,3% de ceux du Groupe 2.

Au fil des années, cryoconservateur et type de paillettes ont évolué, de sorte qu'actuellement, dans les cinq centres, le Sperm Freeze (FertiPro, Beernem, Belgique, distribué par J. C. Diffusion, Lyon, France) est le seul cryoconservateur utilisé, aux dilutions 1/2, rarement 2/3, et la conservation est toujours effectuée dans des paillettes haute sécurité.

C'est au niveau des modalités de la congélation que les différences entre les centres sont les plus marquées (Tableau 1).

Ces différences sont directement en relation avec la fraction congelée. Selon qu'il s'agisse de sperme entier, concentré ou migré, le nombre moyen de paillettes réalisées par patient varie en moyenne de 3,1 à 15,3 avec des valeurs extrêmes de 1 à 34. Il en est de même pour les numérations de spermatozoïdes totaux et mobiles par paillette. En fait, seul le centre 3 congèle une fraction migrée de spermatozoïdes, selon la technique décrite précédemment par Guthauser et al. [1]. Cette technique de congélation en microgouttes consiste à préparer des paillettes contenant une fraction de 25 à 50µl de spermatozoïdes migrés, diluée au 1/2 dans du Sperm Freeze (FertiPro, Beernem, Belgique, distribué par J. C. Diffusion, Lyon, France), entourée de 2 bulles d'air et à chaque extrémité d'une bulle de milieu.

Compte tenu de la qualité aléatoire des paillettes avant congélation, les 5 équipes interrogées effectuent des tests de décongélation, soit fréquemment, soit en raison d'un nombre jugé insuffisant de spermatozoïdes mobiles obtenu avant congélation (Tableau 2). Au total, 37 autoconservations sur 70 ont fait l'objet d'un test de décongélation avant stockage des paillettes et dans 4 cas, un test de vitalité HOS a été réalisé en raison d'une absence totale de mobilité résiduelle après décongélation.

Enfin, au terme de ces différents tests, 58 des 70 tentatives de congélation de spermatozoïdes ont été jugées utilisables (Tableau 3).

IV. DISCUSSION

Cette étude rétrospective s'inscrit dans une démarche de prise en charge spécifique des patients présentant une oligospermie extrême, une cryptozoospermie, voire une azoospermie non obstructive. L'examen conventionnel du sperme tel qu'il est décrit par l'OMS [8] peut en effet s'avérer faussement négatif. En particulier dans les cas d'azoospermie non obstructive, Ron-El *et al.* [6] avaient montré que la recherche approfondie de spermatozoïdes avait été positive chez 17 patients sur 49, permettant ainsi d'éviter d'effectuer une biopsie testiculaire et de recourir à une ICSI avec des spermatozoïdes éjaculés et un pronostic comparable [2]. Ceci démontre l'intérêt majeur de tout mettre en œuvre pour parvenir à recueillir ces rares spermatozoïdes et éventuellement de répéter cette recherche approfondie sur un autre éjaculat, voire en proposant au patient un délai d'abstinence augmenté (14 jours) dans les cas les plus sévères [4], ce qui ne semble pas en usage pour les six centres mentionnés.

Cette recherche approfondie est réalisée le plus souvent par une succession de centrifugations lavages associée ou

Tableau 1 : Modalités de la congélation des spermatozoïdes dans les différents centres pratiquant l'autoconservation.

CENTRE	1	2	3	4	5
Paillettes ^a	N / HS	N / HS	N / HS	N / HS	N / HS
Cryoprotecteur ^b et dilution	Sperm Freeze 1/2	Sperm Freeze 2/3	Freezing medium Sperm Freeze 1/2	Cryosperm Sperm Freeze 1/2	Cryosperm Sperm Freeze 1/2
Sperme	Entier	Concentré	Migré Microgouttes	Entier ou concentré	Concentré ou entier
Nombre de paillettes/ patient ^c	15,3 (10-20)	3,1 (1-7)	3,1 (1-6)	5 (1-34)	6,4 (2-18)
Nombre moyen de spz/paillette ^c	33 340 (20-50 000)	25 923 (5 000-100 000)	1 345 (54-6 600)	55 676 (1500-100 000)	4 510 (100-15 000)
Nombre moyen de spz mobiles/ paillette ^c	1,5 (0-5)	2 554 (50-7 000)	721 (0-4 000)	15 891 (500-90 000)	1 601 (24-3 000)

a : Paillettes : N = Normale ; HS = Haute Sécurité.

b : Cryoprotecteurs : Freezing medium : Irvine Scientific, California, USA ; Cryosperme : Biomedica, Boussens, France ;
Sperm Freeze : FertiPro, Beernem, Belgique.

c : Valeurs moyennes et valeurs extremes entre ().

Tableau 2 : Fréquence et indication de décongélation et de vitalité (après décongélation) dans les 5 centres pratiquant l'autoconservation.

CENTRE	1	2	3	4	5	TOTAL
Nombre tests de décongélation/ nombre d'autoconservations	3/3	11/13	18/24	3/25	2/5	37/70
Indication	Systématique	Quasi systématique	Quasi systématique	< 10 000 spz mobiles/paillette	< 2 000 spz mobiles/paillette	/
Nombre tests de vitalité/ nombre tests de décongélation	0/3	0/11	4/18 (HOS)	0/3	0/2	4/37

Tableau 3 : Bilan des autoconservations effectuées dans chaque centre pratiquant l'autoconservation.

CENTRE	1	2	3	4	5	TOTAL
Nombre de tentatives d'autoconservation	3	13	24	25	5	70
Nombre d'autoconservations utilisables	1	13	20	22	2	58

non à une migration sur gradient. Dans tous les cas où des spermatozoïdes sont retrouvés dans le culot final (au microscope photonique à contraste de phase ou au microscope inversé), il convient ensuite de pouvoir évaluer précisément le nombre de spermatozoïdes disponibles et leur mobilité, voire leur vitalité en cas d'asthénospermie majeure ou totale. Au terme de cette recherche approfondie, il sera en effet nécessaire d'être en mesure d'apprécier si une tentative d'ICSI est envisageable ou non. De plus, si une ICSI est pratiquée, on devra être en mesure de corrélérer les résultats de l'ICSI avec la quantification précise des paramètres spermatiques, la qualité embryonnaire semblant affectée dans les cas de cryptozoospermie très sévère [7].

Compte tenu de la variabilité intra individuelle possible des paramètres spermatiques de ces patients, une autoconservation de spermatozoïdes a été proposée à la grande majorité des patients de notre série, préalablement à toute tentative. Cette attitude se justifie d'autant plus que Kuczinski *et al.* [3] n'ont pas observé d'effet délétère de la congélation de spermatozoïdes pathologiques sur les taux de fécondation et de grossesse après ICSI.

En pratique les modalités de congélation dans les centres interrogés diffèrent principalement quant à la fraction congelée, selon qu'il s'agisse de sperme entier, de spermatozoïdes lavés et concentrés ou de spermatozoïdes sélectionnés par migration. Lorsqu'il s'agit de sperme entier, le nombre de paillettes est le plus important. Si l'on compare la congélation de spermatozoïdes lavés et concentrés à la congélation de spermatozoïdes migrés, le nombre moyen de paillettes conservées par patient est comparable. Toutefois, l'avantage de congeler des spermatozoïdes migrés [1] est double : i) faciliter la recherche des spermatozoïdes après décongélation et ii) obtenir des spermatozoïdes prêts à être injectés, débarrassés d'éventuels débris cellulaires qui nuiraient à la microinjection.

Lorsque les paramètres initiaux sont très altérés, notamment du fait d'une asthénospermie majeure avant congélation, il semble judicieux de s'assurer que les paillettes autoconservées seront utilisables, leur finalité étant de remédier à une éventuelle absence de spermatozoïdes injectables le jour de l'ICSI. Il est donc utile de procéder à un test de décongélation visant à évaluer la survie des spermatozoïdes. Dans notre série, 12 des 70 autoconservations réalisées se sont ainsi avérées inutilisables et parmi les 58 autoconservations jugées de qualité suffisante, 7 ont été utilisées pour les tentatives d'ICSI.

V. CONCLUSION

Cette étude réalisée dans six centres démontre l'intérêt de mettre en œuvre une technique de recherche approfondie de spermatozoïdes dans tous les cas d'azoospermie et d'oligospermie extrême. L'évaluation précise du nombre de spermatozoïdes mobiles disponibles permet d'apprécier la faisabilité de l'ICSI et peut-être d'éviter de recourir à la biopsie testiculaire. Dans notre expérience, l'autoconservation de ces spermatozoïdes pauvres semble être de rigueur, de préférence avec une

technique de microcongélation, afin de pallier à une éventuelle absence de spermatozoïde injectable le jour de la tentative.

RÉFÉRENCES

1. 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, 13 : 342-346.
2. HOURVITZ A., SHULMAN A., MADJAR I. et al : In vitro fertilization treatment for severe male factor: a comparative study of intracytoplasmic sperm injection with testicular sperm extraction and with spermatozoa from ejaculate. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1998, 15 : 386-389.
3. KUCZYNSKI W., DHONT M., GRYGORUK C. et al : The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa – a prospective randomised study. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 2019-2113.
4. RAZIEL A., FRIEDLER S., SCHACHTER M. et al : Influence of a short or long abstinence period on semen parameters in the ejaculate of patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 2001, 76 : 485-490.
5. RIVES N., SIBERT L., MAZURIER S. et al : Comment identifier le spermatozoïde vivant ? *Andrologie*, 2002, 12 : 332-341.
6. 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.
7. STRASSBURGER D., FRIEDLER S., RAZIEL A. et al : Very low sperm counts affect the result of intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2000, 17 : 431-436.
8. WHO World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press, 4th edition, 1999.

Communication au XX^e Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française, Orléans, 11-13 Décembre 2003.