Étude prospective comparant plusieurs techniques de congélation de faibles nombres de spermatozoïdes humains

C. Herbemont, S. Mnallah, M. Grynberg, C. Sifer

▶ **To cite this version:**

C. Herbemont, S. Mnallah, M. Grynberg, C. Sifer. Étude prospective comparant plusieurs techniques de congélation de faibles nombres de spermatozoïdes humains. Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie, 2019, 47, pp.797 - 801. 10.1016/j.gofs.2019.09.014 . hal-03489300

HAL Id: hal-03489300
https://hal.science/hal-03489300

Submitted on 20 Jul 2022

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

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

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Version of Record: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468718919303058
Manuscript_e146680702fb47973ca377c5bc6c7876

Titre : Etude prospective comparant plusieurs techniques de congélation de faibles nombres de spermatozoïdes humains.

Title: Prospective comparison of different techniques for cryopreservation of small numbers of human spermatozoa.

Titre court : Cryopréservation de spermatozoïdes individuels

Auteurs :

Charlène Herbemont[1,2], Sonia Mnallah[1], Michael Grynberg[3,4], Christophe Sifer[1,2,*]

[1] Service de Biologie de la Reproduction-CECOS, Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint-Denis, AP-HP, 93140 Bondy, France

[2] Université Paris XIII, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, 93000 Bobigny, France

[3] Service de Médecine de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint-Denis, AP-HP, 93140, Bondy, France

[4] Unité Inserm U1133, Université Paris-Diderot, 75013 Paris, France

***Auteur correspondant :** Christophe Sifer ; email : christophe.sifer@aphp.fr ; téléphone : +33148026880

© 2019 published by Elsevier. This manuscript is made available under the CC BY NC user license
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

1. Introduction

En Assistance Médicale à la Procréation (AMP), la congélation a été appliquée en premier lieu aux spermatozoïdes et à l'heure actuelle, ceux-ci restent les gamètes les plus faciles à congeler [1]. De nos jours, le protocole de congélation lente est toujours considéré comme le gold standard pour la cryopréservation des spermatozoïdes. Cependant, peu de modifications ont été apportées à cette procédure, et ce malgré l'introduction de l'ICSI en 1992. En effet, cette technique a considérablement amélioré la prise en charge des infertilités d'origine masculine [2], permettant désormais à ces hommes de concevoir avec leurs propres gamètes, évitant ou repoussant ainsi le recours au don de sperme. Par ailleurs, du fait de l'amélioration des techniques de prélèvement chirurgical de spermatozoïdes, il est dorénavant nécessaire de pouvoir congeler de manière efficace des spermatozoïdes en faible quantité.

L'un des inconvénients majeurs de la méthode de congélation conventionnelle est la difficulté à récupérer les spermatozoïdes après leur décongélation, soit parce qu'ils ne résistent pas à ce processus, soit parce qu'ils sont dilués dans des volumes de cryoprotecteurs trop importants (20 à 500 µL au total dans les paillettes utilisées habituellement). De plus, un temps de récupération trop long pourrait induire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène [3], mais également retarder la micro-injection des ovocytes et provoquer ainsi le phénomène de "aging", ou vieillissement

ovocytaire [4], ayant un impact négatif sur les résultats de l'ICSI. Par conséquent, la méthode de congélation lente peut être considérée comme critique lorsqu'un nombre faible de spermatozoïdes a été congelé. De ce fait, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin d'optimiser les techniques de congélation de spermatozoïdes en faible quantité.

La méthode de vitrification, quel que soit le support utilisé, est une technique dorénavant largement utilisée pour la conservation des embryons ou des ovocytes, mais n'est toujours pas appliquée en routine pour la conservation des spermatozoïdes. L'atout majeur de cette technique pour la congélation de petites quantités de spermatozoïdes est l'utilisation de micro-volumes de cryoprotecteurs, qui permettrait d'optimiser leur récupération après décongélation. En outre, le refroidissement ultra-rapide permet de prévenir la formation de cristaux de glace et par conséquent les dommages causés aux spermatozoïdes. Enfin, la vitrification revêt un caractère moins chronophage que la technique de congélation lente.

Plusieurs types de supports ont été testés afin de faciliter la récupération après décongélation à partir d'éjaculats pauvres en spermatozoïdes. Parmi les techniques rapportées, on compte notamment l'utilisation de zones pellucides vides dans lesquelles des spermatozoïdes étaient déposés individuellement, puis congelés [5–7]. Néanmoins, cette méthode présentait plusieurs difficultés techniques, principalement le fait d'utiliser un matériel biologique, dont la disponibilité en routine peut s'avérer aléatoire [8]. De plus, la préparation et la micro-manipulation de zones pellucides représentent des techniques laborieuses et chronophages. D'autres dispositifs potentiellement plus performants ont été testés, comme par exemple le Cryoloop (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) [9], des micro-gouttes déposées dans une boîte de pétri [10], l'utilisation

d'une pipette de micro-injection [8], ou encore le Cryotop (Kitazato, Shizuoka, Japan) [11]. Néanmoins, toutes ces techniques présentent leurs propres inconvénients [8] : les pipettes de micro-injection et les micro-gouttes sont très fragiles, difficiles à manipuler et à stocker dans l'azote liquide ; le Cryotop et le Cryoloop sont des systèmes ouverts, en contact direct avec l'azote liquide, ce qui représente un risque potentiel de contamination microbiologique [12]. D'autre part, la récupération des spermatozoïdes après décongélation peut se révéler complexe.

Plus récemment, Endo *et al.* [13] et Coetzee *et al.* [14] ont rapporté l'utilisation d'une nouvelle méthode de vitrification de spermatozoïdes individuels, utilisant le Cell Sleeper (Nipro, Japan). Ce support, disponible sur le marché et prêt à l'emploi, possède d'autres avantages techniques : c'est un système fermé, permettant ainsi de s'affranchir de tout risque de contamination, et facile à utiliser, puisqu'il ne nécessite qu'un nombre limité de manipulations.

Devant la rareté des études publiées à ce jour sur cette thématique, nous avons décidé d'évaluer la faisabilité de la technique de vitrification de faibles nombres de spermatozoïdes, en comparaison avec la technique de congélation conventionnelle. Pour ce faire, nous avons sélectionné deux supports différents pour la technique de vitrification, à savoir le Cell Sleeper et le capillaire utilisé pour la manipulation des ovocytes (Origio, Copenhagen, Denmark), dénommé « Stripper tip » dans la suite du manuscrit, ce dernier étant largement utilisé en routine dans les laboratoires d'AMP, mais jusqu'ici jamais testé pour cette application pratique.

2. Méthodes

2.1. Groupes d'étude

Cette étude prospective expérimentale a été menée entre juin et décembre 2016 dans le laboratoire d'AMP d'un Centre Hospitalier Universitaire, incluant un total de 409 spermatozoïdes mobiles. Au final, 37 échantillons, issus d'un donneur normozoosperme, ont été congelés, contenant environ 10 spermatozoïdes par support.

Deux supports ont été testés pour la technique de vitrification, à savoir le Cell Sleeper, prêt à l'emploi (n=12) (groupe 1, CS) et le Stripper tip (n=11) (groupe 2, ST), et ont été comparés à la méthode de congélation lente utilisant des paillettes standards (CryoBioSystem (CBS), France) (n=14) (groupe 3, SF).

Un donneur fertile a été inclus après signature d'un consentement éclairé autorisant l'utilisation de ses gamètes pour cette recherche. Cette étude de faisabilité ne nécessitait pas l'accord préalable d'un comité d'éthique.

2.2. Échantillons de sperme

Les échantillons de sperme éjaculé (n=7) étaient collectés par masturbation, à partir du même donneur fertile normozoosperme, après un délai d'abstinence sexuelle compris entre 3 et 5 jours. Les paramètres spermatiques étaient évalués selon les recommandations décrites dans le manuel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [15]. Les caractéristiques de chaque échantillon traité étaient comprises dans les normes décrites par l'OMS. La préparation du sperme était effectuée par migration sur un gradient de densité en 2 phases (45 et 90%) de PureSperm (Nidacon International, Sweden). Après 20 minutes de centrifugation à 300 g, le culot de spermatozoïdes était lavé dans du Ferticult HEPES (FH) media (Fertipro, Belgium), puis centrifugé à nouveau pendant 5 minutes à 600 g.

2.3. Sélection des spermatozoïdes

La sélection des spermatozoïdes à congeler était réalisée à l'aide d'un microscope inversé. Une boîte d'ICSI (ThermoScientific, Denmark) contenant une goutte de polyvinylpyrrolidone (PVP, Vitrolife, Sweden), inséminée avec une micro-goutte de la préparation de sperme, et recouverte d'huile minérale (Ovoil, Vitrolife, Sweden) était préparée préalablement. Pour chaque support, environ 10 spermatozoïdes mobiles progressifs étaient isolés à l'aide d'une pipette de micro-injection.

2.4. Méthode de vitrification en Cell Sleeper (CS : Groupe 1)

Le Cell Sleeper consiste en un petit plateau, de la taille d'un cryotube, facile à disposer sur la platine d'un microscope inversé. La procédure de congélation était réalisée comme précédemment décrite par Endo *et al*. [13] et Coetzee *et al.* [14]. Le plateau était placé au milieu d'une grande boîte de pétri. Une goutte de 3 µL d'un mélange 1:1 de FH et de cryoprotecteur contenant du glycérol et du sucrose, Spermfreeze (Fertipro, Belgium), non recouverte d'huile, était déposée extemporanément au centre du plateau. Les spermatozoïdes sélectionnés au préalable y étaient minutieusement transférés, puis le plateau était inséré et scellé dans un cryotube. Les Cell Sleepers étaient refroidis pendant 2 minutes dans les vapeurs d'azote (4 cm au-dessus du niveau d'azote), puis immergés et stockés dans l'azote liquide.

Les Cell Sleepers étaient décongelés pendant 1 minute à température ambiante. Le plateau était ensuite retiré du cryotube, puis placé sur une grande boîte de pétri. Une

goutte de PVP dilué au demi avec de l'eau stérile était déposée sur la Cell Sleeper, afin de réaliser un test de vitalité des spermatozoïdes (hypo-osmotic swelling (HOS) test) [16], le tout recouvert d'huile minérale. Enfin, l'ensemble était placé sur la platine du microscope inversé afin de rechercher les spermatozoïdes décongelés. Si nécessaire, la survie des spermatozoïdes retrouvés était déterminée à l'aide du test HOS, par observation de la courbure du flagelle dans le milieu hypo-osmotique pour les spermatozoïdes vivants.

2.5. Méthode de vitrification en Stripper tip (ST : Groupe 2)

Le Stripper tip est un capillaire destiné à la manipulation des ovocytes et embryons au cours des procédures de FIV/ICSI. Son utilisation pour la congélation des spermatozoïdes a été mise au point par notre équipe. Premièrement, une boîte de culture contenant une goutte de 3 µL de mélange 1:1 de FH et de Spermfreeze, sans huile, était préparée. Les spermatozoïdes mobiles préalablement sélectionnés étaient ensuite chargés dans les gouttes de Spermfreeze dilué, puis celles-ci étaient entièrement aspirées dans le Stripper tip. Le capillaire était enfin débranché du Stripper, inséré dans une paillette CBS, et cette dernière était soudée, puis congelée selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent.

Les Stripper tips étaient décongelés à température ambiante pendant 1 minute, puis la goutte contenant les spermatozoïdes réchauffés était refoulée dans une boîte d'ICSI. Comme précédemment, une goutte de PVP diluée au demi dans de l'eau stérile était également déposée dans la boîte, puis le tout était recouvert d'huile minérale.

2.6. Méthode de congélation lente (CL : Groupe 3)

Les spermatozoïdes mobiles sélectionnés étaient minutieusement transférés dans des gouttes de 10 µL de FH, sans huile. Par la suite, chaque goutte était diluée au demi dans du Spermfreeze. Enfin, ce mélange était aspiré dans une paillette haute sécurité (CBS, France), utilisée en routine pour les congélations de sperme, contenant un volume final de 20 µL. La technique de congélation lente a été appliquée selon la procédure décrite par Vutyavanich *et al.*' [17], à l'aide d'un congélateur programmable de type PLANER (CryoBioSystem, France). Les paillettes étaient insérées dans le congélateur et refroidies à une vitesse de -5°C par minute de 20°C à -8°C, puis à -10°C par minute de -8°C à -25°C, et à -25°C par minute jusqu'à -150°C. Enfin, elles étaient plongées puis stockées dans l'azote liquide à -196°C.

Les échantillons étaient réchauffés à température ambiante pendant 10 minutes. La totalité du volume des gouttes de spermatozoïdes décongelés était ensuite déposée et étalée en fine couche dans une boîte d'ICSI. Comme décrit plus haut, une goutte de PVP dilué au demi dans de l'eau stérile était également préparée et le tout recouvert d'huile minérale.

2.7. Évaluation post-décongélation

La durée de recherche des spermatozoïdes était limitée précisément à 20 minutes par dispositif décongelé. La mobilité de chaque spermatozoïde retrouvé était évaluée à l'aide d'un microscope inversé. Un test HOS était réalisé en cas de récupération de spermatozoïdes immobiles, afin de déterminer leur survie [16].

Pour chaque support, les paramètres répertoriés étaient : le temps moyen de récupération d'un spermatozoïde par dispositif (en minutes), le taux de récupération (n récupérés en 20 minutes/n congelés), la mobilité (n mobiles/n récupérés), le taux de

survie des spermatozoïdes récupérés après décongélation (n vivants post-décongélation/n récupérés).

Ces différents paramètres ont permis le calcul du temps théoriquement nécessaire pour récupérer un spermatozoïde vivant pour chaque type de support (= temps de récupération d'un spermatozoïde/taux de survie), qui reflète la durée théoriquement nécessaire pour injecter un ovocyte. Les cas pour lesquels aucun spermatozoïde vivant n'a été retrouvé ont été exclus de l'analyse statistique de ce paramètre.

Toutes ces données ont été collectées et comparées entre chaque groupe selon l'utilisation respectivement du Cell Sleeper, du Stripper tip et de la congélation lente.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student pour les variables quantitatives, et à l'aide du test du chi-2 pour les variables catégorielles, avec un seuil de significativité fixé à $p<0,05$. Les logiciels Stat view (Abacus Concepts, Berkeley, USA) et Statistical Analysis System Version 9.3 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ont été utilisés pour réaliser ces analyses statistiques.

3. Résultats

Le nombre moyen de spermatozoïdes congelés par support était comparable entre les groupes 1, 2 et 3 (11.08, 10.54, 11.43 respectivement, $p>0.05$).

Tous les résultats obtenus après décongélation sont rapportés dans le Tableau 1. Tout d'abord, la mobilité après décongélation était très diminuée à la fois dans les 3 groupes (13.0%, 13.2%, et 3.3% respectivement), alors que 100% des spermatozoïdes étaient mobiles avant la congélation. Le taux de récupération et le taux de survie (98.5% et 76.4%, respectivement) obtenus après vitrification en Cell Sleeper (groupe 1) étaient

significativement supérieurs aux résultats obtenus dans le groupe 3 (méthode de congélation lente) (37.5% [p<0.0001] et 26.6% [p<0.0001]). Par ailleurs, une tendance, non significative, à la supériorité de la mobilité dans les groupes 1 et 2, lorsque comparés au groupe 3, a été mise en évidence (p-value globale=0.05). En revanche, seul le taux de récupération était significativement supérieur dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 (vitrification en Stripper tip) (84.4% [p=0<0.05]). De plus, le temps de récupération d'un spermatozoïde était plus rapide dans le groupe 1 (1.3 minute) par rapport aux groupes 2 (2.2 minutes ; p<0.01) et 3 (6.6 minutes ; p<0.001).

La comparaison de ces paramètres entre les groupes 2 et 3 montrait aussi une supériorité de la technique de vitrification en Stripper tip par rapport à la méthode de congélation lente (Tableau 1).

Enfin, le temps théoriquement nécessaire pour injecter un ovocyte était significativement plus court après vitrification aussi bien en Cell Sleeper (1.7 minutes ; p<0.0001) qu'en Stripper tip (3.6 minutes ; p<0.0001), lorsque comparés à la méthode de congélation lente (14.7 minutes). En outre, une différence significative était obtenue entre le Cell Sleeper et le Stripper tip sur ce dernier paramètre (p<0.05).

4. Discussion

A notre connaissance, il s'agit de la première étude de faisabilité comparant trois méthodes de congélation de faibles nombres de spermatozoïdes : congélation lente *versus* (*vs.*) vitrification avec deux supports différents, le Cell Sleeper et le Stripper tip, et plus particulièrement la première étude soulignant la notion de vitesse de récupération des spermatozoïdes après décongélation.

En bref, ce travail montre la supériorité de la technique de vitrification, en termes de taux de survie et de vitesse de récupération des spermatozoïdes après décongélation. En effet, des résultats décevants ont été obtenus avec la méthode de congélation conventionnelle, concernant ces deux paramètres (taux de survie = 26.6% ; taux de récupération des spermatozoïdes = 37.5%). Ces observations peuvent s'expliquer d'une part par la capacité des spermatozoïdes à adhérer au plastique des paillettes, et d'autre part par les grands volumes utilisés au cours du protocole de congélation lente, rendant la recherche des spermatozoïdes beaucoup plus fastidieuse [18]. Ainsi, les techniques conventionnelles de cryopréservation apparaissent clairement inadaptées pour la conservation des spermatozoïdes en faible nombre, en cas de facteur d'infertilité masculine sévère.

L'un des avantages de la vitrification est le fait de limiter la formation de cristaux de glace, potentiellement délétères, lors de la descente en température. Par ailleurs, l'utilisation de micro-volumes (3 µL *vs.* ≥ 20 µL dans des paillettes standards) représente un autre point fort de cette technique par rapport à la congélation lente, facilitant ainsi la récupération des spermatozoïdes. Notre étude souligne ce point, puisque les taux de récupération et temps de récupération d'un spermatozoïde étaient respectivement plus élevés et plus rapides avec les deux techniques de vitrification par rapport à la congélation lente. D'un point de vue pratique, la vitrification devrait considérablement réduire le temps nécessaire pour retrouver des spermatozoïdes vivants à micro-injecter. Plus précisément, cette stratégie pourrait s'appliquer à certaines situations, comme les cryptozoospermies ou le cas des biopsies testiculaires, dans lesquelles il faut parfois plusieurs heures pour trouver le nombre de spermatozoïdes nécessaires pour réaliser

l'ICSI, ou parfois même vitrifier les ovocytes, faute d'un nombre suffisant de spermatozoïdes.

En effet, que ce soit avec le Cell Sleeper ou le Stripper tip, tout le processus de sélection individuelle des spermatozoïdes, sur la base de leur mobilité et de leur morphologie, peut être réalisé en amont de la congélation. Dès lors qu'un nombre suffisant de spermatozoïdes a été congelé, la stimulation ovarienne de la conjointe peut ainsi être programmée. De cette manière, le jour de la ponction, la décongélation et la recherche de spermatozoïdes vivants peuvent être réalisées rapidement, limitant par conséquent le risque de vieillissement ovocytaire qui pourrait compromettre les résultats de l'ICSI. En effet, l'ovocyte mature dispose d'un laps de temps très court permettant une fécondation optimale [4]. Au-delà, se produit le phénomène de vieillissement ovocytaire (ou aging), qui affecte les taux de fécondation ainsi que le développement embryonnaire [19,20].

En cas d'oligozoospermie sévère ou de cryptozoospermie, une méthode de congélation idéale devrait permettre de conserver plusieurs aliquots contenant quelques spermatozoïdes chacun (environ une dizaine, voire moins), pour ne décongeler que le nombre souhaité selon le nombre d'ovocytes matures ponctionnés le jour de l'ICSI. Pour ce faire, plusieurs supports ont été évalués auparavant, avec néanmoins un succès limité [8]. Tenant compte des diverses difficultés techniques engendrées lors de la vitrification de spermatozoïdes en faible nombre (fragilité du support, nombre de manipulations nécessaires, difficultés de stockage, …), nous avons décidé de tester le Cell Sleeper et le Stripper tip. D'une part, le Cell Sleeper est un système fermé, facile à utiliser, nécessitant un nombre limité de manipulations, ce qui réduit en théorie le risque de perdre des

spermatozoïdes durant les processus de congélation-décongélation. D'autre part, le Stripper tip est disponible facilement, puisqu'utilisé au quotidien dans les laboratoires d'AMP, facile à stocker dans des paillettes CBS, et constitue ainsi un dispositif fait-maison qui n'a jusqu'ici jamais été testé pour cet usage.

Dans notre étude, dans le groupe de spermatozoïdes congelés en Cell Sleeper, le taux de récupération et le taux de survie obtenus étaient très élevés (98.5% et 76.4%, respectivement). De plus, avec ce dispositif, la quasi-totalité des spermatozoïdes était récupérée rapidement (1.3 minute/spermatozoïde). L'excellent taux de récupération rapporté est en accord avec les résultats publiés précédemment par Endo *et al.* (83 %) [13] et Coetzee *et al.* (94%) [14], utilisant également le Cell Sleeper. Par ailleurs, ces données sont similaires aux résultats d'une étude récente de Berkovitz *et al*., qui utilisaient une méthode comparable, mais un support différent, le Sperm Vitrification Device (SpermVD) (96%) [21]. Ainsi, ces résultats témoignent de la rapidité de la courbe d'apprentissage de cette technique, et de la facilité d'utilisation de ce dispositif en routine. L'utilisation du Stripper tip montrait également des résultats satisfaisants, avec des taux de récupération et de survie s'élevant à respectivement 84.4% et 64.2%. Dans la mesure où il s'agit du premier essai de vitrification avec ce support, aucune donnée comparative n'est disponible à ce jour. Néanmoins, nos observations suggèrent une possibilité d'utilisation de ce support pour la congélation des spermatozoïdes en pratique quotidienne, en l'absence d'autre support disponible au laboratoire.

Le déclin de la mobilité après la congélation reste un sujet controversé. Une méta-analyse récente, rapportant les données de 13 études randomisées comparant vitrification et congélation conventionnelle, majoritairement sur des spermes normaux,

était en faveur d'une supériorité de la vitrification en termes de mobilité totale et progressive post-décongélation (Li et al 2019) [22]. En revanche, dans notre étude, seule une faible proportion de spermatozoïdes mobiles a été retrouvée après le processus de congélation-décongélation, quelle que soit la méthode utilisée (13.0%, 13.2% and 3.3%, respectivement dans les groupes 1, 2 et 3). Bien que ce phénomène ait déjà été décrit précédemment [23], les mécanismes expliquant cet impact sur la mobilité sont toujours des points à éclaircir. Certains auteurs ont notamment incriminé la formation de cristaux de glace au cours de la congélation lente, des dommages osmotiques, ou encore des dommages physico-chimiques sur les membranes spermatiques [24,25].

Dans le champ des infertilités masculines sévères, les résultats publiés en termes de mobilité après décongélation sont également très hétérogènes. Sanchez *et al.* [26] ont rapporté une mobilité supérieure à 75% après vitrification, ce qui fait figure d'exception puisqu'aucune autre équipe n'a publié de tels résultats jusqu'ici. En effet, Endo *et al.* ont obtenu 29 et 44% de mobilité après congélation en Cell Sleeper et en Cryotop, respectivement [13]. Coetzee *et al.* ont quant à eux publié des taux variant de 0 à 100% par Cell Sleeper, avec une moyenne de 55.8% [14], tandis que Berkovitz *et al.* ont décrit une mobilité résiduelle de 33% après vitrification en SpermVD [21]. Cependant, cette perte de mobilité après décongélation ne semble pas altérer les résultats de l'ICSI. En effet, les taux de fécondation, la qualité embryonnaire et les taux de grossesse se sont révélés similaires après micro-injection de spermatozoïdes mobiles ou non [14]. En outre, il a été montré que les résultats obtenus en ICSI avec des spermatozoïdes frais ou congelés étaient comparables, et ce malgré l'impact de la congélation sur la mobilité [27]. En effet, bien que la mobilité soit affectée, il est probable que le procédé de vitrification n'altère pas l'intégrité de l'ADN spermatique [28]. Quoiqu'il en soit, l'un des

points forts de notre étude de faisabilité est le recours au test HOS pour déterminer la survie des spermatozoïdes immobiles. De plus, notre choix d'utiliser des échantillons de sperme provenant du même donneur normozoosperme nous semble également être un point fort, puisque dans le cas contraire (plusieurs donneurs, ou sperme de qualité altérée), nous n'aurions pas pu exclure un biais potentiellement lié à une variabilité de résistance des spermatozoïdes au processus de congélation-décongélation. Néanmoins, ces techniques devront également être validées sur des spermes candidats à ces méthodes de cryopréservation (cryptozoospermies, spermatozoïdes testiculaires ou épididymaires). Nos résultats, en regard des issues biologiques et cliniques intéressantes rapportées par Endo *et al.* [13] et Coetzee *et al.* [14], renforcent le fait que, malgré la perte de mobilité, la survie des spermatozoïdes reste satisfaisante, et leur potentiel fécondant des spermatozoïdes ne semble pas altéré par la méthode de vitrification. Par conséquent, l'efficience de la technique de vitrification de faibles nombres de spermatozoïdes en Cell Sleeper ou en Stripper tip doit être confirmée en pratique clinique. Cette technique pourrait constituer une option innovante et prometteuse pour la cryopréservation de spermatozoïdes, non seulement pour la prise en charge des infertilités masculines sévères, mais aussi dans le champ du don de sperme, par exemple dans le cas de phénotypes rares.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude suggère la possibilité d'alternatives efficaces pour la congélation de spermatozoïdes humains en faible nombre. La vitrification, quel que soit le support utilisé, pourrait permettre de récupérer rapidement les spermatozoïdes après décongélation, et ainsi de réaliser l'ICSI sans délai, sans risquer la survenue du

phénomène de vieillissement ovocytaire. Néanmoins, ces données encourageantes devront être confirmées en pratique, et des essais contrôlés seront nécessaires afin de s'assurer de l'innocuité et de l'efficience de l'utilisation de spermatozoïdes vitrifiés, en termes d'issues biologiques et cliniques.

Références

[1] Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature 1953;172:767–8.

[2] Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet (London, England) 1992;340:17–8.

[3] Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. Hum Reprod Update 2004;10:387–99.

[4] Dozortsev D, Nagy P, Abdelmassih S, Oliveira F, Brasil A, Abdelmassih V, et al. The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. Fertil Steril 2004;82:1492–6.

[5] Cohen J, Garrisi GJ. Micromanipulation of gametes and embryos: Cryopreservation of a single human spermatozoon within an isolated zona pellucida. Hum Reprod Update 1997;3:453.

[6] Hsieh Y, Tsai H, Chang C, Lo H. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. Fertil Steril 2000;73:694–8.

[7] Hsieh YY, Tsai HD, Chang CC, Lo HY. Sperm cryopreservation with empty human or mouse zona pellucidae. A comparison. J Reprod Med 2000;45:383–6.

[8] AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, Sabanegh E, Desai N. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. Hum Reprod Update 2008;15:153–64.

[9] Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, Ohl DA, Smith GD. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Hum Reprod 2003;18:788–95.

[10] Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohí J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Mol Cell Endocrinol 2000;169:15–9.

[11] Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2012;24:301–7.

[12] Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. Hum Reprod 2009;24:2457–67.

[13] Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, Motoyama H, Funahashi H. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. Fertil Steril 2012;98:1423–7.

[14] Coetzee K, Ozgur K, Berkkanoglu M, Bulut H, Isikli A. Reliable single sperm

cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia management. Andrologia 2016;48:203–10.
[15] WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2010.
[16] Takahashi K, Uchida A, Kitao M. Hypoosmotic swelling test of sperm. Arch Androl 1990;25:225–42.
[17] Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. Fertil Steril 2010;93:1921–8.
[18] Bouamama N, Briot P, Testart J. [Comparison of two methods of cryoconservation of sperm when in very small numbers]. Gynecol Obstet Fertil 2003;31:132–5.
[19] Miao Y-L, Kikuchi K, Sun Q-Y, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. Hum Reprod Update 2009;15:573–85.
[20] Miao Y, Sun Q-Y, Zhang X, Zhao J-G, Zhao M-T, Spate L, et al. Centrosome abnormalities during porcine oocyte aging. Environ Mol Mutagen 2009;50:666–71.
[21] Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. Hum Reprod 2018;33:1975–83.
[22] Li Y-X, Zhou L, Lv M-Q, Ge P, Liu Y-C,Zhou D-X. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2019;233:84-92.
[23] Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction 2007;134:3–17.
[24] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J Androl 1992;13:232–41.
[25] Mossad H, Morshedi M, Toner JP, Oehninger S. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. Arch Androl 1994;33:51–7.
[26] Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J V., Isachenko V, Isachenko E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at −86 °C. Andrologia 2012;44:433–5.
[27] Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens CA, Ryan IP, Schriock ED, et al. A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. Hum Reprod 2001;16:495–9.
[28] Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. Hum Reprod 2007;23:233–9.