

Année 2023

N°: MS084/23

Mémoire de fin d'études

Pour L'obtention du Diplôme National de Spécialité
en : **GYNÉCOLOGIE – OBSTÉTRIQUE**

MACS OU TECHNIQUE DE SÉLECTION IMMUNO- MAGNETIQUE DES SPERMATOZOÏDES : REVUE SYSTEMATIQUE DE LA LITTERATURE

Présenté par :

Docteur SLAOUI Aziz

Sous la direction du :

Professeur BAIDADA Abdelaziz

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

- **MACS:** Magnetic- Activated Cell Sorting : technique de sélection immuno-magnétique des spermatozoïdes
- **ART:** Assisted Reproductive Techniques : technique de procréation médicalement assistée
- **IVF:** In Vitro Fertilization : Fécondation in vitro
- **ICSI / IICS:** Intracytoplasmic Sperm Injection : Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes
- **DGC :** Density Gradient Centrifugation : Centrifugation à Gradient de Densité
- **MACSIS :** Magnetic Activated Cell Sorting before Injection of the sperm
- **PICSI:** Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection
- **PGTA-A:** Preimplantation Genetic Testing for Aneuploïdies : Test génétique préimplantatoire pour les aneuploïdies
- **IUI :** Insémination intra-utérine

Liste des illustrations

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau récapitulatif des données des études incluses dans notre analyse 23

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photographie prise pendant le tri MACS de spermatozoïdes non apoptotiques.....	11
Figure 2: Schématisation de la colonne de séparation magnétique MiniMACS.....	12
Figure 2: Schématisation des spermatozoïdes traversant la colonne avec l'annexine V.....	13
Figure 4: Stratégie de recherche.....	20

Sommaire

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
II. RAPPEL	5
1. DEVELOPPEMENT DE LA MACS.....	6
2. TECHNIQUE DE LA MACS	9
3. INDICATIONS DE LA MACS	14
III. METHODES	16
IV. RESULTATS	19
V. DISCUSSION	30
VI. CONCLUSION	35
VII. RESUMES	37
VIII. REFERENCES	41

I. Introduction

Depuis l'avènement de la fécondation in vitro (FIV) en 1978, les techniques de procréation assistée n'ont cessé d'évoluer pour améliorer les chances de succès de cette méthode de traitement de l'infertilité. Parmi ces avancées, on peut citer la sélection des spermatozoïdes qui est une étape cruciale pour améliorer la qualité de l'embryon et donc les taux de réussite de la FIV.

Les techniques classiques de préparation des spermatozoïdes, telles que la méthode de lavage simple ou la centrifugation, permettent de séparer les spermatozoïdes des autres composants du sperme, tels que les cellules immunitaires, les débris cellulaires ou les bactéries. Cependant, ces techniques ne permettent pas de distinguer les spermatozoïdes sains des spermatozoïdes anormaux ou défectueux, ce qui peut altérer la qualité de l'embryon et réduire les chances de succès de la FIV.

Les premières techniques de sélection des spermatozoïdes, telles que la centrifugation et la swim-up, ont été développées dans les années 1980. Cependant, ces méthodes ont leurs limites en termes de pureté de la population de spermatozoïdes obtenue et de leur capacité à sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles et les plus sains. Depuis lors, de nouvelles méthodes ont été introduites pour améliorer l'efficacité de la sélection. Parmi ces nouvelles techniques, la MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) est devenue une méthode de sélection immuno-magnétique des spermatozoïdes de plus en plus utilisée.

La MACS est une technique qui utilise des anticorps spécifiques pour marquer les spermatozoïdes présentant des caractéristiques positives, telles que la morphologie normale ou la membrane plasmique intacte. Ces spermatozoïdes marqués sont ensuite séparés des autres spermatozoïdes grâce à l'application d'un champ magnétique.

La MACS est particulièrement indiquée chez les couples présentant des problèmes de fertilité masculine, tels que les anomalies de la tête ou de la queue du spermatozoïde, ou une faible concentration de spermatozoïdes mobiles.

Cependant, l'utilisation de la MACS nécessite un plateau technique spécifique et une expertise spécialisée. Les laboratoires de fécondation in vitro doivent être équipés d'un système de tri magnétique et de réactifs spécifiques pour mettre en œuvre la MACS. En outre, la technique exige des connaissances spécifiques en biologie moléculaire et en cytologie pour la manipulation des spermatozoïdes et des anticorps magnétiques.

Au fil des années, la technique de la MACS a connu de nombreuses améliorations techniques. Les anticorps et les billes magnétiques utilisées pour la MACS ont été optimisés pour améliorer la spécificité et la sensibilité de la technique. La MACS est aujourd'hui largement utilisée dans les traitements de procréation assistée pour améliorer les résultats de la fécondation in vitro.

Cette technique a fait l'objet de nombreuses études cliniques et de recherches scientifiques qui ont démontré son efficacité dans l'amélioration des résultats de la fécondation in vitro. Une revue systématique de la littérature sur l'utilisation de la MACS dans la sélection des spermatozoïdes pour la fécondation in vitro permettrait de synthétiser les résultats de ces études et de fournir une analyse approfondie des données existantes. Cette revue pourrait également contribuer à

clarifier les indications pour l'utilisation de la MACS dans les traitements de procréation assistée et à identifier les éventuelles limites de la technique.

Ainsi, l'objectif de ce projet de mémoire est de donc réaliser cette revue systématique de la littérature pour déterminer de manière précise si la MACS améliore réellement la fécondation in vitro. Cette revue nous permettra d'évaluer l'efficacité de la MACS en termes de taux de fécondation, de taux de grossesse, de taux de naissance et de qualité embryonnaire. Nous espérons que les résultats de cette étude pourront offrir des pistes de réflexion pour l'amélioration des techniques de sélection des spermatozoïdes et ainsi offrir de nouvelles perspectives de traitement pour les couples qui souffrent de problèmes de fertilité.

II. Rappel

1. DEVELOPPEMENT DE LA MACS

L'histoire de la procréation médicalement assistée est un domaine qui remonte aux années 1950, lorsque les premiers travaux de Robert Edwards et Patrick Steptoe ont été réalisés. Cependant, il a fallu attendre jusqu'en 1978 pour que le premier bébé conçu par fécondation in vitro (FIV), Louise Brown, soit né. Depuis lors, la FIV est devenue une technique courante pour les couples confrontés à des difficultés pour concevoir un enfant.

La FIV est une technique de procréation médicalement assistée utilisée pour traiter l'infertilité, un trouble qui touche environ 15 % de la population. La FIV nécessite une hyperstimulation ovarienne contrôlée, un prélèvement chirurgical d'ovocytes, une fécondation in vitro et un transfert d'embryons. L'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) est utilisée pour traiter l'infertilité masculine, en cas de paramètres spermatiques médiocres, de prélèvement chirurgical de spermatozoïdes ou d'échec de la FIV standard.

Malgré les progrès technologiques, les taux de grossesse restent relativement faibles, incitant les chercheurs à rechercher d'autres causes modifiables, telles que le dysfonctionnement des spermatozoïdes. La qualité des spermatozoïdes qui fécondent l'ovocyte est susceptible d'influencer le développement de l'embryon et l'issue de la grossesse. Les spermatozoïdes les plus appropriés pour la procréation assistée devraient être viables, matures, avoir une intégrité élevée de l'ADN et être structurellement sains.

La préparation et la sélection des spermatozoïdes se limitent généralement au lavage du sperme, à la centrifugation en gradient de densité et aux techniques de swim-up. Des techniques plus avancées de sélection des spermatozoïdes basées sur d'autres caractéristiques pourraient permettre une sélection plus poussée des spermatozoïdes les plus appropriés.

Les techniques avancées de sélection des spermatozoïdes ont été développées pour améliorer les résultats de la procréation assistée dans certains cas cliniques. Ces techniques peuvent être classées en trois catégories principales. La première catégorie est la sélection par charge de surface, qui comprend la sélection électrophorétique des spermatozoïdes et le potentiel Zêta des spermatozoïdes. La deuxième catégorie est la sélection des spermatozoïdes non apoptotiques, qui est réalisée en utilisant le tri cellulaire activé par magnétisme (MACS) et les colonnes de séparation en laine de verre. La troisième catégorie est la liaison avec l'acide hyaluronique, qui indique la maturité des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes matures se lient à l'acide hyaluronique, ce qui leur donne une meilleure chance d'atteindre l'ovocyte pour la fécondation.

La MACS est donc une technique sophistiquée de sélection des spermatozoïdes qui utilise des particules magnétiques recouvertes d'anticorps pour isoler les spermatozoïdes présentant les meilleures caractéristiques. Cette méthode permet de sélectionner les spermatozoïdes présentant une faible expression d'anticorps anti-spermatozoïdes, pour maximiser les chances de réussite de la fécondation in vitro.

L'intérêt de la MACS réside dans sa capacité à sélectionner les spermatozoïdes les plus aptes à féconder l'ovule, en utilisant des critères objectifs tels que leur motilité, leur morphologie ou leur ADN. Cette technique est particulièrement utile pour les couples qui ont déjà subi plusieurs échecs de FIV ou qui ont des problèmes de fertilité liés à une faible qualité du sperme.

De plus, la MACS peut également être utilisée pour les traitements de procréation assistée impliquant des donneurs de sperme, en permettant une sélection plus précise des spermatozoïdes en fonction de leur compatibilité immunologique.

Au fil des années, la technique de la MACS a connu un grand succès et est aujourd'hui couramment utilisée dans les traitements de procréation assistée.

2. TECHNIQUE DE LA MACS

La technique de sélection immuno-magnétique des spermatozoïdes, également connue sous le nom de MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), est une méthode de triage des spermatozoïdes qui se base sur la différence de densité et la liaison avec des anticorps. Cette technique permet de sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité et d'augmenter ainsi les chances de réussite de la fécondation in vitro (FIV).

Les différentes étapes de la MACS sont les suivantes :

1. Préparation de l'échantillon de sperme : Avant d'effectuer la sélection des spermatozoïdes, l'échantillon de sperme est préparé afin de se débarrasser des impuretés et des débris cellulaires. Le sperme est centrifugé à une vitesse spécifique pour séparer les spermatozoïdes des autres éléments présents dans l'échantillon.
2. Couplage des anticorps magnétiques : Des anticorps spécifiques sont utilisés pour cibler les spermatozoïdes de meilleure qualité. Ces anticorps sont préalablement fixés à des billes magnétiques pour faciliter leur récupération ultérieure. Les anticorps utilisés dans la MACS sont généralement dirigés contre les récepteurs de la membrane spermatique ou contre les molécules présentes à la surface des spermatozoïdes.
3. Séparation magnétique : Les billes magnétiques couplées aux anticorps sont ajoutées à l'échantillon de sperme. Les spermatozoïdes ciblés par les anticorps se lient aux billes magnétiques. Le mélange est ensuite placé dans un champ magnétique, ce qui permet de récupérer les spermatozoïdes liés aux billes magnétiques et donc, de les séparer des autres spermatozoïdes.

4. Lavage des spermatozoïdes : Après la séparation magnétique, les spermatozoïdes liés aux billes magnétiques sont récupérés. Ces spermatozoïdes sont ensuite lavés plusieurs fois afin d'éliminer tout résidu de solution et d'anticorps.
5. Analyse de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés : Une fois les spermatozoïdes sélectionnés par la MACS, leur qualité est évaluée selon plusieurs critères tels que la morphologie, la motilité et la concentration. Cette analyse permet de s'assurer de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés avant leur utilisation dans la FIV.

La technique MACS requiert l'utilisation d'outils spécifiques pour chaque étape du processus. Tout d'abord, il faut une centrifugeuse pour préparer l'échantillon de sperme. Ensuite, il faut des billes magnétiques couplées aux anticorps spécifiques pour la séparation magnétique. Cette étape nécessite également un appareil pour créer un champ magnétique. Enfin, l'analyse de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés nécessite l'utilisation de microscopes, de compteurs de spermatozoïdes et d'autres équipements de laboratoire spécialisés.

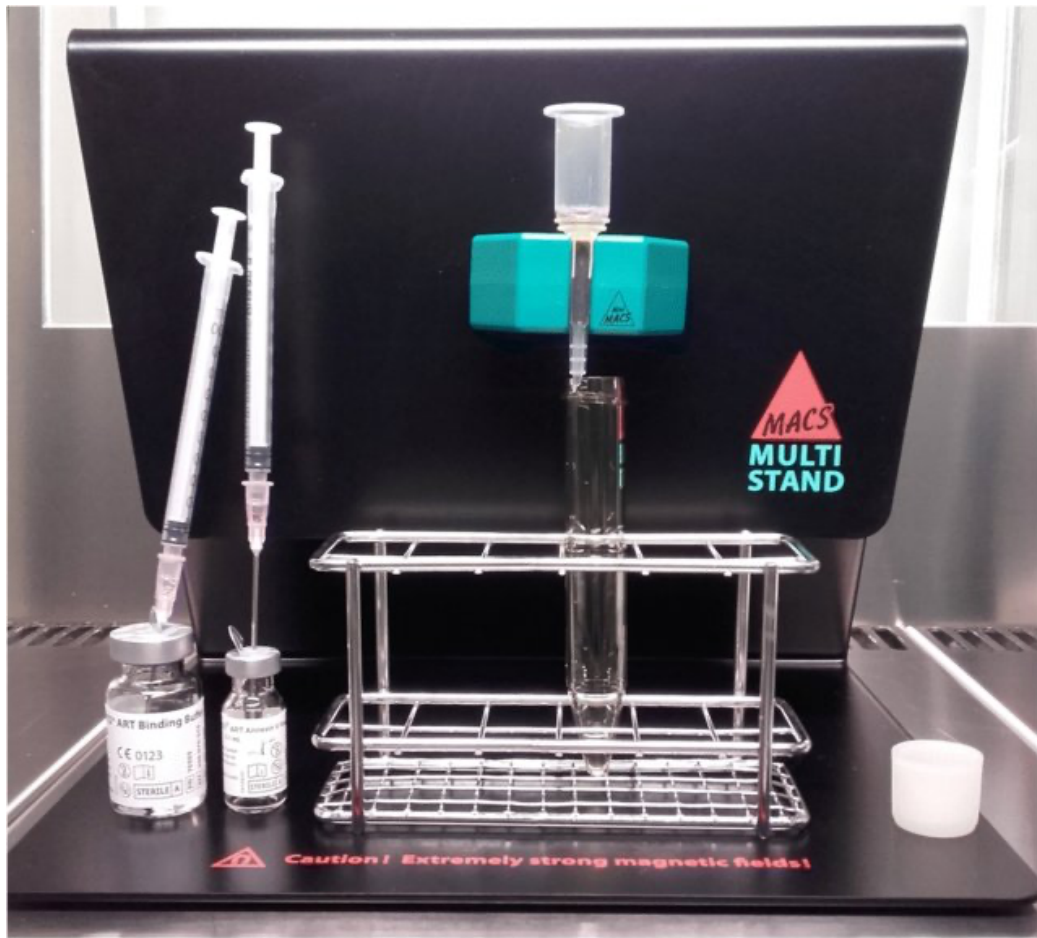


Figure 1: Photographie prise pendant le tri MACS de spermatozoïdes non apoptotiques [1]

Comme on peut le voir sur la photographie (Figure 1), la colonne MACS ART MS est placée dans le MiniMACS Separator, qui est attaché au MACS MultiStand. Après avoir lavé la colonne avec le MACS ART Binding Buffer (plus grand flacon à gauche sur le MultiStand), l'échantillon de spermatozoïdes mélangé au MACS ART Annexin V Reagent (plus petit flacon à droite sur le MultiStand) est appliqué dans la colonne et les spermatozoïdes non marqués (non apoptotiques) qui passent à travers la colonne, sont collectés dans un tube à centrifuger placé sous la colonne. Cette colonne est alors lavée une fois avec le MACS ART Binding Buffer pour collecter tous les spermatozoïdes non marqués. Les spermatozoïdes non marqués sont ensuite lavés avec un milieu de préparation des spermatozoïdes et préparés pour l'ICSI.

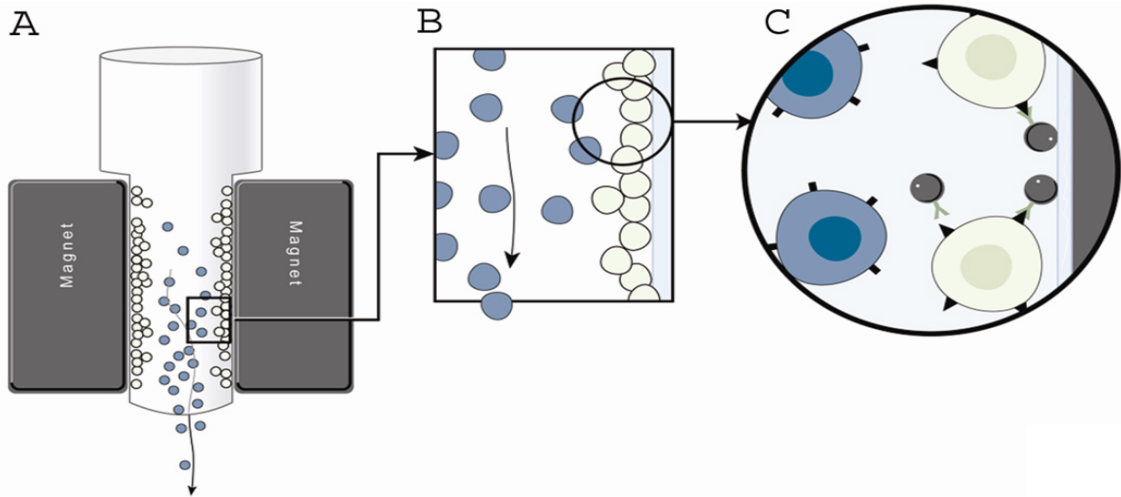


Figure 2: Schématisation de la colonne de séparation magnétique MiniMACS [11]

- A. Le support solide est constitué de sphères submillimétriques très serrées en alliage d'acier doux. Un champ magnétique externe magnétise le support solide, ce qui attire les cellules marquées magnétiquement à partir d'un mélange appliqué à la colonne.
- B. Une fine coupe du support solide montre les espaces interstitiels disponibles pour l'écoulement du mélange de cellules.
- C. Les cellules non marquées circulent librement dans la colonne, tandis que les cellules marquées magnétiquement sont retenues à l'intérieur de la colonne et peuvent être récupérées en retirant la colonne du champ magnétique, puis en procédant à l'éluion.

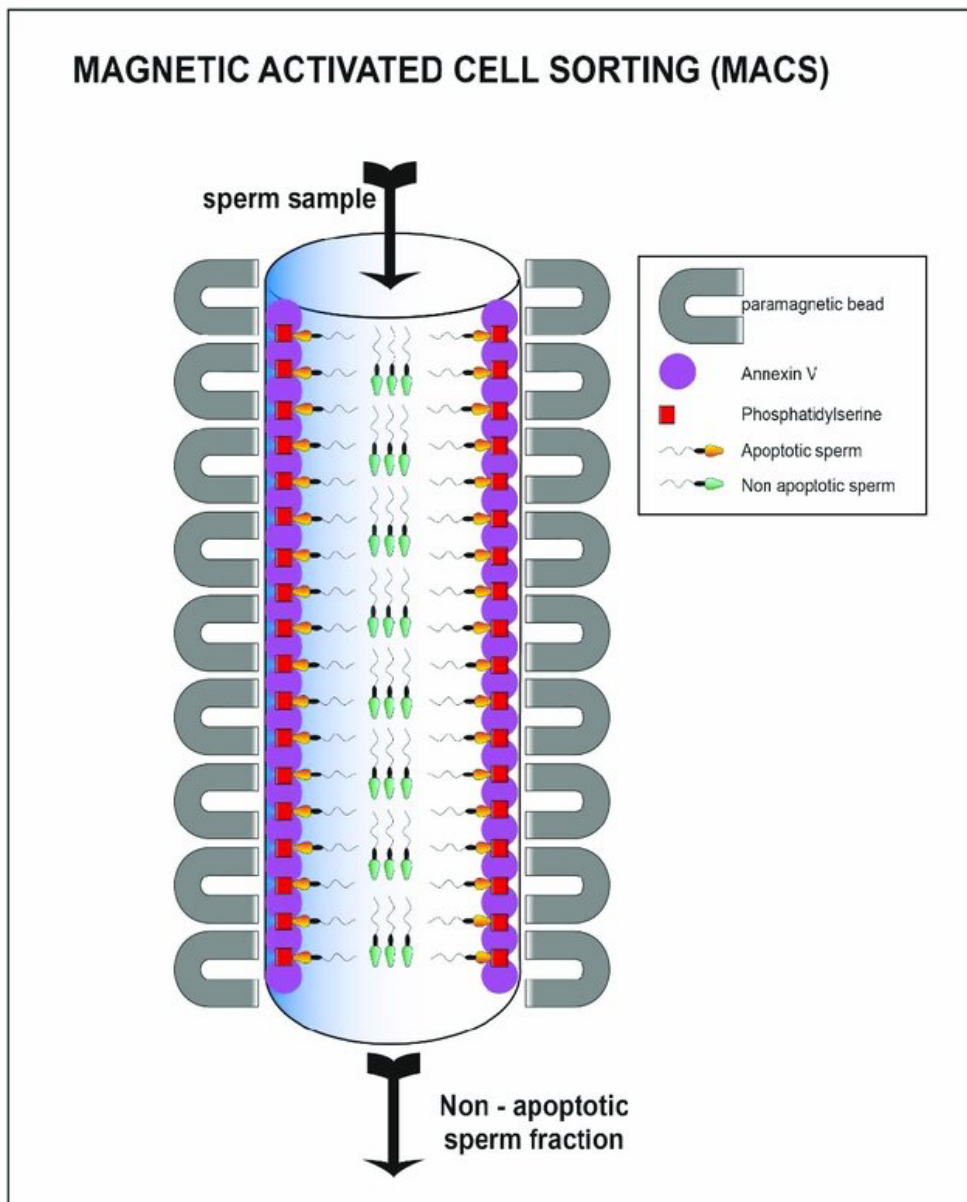


Figure 3: Schématisation des spermatozoïdes traversant la colonne avec l'annexine V [12]

Les spermatozoïdes capables de traverser la colonne représentent les spermatozoïdes viables (têtes vertes) tandis que la fraction apoptotique reste piégée à l'intérieur de la colonne (têtes jaunes).

3. INDICATIONS DE LA MACS

Les indications pour l'utilisation de la MACS sont variées et dépendent de nombreux facteurs, notamment les antécédents médicaux du couple, le type de traitement de PMA envisagé et les caractéristiques des échantillons de sperme. Ses principales indications sont les suivantes :

- Infertilité masculine idiopathique : la MACS est particulièrement utile pour les hommes présentant une infertilité idiopathique, c'est-à-dire une infertilité dont la cause est inconnue. Elle permet de sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité et d'améliorer les chances de réussite de la fécondation in vitro.
- Antécédents de fausses couches : lorsque la cause des fausses couches à répétition est liée à la qualité des spermatozoïdes, la MACS peut être utilisée pour améliorer les chances de succès de la fécondation in vitro et prévenir les fausses couches.
- Présence de spermatozoïdes anormaux : si les spermatozoïdes sont anormaux ou présentent des anomalies chromosomiques, la MACS peut être utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité et améliorer les chances de réussite de la fécondation in vitro.
- Âge avancé de l'homme : chez les hommes âgés de plus de 40 ans, la qualité des spermatozoïdes peut être altérée. La MACS peut être utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité et améliorer les chances de réussite de la fécondation in vitro.

- Pathologies associées à la fragmentation de l'ADN spermatique : la fragmentation de l'ADN spermatique peut être associée à des pathologies telles que l'endométriose ou la varicocèle. La MACS peut être utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité et améliorer les chances de réussite de la fécondation in vitro.

En résumé, la MACS est une technique de sélection des spermatozoïdes qui peut être utilisée pour améliorer les chances de réussite de la fécondation in vitro dans diverses situations d'infertilité masculine.

III. Méthodes

Pour cette revue systématique de la littérature, une recherche exhaustive d'articles pertinents a été effectuée sur les principales bases de données en médecine, notamment PubMed, Embase et Cochrane Library, en utilisant une combinaison de mots clés pertinents en anglais et en français liés à la technique de sélection immuno-magnétique des spermatozoïdes (MACS). Les mots-clés utilisés incluaient "Magnetic Activated Cell Sorting", "MACS", "immunomagnetic selection", "spermatozoa", "sperm selection", "fertility", "assisted reproductive technology", "IVF", "ICSI" et "male infertility". La recherche a été limitée aux articles publiés entre janvier 2000 et décembre 2022, avec des études sur des humains, des essais cliniques randomisés et contrôlés, des essais non randomisés et des études observationnelles incluses.

Les critères d'inclusion étaient les études qui examinaient l'utilisation de la technique MACS dans les traitements de procréation médicalement assistée (PMA), y compris l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation in vitro (FIV) et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Les critères d'exclusion comprenaient les études sur des animaux, les études de cas uniques, les études avec des données manquantes ou des résultats incomplets, et les études qui n'étaient pas en anglais ou en français.

Après avoir effectué une recherche exhaustive sur les bases de données, les articles ont été triés en fonction de leur pertinence en utilisant les critères d'inclusion et d'exclusion prédéfinis. Les résumés et les titres ont été examinés pour déterminer leur pertinence, puis les articles sélectionnés ont été lus en entier pour confirmer leur éligibilité.

Les résultats de cette revue systématique de la littérature ont été analysés en utilisant une approche quantitative et qualitative pour déterminer la qualité et la pertinence des études sélectionnées. Les résultats de chaque étude ont été synthétisés pour déterminer les conclusions générales sur l'efficacité de la technique MACS dans les traitements de PMA.

IV. Résultats

La recherche initiale a identifié 23 références. 4 se sont avérés être des duplicatas et ont donc été exclus. Sur la base des intitulés et des abstracts, 3 ont été exclus. Après lecture intégrale des publications restantes, au final 10 études ont été incluses dans notre analyse (**Figure 4**).

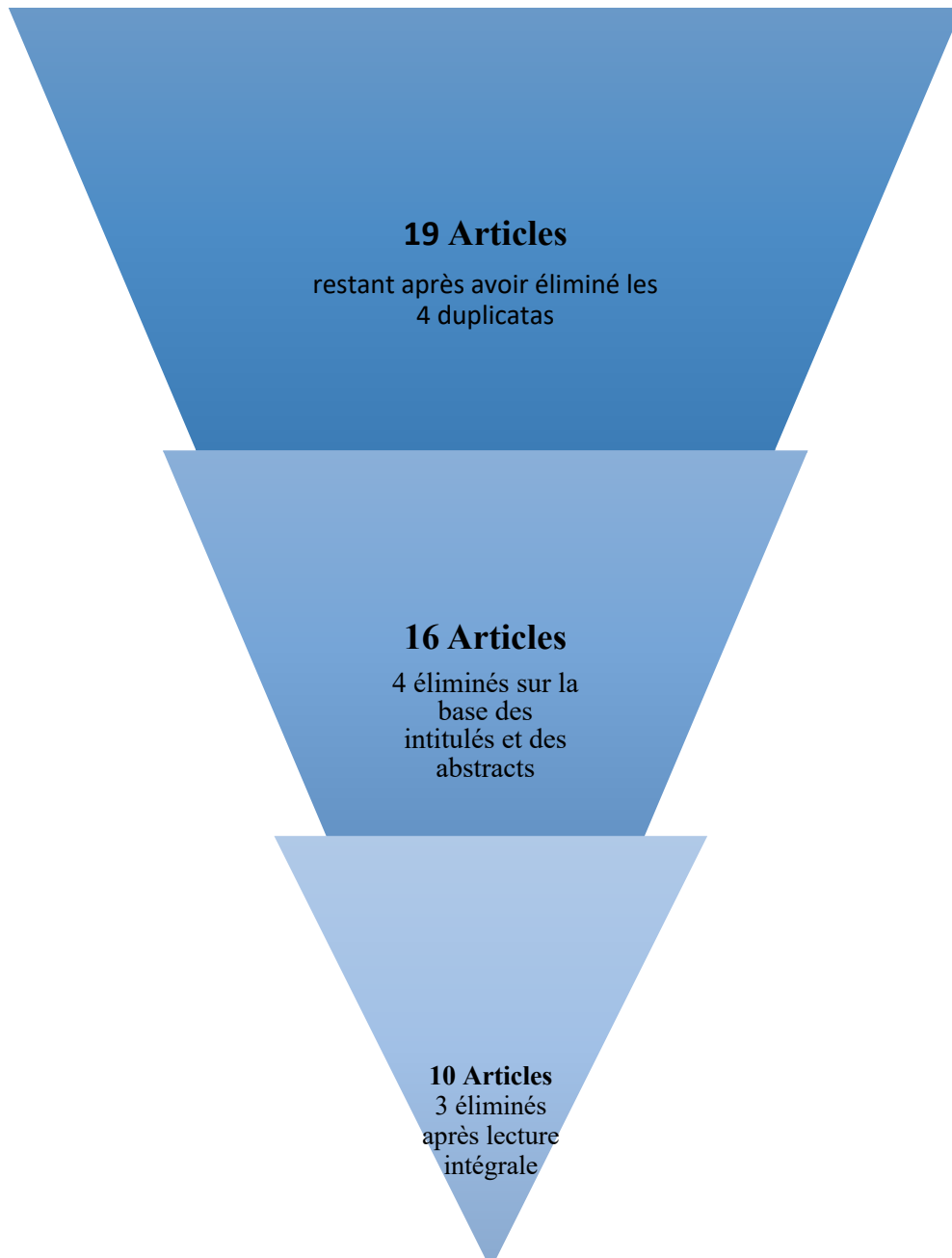


Figure 4: Stratégie de recherche

Les études incluses dans notre analyse ont eu lieu dans sept différents pays : Une en Slovénie, une en Chine, trois en Iran, une en Brésil, 3 en Espagne et une en Égypte.

Les types d'études incluses sont différents. Il s'agit de cinq études cohortes, un essai randomisé contrôlé, une étude interventionnelle, deux études expérimentales et une revue systématique de la littérature. Les publications étudiées ont une taille d'échantillon très variée. L'étude cohorte faite par M Gi Julia et al. a inclus 14760 cas versus l'étude de Berteli et al. qui se porte sur 40 cas.

Toutes ces études se sont intéressées à l'apport de MACS dans l'amélioration des résultats de la procréation médicalement assistée.

Toutes les données collectées ont été résumées au niveau du tableau 1 ci-dessous, incluant l'auteur de l'étude, le pays où l'étude a eu lieu, la description du type de l'étude, le nombre de patients ou de spécimens inclus dans chaque étude, les critères d'inclusion, les procédures de sélections de spermatozoïdes et le résultat principal de ces études.

Auteur et année	Pays	Description de l'étude	N° de patients	Critères d'inclusion	Comparaison	Résultat principal
Stimpfel et al. 2018	Slovénie	Étude cohorte prospective	71	Couples bénéficiant d'une FIV ou d'une ICSI dont les partenaires males ont un taux de mobilité > 5millions	MACS vs Swim-up	MACS améliore la qualité des embryons in vitro
Tavalee et al. 2012	Iran	Étude expérimentale	40	Infertilité masculine avec spermogramme normal	DGC avant MACS vs DGC après MACS	DGC avant MACS permet une meilleure sélection de SPZ
Berteli et al. 2017	Bresil	Étude expérimentale	37	Patients ayant déjà bénéficié d'un spermogramme jugé de mauvaise qualité	MACS+ DGC vs DGC	MACS avant DGC améliore la qualité du sperme choisi (morphologie, taux diminué de SDF, meilleure intégrité de la chromatine) et améliore la fertilité.
Hosseini et al. 2018	Spain	Revue systématique de la littérature	-	-	-	MACS contribue à la sélection d'un SPZ sain MACS peut être utilisé comme outil de dépistage génétique et pour traiter l'infertilité.
Ebrahimi et al. 2019	Iran	Étude interventionnelle	63	Hommes : -ayant une asthénotérazoospermie - âgée entre 20-40 ans - Bilan hormonal, caryotype normal - Pas d'ATCD de varicocèle ou autre pathologie génitale - partenaire avec une réserve ovarienne normal et pas d'ATCD d'infertilité	Sperme avant et après traitement par MACS	MACS améliore la morphologie des SPZ et diminue le taux de fragmentation de l'ADN chez les patients ayant une asthénotérazoospermie.

Guo et al. 2019	Chine	Étude cohorte rétrospective	347	Couples avec échec d'implantation et les couples avec âge maternel avancé	MACS + ICSI vs ICSI seule	L'utilisation de MACS et ICSI améliore la qualité des embryons et le taux de réussite d'implantation et de grossesse évolutive .
Ahmadi et al. 2022	Iran	Étude cohorte	120	Infertilité masculine inexplicée chez les sujets < 35 ans	-Sperm testiculaire -Swim-up -SPZ mobiles après swim-up -MACS -SPZ mobiles après MACS	MACS est plus efficace dans la réduction du taux de SDF. Quoique aucune méthode ne peut éliminer à 100% les SPZ avec une fragmentation anormale dans l'échantillon final des SPZ
Hozyen et al. 2021	Egypt	Essai randomisé contrôlé	302	Fragmentation anormale des SPZ	PCSI vs DGC vs Sperm testiculaire	PICSI et MACS ont de meilleurs résultats par rapport au sperm testiculaire ou DGC seul
Pacheco et al 2020	Espagne	étude cohorte	724	Infertilité masculine	MACS vs DGC	MACS diminue le taux de fausse couches, augmente le taux de grossesse et des nouveau-nés vivants.
M Gi. Julia et al. 2021	Espagne	étude cohorte	14760	Couples bénéficiant d'un dépistage génétique préimplantatoire	MACS vs Sélection standard	MACS diminue le taux d'aneuploïdie

Tableau 1: Tableau récapitulatif des données des études incluses dans notre analyse

Résumés des études incluses dans notre analyse :

L'étude cohorte prospective de Stimpfel et al. menée en 2018 en Slovénie a eu pour objectif de comparer la méthode MACS à la méthode Swim-up [1]. L'étude visait à déterminer si l'utilisation de MACS pour sélectionner les spermatozoïdes non apoptotiques pouvait améliorer la qualité des embryons et les taux de grossesse. L'étude a été menée sur 115 couples soumis à un traitement par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Dans chaque couple, la moitié des ovocytes prélevés ont été inséminés avec des spermatozoïdes sélectionnés par MACS, tandis que l'autre moitié a été inséminée avec des spermatozoïdes non sélectionnés. L'étude a montré que l'utilisation de spermatozoïdes sélectionnés par MACS améliorait significativement la qualité des embryons chez les femmes de plus de 35 ans, mais pas chez les femmes plus jeunes. En outre, il n'y avait pas de différence significative dans les taux de grossesse entre les groupes de spermatozoïdes sélectionnés par MACS et les groupes de spermatozoïdes non sélectionnés. Les auteurs ont conclu que la sélection MACS de spermatozoïdes non apoptotiques pourrait être une technique utile pour améliorer la qualité des embryons chez les femmes plus âgées qui subissent un traitement ICSI.

Les études expérimentales de Tavalee et al. et de Berteli et al. ont comparé l'utilisation de la DGC (density Gradient Centrifugation) et MACS [2-3]. L'objectif de l'étude de Tavalee était de comparer l'efficacité de deux techniques de sélection des spermatozoïdes couramment utilisées, la DGC et le MACS. L'étude a été menée sur des échantillons de sperme provenant de 40 hommes infertiles qui ont été adressés à l'Institut de recherche Avicenna en Iran. Les échantillons de sperme ont été divisés au hasard en deux groupes : Le groupe A a

subi le MACS avant la DGC, tandis que le groupe B a subi la DGC avant la MACS. Quant à l'étude menée par Berteli et al. en 2017, elle a été menée sur des échantillons de sperme provenant de 45 hommes infertiles ayant bénéficié de techniques de procréation assistée à l'unité de médecine reproductive de l'université de Campinas au Brésil. Les échantillons de sperme ont été divisés en deux groupes : Le groupe A a subi une DGC seule, tandis que le groupe B a subi une MACS suivie d'une DGC. En comparaison avec l'étude de Tavalee et al., l'étude de Berteli et al. suggère que la combinaison de la MACS et de la DGC peut être une technique de sélection plus efficace des spermatozoïdes pour améliorer la récupération de spermatozoïdes de haute qualité pour les techniques de procréation médicalement assistée. Cela contraste avec l'étude précédente, qui concluait que la DGC avant la MACS était la technique la plus efficace. Il convient de noter que les deux études diffèrent en termes de population étudiée, de taille de l'échantillon et de mesures spécifiques des résultats. Par conséquent, la technique optimale de sélection des spermatozoïdes peut varier en fonction du contexte clinique et des caractéristiques spécifiques du patient.

Hosseini et al. ont publié en 2018 une revue systématique de la littérature sur l'intérêt de l'utilisation de MACS [4]. Elle confirme que MACS contribue à la sélection d'un SPZ sain et indemne d'anomalies pouvant même être utilisé comme étant un outil de dépistage génétique ou encore pour traiter l'infertilité.

Quant à l'étude interventionnelle d'Ebrahimi et al, elle analyse le sperme avant et après traitement par MACS chez les hommes âgé entre 20 et 40 ans, sans antécédent de varicocèle ou une autre pathologie génitale, ayant une asthénotérazoospermie avec un bilan hormonal et un caryotype normaux et dont les partenaires ont une réserve ovarienne normale et sont sans antécédent

d'infertilité [6]. L'étude a porté sur 55 hommes atteints d'asthénotérazoospermie qui ont subi une préparation des spermatozoïdes à l'aide de la technique conventionnelle du swim-up (groupe de contrôle, n=27) ou de la technique MACS (groupe d'intervention, n=28). La morphologie des spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN ont été évaluées à l'aide de méthodes de laboratoire standard. Les résultats ont montré que l'utilisation du MACS pour la préparation des spermatozoïdes a entraîné une amélioration significative de la morphologie des spermatozoïdes par rapport au swim-up conventionnel (37,4 % contre 22,9 %, $p < 0,001$). En outre, le groupe MACS présentait un pourcentage significativement plus faible de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN par rapport au groupe de contrôle (15,9 % contre 29,7 %, $p < 0,001$). Cette étude interventionnelle objective que MACS améliore la morphologie des spermatozoïdes et diminue le taux de fragmentation de l'ADN chez ces patients.

Une des études a comparé MACS et ICSI (injection intra-cytoplasmique des spermatozoïdes) vs ICSI seule (Guo et al. 2019) [7]. L'objectif de l'étude était d'évaluer l'efficacité de la MACS avant l'injection de spermatozoïdes (MACSIS) dans l'amélioration des résultats cliniques pour les couples présentant un échec d'implantation récurrent inexplicé et les femmes âgées de 35 ans ou plus. L'étude a porté sur 184 couples ayant subi une fécondation in vitro (FIV) ou une injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Le groupe d'étude (n=94) a subi une MACSIS, tandis que le groupe de contrôle (n=90) a reçu un traitement standard sans MACSIS. Les principaux critères d'évaluation étaient le taux de grossesse clinique, le taux de naissance vivante et le taux de fausse couche. Les résultats ont montré que le taux de grossesse clinique et le taux de naissance

vivante étaient significativement plus élevés dans le groupe MACSIS que dans le groupe témoin (51,1 % contre 33,3 %, $p=0,006$, et 44,7 % contre 27,8 %, $p=0,016$, respectivement). Le taux de fausses couches était similaire entre les deux groupes (15,8 % contre 20,8 %, $p=0,481$). L'analyse des sous-groupes a montré que le groupe MACSIS présentait des taux de grossesses cliniques et des taux de naissances vivantes significativement plus élevés que le groupe témoin chez les couples présentant une récurrence d'échec d'implantation inexplicée et chez les femmes âgées de 35 ans ou plus. Les auteurs ont conclu que MACSIS est une technique efficace pour améliorer les résultats cliniques dans ces populations de patients.

Une autre étude a comparé le sperm testiculaire brut vs Swim up vs les spermatozoïdes mobiles après Swim-up vs MACS vs les spermatozoïdes mobiles après MACS (Ahmadi et al. 2022) [8] . L'objectif de cette étude était de comparer l'efficacité de deux méthodes différentes de sélection des spermatozoïdes, la MACS et l'injection intra-cytoplasmique physiologique de spermatozoïdes (PICSI), dans des cas d'infertilité inexplicée. L'étude a porté sur 92 couples qui avaient recours à des techniques de procréation médicalement assistée en raison d'une infertilité inexplicée. Les couples ont été répartis au hasard en deux groupes : le groupe MACS ($n=46$), dans lequel la sélection des spermatozoïdes a été effectuée par MACS, et le groupe PICSI ($n=46$), dans lequel la sélection des spermatozoïdes a été effectuée par PICSI. Les principaux critères d'évaluation étaient le taux de fécondation, la qualité des embryons et le taux de grossesse clinique. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes en termes de taux de fécondation, de qualité embryonnaire ou de taux de grossesse clinique. Le taux de fécondation était de 71,4 % dans le

groupe MACS et de 70,2 % dans le groupe PICS (p=0,842). La qualité des embryons était similaire entre les deux groupes, sans différence statistiquement significative en termes de nombre d'embryons, de nombre d'embryons de haute qualité ou de score embryonnaire. Le taux de grossesse clinique était également similaire entre les deux groupes (41,3 % dans le groupe MACS et 37 % dans le groupe PICS, p=0,688). Les auteurs ont conclu que le MACS et la PICS sont des techniques efficaces pour la sélection des spermatozoïdes dans les cas d'infertilité inexplicée, et qu'il n'y a pas de différence significative en termes d'efficacité. Ils ont suggéré que d'autres études avec des échantillons plus importants pourraient être nécessaires pour confirmer ces résultats et pour déterminer la technique optimale de sélection des spermatozoïdes dans différentes populations de patients. Dans l'ensemble, l'étude suggère que la MACS et la PICS peuvent être des techniques efficaces pour améliorer les résultats en matière de fertilité dans les cas d'infertilité inexplicée. Cependant, le choix de la technique peut dépendre de facteurs tels que la disponibilité de l'équipement et l'expertise des cliniciens qui pratiquent l'intervention

Une autre étude cohorte publiée par Pacheco et al. en 2020 a comparé MACS contre DGC tandis que l'étude cohorte de M Gi et al. a comparé MACS à une sélection standard alors que Hozyen et al ont mené un essai randomisé contrôlé comparant PICS vs DGC vs sperme testiculaire [5-9-10]. Ces trois études ont évalué l'efficacité de différentes techniques de sélection des spermatozoïdes pour améliorer les résultats des techniques de procréation médicalement assistée chez les couples souffrant d'infertilité.

L'étude de Hozyen et al. (2022) s'est concentrée sur les résultats de différentes techniques de sélection des spermatozoïdes chez des patients ayant subi une injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) et présentant une fragmentation anormale de l'ADN des spermatozoïdes [9]. Les chercheurs ont constaté que la MACS permettait d'obtenir des taux de grossesses cliniques et des taux de naissances vivantes significativement plus élevés que les autres techniques. L'étude de Pacheco et al. (2020) a évalué l'utilisation du MACS comme technique de sélection des spermatozoïdes pour les cas présentant des niveaux élevés de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes [5]. Les chercheurs ont constaté que la MACS améliorait la morphologie des spermatozoïdes et réduisait la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, ce qui a permis d'améliorer les résultats de la procréation médicalement assistée. L'étude de Julia et al. (2021) a comparé l'utilisation du MACS au traitement standard du sperme chez des couples subissant un test génétique préimplantatoire pour les aneuploïdies (PGT-A) à l'aide d'ovocytes autologues [10]. Les chercheurs ont constaté que la MACS entraînait des taux d'aneuploïdies légèrement inférieurs à ceux du traitement standard du sperme.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent que la MACS peut être une technique de sélection des spermatozoïdes efficace pour améliorer les résultats des techniques de procréation médicalement assistée, en particulier dans les cas de fragmentation anormale de l'ADN des spermatozoïdes ou de niveaux élevés d'aneuploïdie.

V. Discussion

L'ensemble des études incluses dans notre analyse ont évalué l'efficacité de la MACS pour la sélection des spermatozoïdes dans le cadre de la procréation médicalement assistée, y compris l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (IICS), la fécondation in vitro (FIV) et l'insémination intra-utérine (IIU). Ces études ont également évalué l'efficacité du MACS pour la séparation des spermatozoïdes porteurs de l'X et de l'Y en vue de la sélection du sexe.

La MACS impacte sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et apporte des avantages potentiels pour les résultats de la FIV . En effet, MACS réduit les niveaux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et améliorerait les taux de fécondation dans la FIV. La sélection de spermatozoïdes non apoptotiques à l'aide de la MACS peut être une approche utile, mais uniquement dans une population clairement définie de couples dont la femme est âgée de plus de 30 ans. D'après Stimpfel et al, les couples confrontés à une infertilité masculine due à une tératozoospermie peuvent bénéficier de cette procédure en obtenant un pourcentage plus élevé de blastocystes de bonne qualité [1].

La MACS peut d' améliorer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et réduire le risque de dommages à l'ADN dans les procédures de procréation assistée. En effet Tavalee et al. ont montré que la technique MACS réduit le taux de fragmentation de l'ADN de 26,9 % [2]. Plus récemment, Berteli et al. ont montré que la technique MACS permet de réduire de 66,7% le taux de fragmentation de l'ADN [3].

En plus d'améliorer l'intégrité de l'ADN, il a également été démontré que le MACS améliorerait d'autres paramètres des spermatozoïdes, notamment la motilité et la morphologie. Une étude de Hosseini et al. (2018) a révélé que le MACS améliorerait la motilité et la morphologie des spermatozoïdes, entraînant une amélioration des taux de fécondation dans la FIV [4].

Pacheco et al ont mené une étude rétrospective afin d'étudier l'efficacité de la technique MACS pour augmenter les résultats reproductifs chez les patients présentant des niveaux élevés de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (SDF) et subissant des cycles d'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Les résultats reproductifs ont été analysés en fonction de trois procédures de procréation assistée différentes : test génétique préimplantatoire pour l'aneuploïdie, cycles d'autogreffe et de don d'ovocytes. Le groupe MACS a présenté des taux de fausses couches significativement plus faibles dans les cycles autologues d'ICSI, des taux de grossesse plus élevés dans les cycles de don d'ovocytes et une augmentation significative des taux de naissances vivantes dans les cycles autologues et de don d'ovocytes. Dans l'ensemble, leurs résultats suggèrent que la technique MACS peut être utilisée efficacement pour éliminer les spermatozoïdes présentant des niveaux élevés de fragmentation d'ADN, et qu'elle peut donc contribuer à améliorer les résultats reproductifs chez les couples ayant recours à la procréation médicalement assistée [5].

La MACS améliore la morphologie des spermatozoïdes et conduit à de meilleurs taux de grossesse clinique dans le cadre de l'ICSI [6].

Le MACS a également été étudié en tant qu'outil potentiel pour sélectionner les spermatozoïdes porteurs du chromosome X ou Y. Une étude menée par Guo et al. (2017) a révélé que le MACS pouvait séparer efficacement les spermatozoïdes porteurs du chromosome X et du chromosome Y, ce qui augmentait la probabilité de produire une progéniture mâle ou femelle dans les procédures d'assistance médicale à la procréation [7].

En 2023, Ahmadi et al ont comparé l'efficacité de MACS et l'injection physiologique intra-cytoplasmique des spermatozoïdes pour la sélection des spermatozoïdes chez les couples avec infertilité inexplicée. Le MACS s'est avéré plus efficace dans la réduction des taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes que l'injection intra-cytoplasmique physiologique de spermatozoïdes (Physiological intracytoplasmic sperm injection PICS) . Cependant, aucune des techniques de sélection des spermatozoïdes ne peut éliminer totalement les spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN dans l'échantillon final de spermatozoïdes [8].

La PICS et la MACS associées à la centrifugation en gradient de densité (density gradient centrifugation DGC) s'avèrent capables d'améliorer significativement des résultats embryologiques et cliniques par rapport au sperme testiculaire au sperme traité par DGC seul chez les patients présentant une fragmentation anormale de l'ADN des spermatozoïdes [9]. Un essai contrôlé randomisé a été publiée en 2022, menée dans le dessein d'étudier les résultats reproductifs de différentes techniques de sélection des spermatozoïdes pour les patients ayant subi une injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes avec une fragmentation anormale de l'ADN des spermatozoïdes. Cette étude confirme que l'association de plusieurs techniques de sélection de spermatozoïdes notamment la MACS, la DGC et la PICS est prometteuse dans l'obtention d'un spermatozoïde de meilleure qualité.

Bien que le MACS ait donné des résultats prometteurs en matière de sélection des spermatozoïdes, son utilisation présente certaines limites. L'une des principales limites est la possibilité de sélectionner des spermatozoïdes présentant une morphologie ou une motilité anormale. La MACS ne fait pas la distinction

entre les spermatozoïdes normaux et anormaux sur la base de ces paramètres, ce qui pourrait potentiellement entraîner une diminution de la qualité des embryons produits. En outre, la MACS n'est pas adapté à la sélection de spermatozoïdes présentant des anomalies génétiques spécifiques ou des aberrations chromosomiques. Quoiqu'en août 2021, un article a été publié dans la revue de la reproduction humaine soulevant une question pertinente : est-ce que la sélection des spermatozoïdes non-apoptotiques par MACS diminue le taux d'aneuploïdie chez les embryons provenant des couples ayant subi des cycles d'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes et un test génétique préimplantatoire pour l'aneuploïdie en utilisant les oocytes du patient ? La réponse est oui. En effet le taux d'aneuploïdie dans le groupe MACS était inférieur de 4,34% à celui obtenu avec des échantillons de spermatozoïdes traités selon la pratique clinique standard [10].

Dans l'ensemble, les études examinées suggèrent que le MACS peut améliorer la qualité des spermatozoïdes sélectionnés lors des procédures de procréation médicalement assistée. Il a été démontré que le MACS améliore l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, leur mobilité, leur morphologie et le rapport des sexes de la progéniture produite. L'incapacité de MACS de sélectionner des spermatozoïdes présentant des anomalies génétiques spécifiques reste un sujet controversé.

VI. Conclusion

Les données existantes suggèrent que l'utilisation de la MACS dans la sélection des spermatozoïdes peut améliorer les résultats cliniques des techniques de procréation dans certaines populations de patients. Cependant, son efficacité peut dépendre des caractéristiques du patient, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer son utilisation optimale dans différents scénarios cliniques. L'utilisation du MACS peut également améliorer la qualité des spermatozoïdes utilisés lors de la procréation médicalement assistée et peut être utile pour la sélection du sexe.

VII. Résumés

RÉSUMÉ

Titre : MACS ou technique de sélection immuno- magnétique des spermatozoïdes : revue systématique de la littérature

Auteur : SLAOUI Aziz

Directeur de mémoire : BAIDADA Abdelaziz

Mots clés : AMP ; FIV ; MACS

La MACS est une technique utilisée dans la procréation assistée pour séparer les spermatozoïdes de haute qualité des spermatozoïdes de faible qualité, ce qui peut améliorer les chances de réussite de la fécondation et de la grossesse. La technique consiste à marquer les spermatozoïdes avec des billes magnétiques, ce qui permet de les séparer à l'aide d'un champ magnétique.

Plusieurs études ont examiné l'efficacité de la MACS dans l'amélioration des résultats de la procréation assistée. Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que le MACS peut améliorer la qualité des spermatozoïdes et augmenter les taux de réussite de diverses procédures de procréation assistée, telles que la fécondation in vitro (FIV) et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)

Plus précisément, certaines études ont montré que la MACS pouvait augmenter le pourcentage de spermatozoïdes normaux et réduire la fragmentation de l'ADN dans les échantillons de sperme. D'autres études ont fait état d'une amélioration des taux de fécondation, de la qualité des embryons et des taux de grossesse chez les couples ayant recours à la procréation médicalement assistée avec des spermatozoïdes sélectionnés par MACS.

Cependant, certaines études ont également rapporté des résultats contradictoires et suggèrent la nécessité de poursuivre les recherches pour déterminer les conditions optimales d'utilisation de la MACS dans le cadre de la procréation médicalement assistée. Des facteurs tels que le type de billes magnétiques utilisées, le moment et la durée de l'incubation des spermatozoïdes avec les billes, et les critères utilisés pour la sélection des spermatozoïdes peuvent tous affecter les résultats de la MACS.

En conclusion, bien qu'il existe des preuves à l'appui de l'utilisation de la MACS pour améliorer les résultats de la PMA, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la technique et déterminer ses effets à long terme sur la santé de la progéniture.

ABSTRACT

Title: MACS or immunomagnetic sperm selection technique: systematic review of the literature

Author: SLAOUI Aziz

Director: BAIDADA Abdelaziz

Keywords: ART ; IVF ; MACS

MACS is a technique used in Assisted Reproductive Techniques (ART) to separate high-quality sperm from low-quality sperm, which can improve the chances of successful fertilization and pregnancy. The technique involves labeling the sperm with magnetic beads, which allows them to be separated using a magnetic field.

Several studies have investigated the effectiveness of MACS in improving ART outcomes. Overall, the findings suggest that MACS can improve sperm quality and increase the success rates of various ART procedures, such as in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Specifically, some studies have found that MACS can increase the percentage of normal sperm and reduce DNA fragmentation in sperm samples. Other studies have reported improved fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in couples undergoing ART with MACS-selected sperm.

However, some studies have also reported conflicting results and the need for further research to determine the optimal conditions for using MACS in ART. Factors such as the type of magnetic beads used, the timing and duration of sperm incubation with the beads, and the criteria used for sperm selection can all affect the outcomes of MACS in ART.

Overall, while there is evidence to support the use of MACS in improving ART outcomes, further research is needed to optimize the technique and to determine its long-term effects on offspring health.

ملخص

العنوان MACS : أو تقنية اختيار الحيوانات المنوية المناعية: مراجعة منهجية للأدب

المؤلف: عزيز السلوي

مدير الرسالة: عبد العزيز بيدادة

الكلمات المفتاحية: تقنية اختيار الحيوانات المنوية المناعية المغناطيسية؛ الإخصاب في المختبر

أطفال الأنابيب؛ الإنجاب بمساعدة طبية

MACS هي تقنية تستخدم في تقنيات الإنجاب المساعدة (ART) لفصل الحيوانات المنوية عالية الجودة عن الحيوانات المنوية منخفضة الجودة ، والتي يمكن أن تحسن فرص نجاح الإخصاب والحمل. تتضمن هذه التقنية وسم الحيوانات المنوية بخرز مغناطيسي ، مما يسمح بفصلها باستخدام مجال مغناطيسي. بحثت العديد من الدراسات في فعالية MACS في تحسين نتائج العلاج المضاد للفيروسات القهقرية. بشكل عام ، تشير النتائج إلى أن MACS يمكن أن يحسن جودة الحيوانات المنوية ويزيد من معدلات نجاح إجراءات ART المختلفة ، مثل الإخصاب في المختبر (IVF) وحقن الحيوانات المنوية داخل الهيولى (ICSI) على وجه التحديد ، وجدت بعض الدراسات أن MACS يمكن أن يزيد من نسبة الحيوانات المنوية الطبيعية ويقلل من تكسر الحمض النووي في عينات الحيوانات المنوية. أفادت دراسات أخرى عن تحسن معدلات الإخصاب وجودة الجنين ومعدلات الحمل لدى الأزواج الذين يخضعون للعلاج المضاد للفيروسات القهقرية مع الحيوانات المنوية المختارة من MACS. ومع ذلك ، فقد أبلغت بعض الدراسات أيضا عن نتائج متضاربة والحاجة إلى مزيد من البحث لتحديد...

VIII. Références

1. Stimpfel, M., Verdenik, I., Zorn, B. et al. Magnetic-activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa improves the quality of embryos according to female age: a prospective sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 35, 1665–1674 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1242-1>
2. Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 31–8.
3. Berteli TS, Da Broi MG, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology* 2017; 5: 776–82.
4. Hosseini A, Saki G, Nikbakht R, Karimi I, Davarpanah M. Magnetic activated cell sorting in sperm selection: a review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2018;16(11):665-672. doi: 10.29252/ijrm.16.11.665
5. Pacheco A, Blanco A, Bronet F, Cruz M, García-Fernández J, García-Velasco JA. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *J Clin Med*. 2020 Dec 8;9(12):3976. doi: 10.3390/jcm9123976. PMID: 33302575; PMCID: PMC7763893.
6. Ebrahimi, B., Salehi, M., & Yazdani, A. (2019). Magnetic activated cell sorting (MACS) improves sperm morphology and reduces sperm DNA fragmentation in asthenoteratozoospermic men. *Andrologia*, 51(9), e13336. <https://doi.org/10.3390/jcm9123976>

7. Guo Y, Zhu Z, Gao Y, et al. Magnetic-activated cell sorting before sperm injection (MACSIS) improves clinical outcomes for couples with unexplained recurrent implantation failure and women aged 35 years or older. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(12):2495-2504. doi:10.1007/s10815-019-01616-7.
8. Ahmadi A, Sobhani A, Khalili MA, Agha-Rahimi A, Nabi A, Findikli N. Comparison of the Efficiency of Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) and Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection (PICSI) for Sperm Selection in Cases with Unexplained Infertility. *J Reprod Infertil.* 2022 Jul-Sep;23(3):184-191. doi: 10.18502/jri.v23i3.10009. PMID: 36415491; PMCID: PMC9666600.
9. Hozyen M, Hasanen E, Elqusi K, ElTanbouly S, Gamal S, Hussin AG, AlKhader H, Zaki H. Reproductive Outcomes of Different Sperm Selection Techniques for ICSI Patients with Abnormal Sperm DNA Fragmentation: a Randomized Controlled Trial. *Reprod Sci.* 2022 Jan;29(1):220-228. doi: 10.1007/s43032-021-00642-y. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34076869.
10. M Gi. Julia, I Hervas, A Navarro-GomezLechon, F Quintana, D Amoros, A Pacheco, C Gonzalez-Ravina, R Rivera-Egea, N Garrido, P-005 Magnetic-activated cell sorting in couples undergoing preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) using autologous oocytes shows slightly lower aneuploidy rates compared to standard semen processing, *Human Reproduction*, Volume 36, Issue Supplement_1, July 2021, deab130.004, <https://doi.org/10.1093/humrep/deab130.004>

11. Said, T. M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H. J., & Paasch, U. (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology*, 29(2),134. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003632>
12. Baldini D, Ferri D, Baldini GM, Lot D, Catino A, Vizziello D, Vizziello G. Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells* 2021; 10: 3566.