

Année 2002



Thèse n° 30711

SCD UNIV.LIMOGES.



D 065 089891 1

**EVALUATION DES BIOPSIES TESTICULAIRES
REALISEES CHEZ DES PATIENTS PRESENTANT UNE
AZOOSPERMIE NON OBSTRUCTIVE**

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présenté et soutenu publiquement

Le 13 mars 2002 à Bordeaux

Par

Pierre CASASNOVAS

Né le 16 août 1972 à Saintes

JURY

Directeur de thèse

Docteur Aline PAPAXANTHOS

Membres du Jury

Professeur Jean-Louis BENEYTOUT, Président

Professeur Jean CAMBAR

Professeur Claude HOCKE

Professeur Jacques HOROVITZ

Professeur Guy MAYER

Professeur Jean-Louis PARIENTE

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Monieur le Professeur **HABRIOUX Gérard**

Madame le Professeur **CHULIA Dominique**
Monieur **COMBY Francis**, Maître de Conférences

DOYEN DE LA FACULTE:

ASSESEURS

PROFESSEURS

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE	BENYTOT Jean-Louis
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	BOSGIRAUD Claudine
PHARMACIE GALENIQUE	BROSSARD Claude
CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE	BUXERAUD Jacques
CHIMIE ANALYTIQUE	CARDOT Philippe
PHARMACOGNOSIE	CHULIA Albert
PHARMACIE GALENIQUE	CHULIA Dominique
CHIMIE GENERALE ET MINERALE	DELAGE Christiane
PARASITOLOGIE	DREYFUSS Gilles
PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE	DUROUX Jean-Luc
BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE	GHESTEM Axel
BIOCHIMIE FONDAMENTALE	HABRIOUX Gérard
TOXICOLOGIE	LACHATRE Gérard
HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT	MOESCH Christian
PHARMACODYNAMIE	OUDART Nicole

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE Doriane**

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	BASLY Jean-Philippe	BATTU Serge	BOTINEAU Michel	CARDI Patrice	CLEDAT Dominique	COMBY Francis	DELBASSEE Sylvie	DREYFUSS Marie-Françoise	EA KIM Leng	FAGNERE Catherine	FROISSARD Didier	FOURNIER Françoise	JAMBUT Anne Catherine	LAGORCE Jean-François	LARTIGUE Martine	LIAGRE BERTRAND	LOTFI Hayat	MARION Sandrine	MOREAU Jeanne	PARTOUCHE Christian	ROUSSEAU Annick	SIMON Alain	TROUILLAS Patrick	VIANA Marylène	VIGNOLES Philippe	
PHARMACOGNOSIE	CHIMIE ANALYTIQUE	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE	PHYSIOLOGIE	CHIMIE ANALYTIQUE	CHIMIE THERAPEUTIQUE	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE	PHARMACODYNAMIE	THERAPEUTIQUE	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE	BIOCHIMIE	CHIMIE THERAPEUTIQUE	CHIMIE ORGANIQUE	PHARMACODYNAMIE	SCIENCES BIOLOGIQUES	TOXICOLOGIE	CHIMIE THERAPEUTIQUE	IMMUNOLOGIE	PHYSIOLOGIE	PHYSIQUE-INFORMATIQUE	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE	BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE	PHARMACEUTIQUE	PHARMACIE GALENIQUE	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUY Jean-Claude

ATER

CALLISTE Claude

MARFAK Abdelghafour

RIAHI DEHKORDI Homayoun

TALLET Dominique

BIOPHYSIQUE

BIOPHYSIQUE

PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE

PHARMACOLOGIE

PHARMACIE GALENIQUE

ANGLAIS

TOUS NOS REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Louis BENEYTOT
Vous nous faites l'honneur de présider ce jury. Nous vous prions de recevoir ici le témoignage de notre gratitude, et l'expression de notre profond respect

A Monsieur le Professeur Guy MAYER
Vous nous avez accueilli et guidé avec bienveillance dans votre service, d'abord en tant qu'interne puis tout au long de ce travail sur les biopsies testiculaires. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de notre profond respect et de toute notre reconnaissance.

vous nous faites en participant à notre jury de thèse.
Veuillez accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance pour l'honneur que

A Monsieur le Professeur Jacques HOROVITZ

témoignage de notre profonde gratitude.
Vous nous faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici le

A Monsieur le Professeur Claude HOCKE

Veuillez trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements.
Nous sommes sensibles à l'honneur que vous faites en acceptant de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Jean CAMBAR

TOUS NOS REMERCIEMENTS

TOUS NOS REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Louis PARIENTE
Vous nous avez accueilli avec bienveillance dans votre service, notamment en nous permettant d'assister à des opérations chirurgicales de biopsies testiculaires et de ponctions épididymaires et déférentielles. Veuillez accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance et de toute notre gratitude.

A Madame le Docteur Aline PAPAXANTHOS
Vous nous avez confié ce sujet dans un domaine qui nous tient à cœur, étant auparavant passé interne dans votre service. Vos conseils, votre disponibilité et votre soutien permanents nous ont permis de mener à bien cette entreprise !
Permettez-moi de vous exprimer ma profonde reconnaissance.
Puisse ce travail répondre à vos attentes.

TOUS NOS REMERCIEMENTS

A toute l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction et du CECOS de Bordeaux, pour sa très amicale et sympathique coopération, tant durant mon stage d'internat qu'au cours de ce travail.

A toutes celles et ceux sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Je remercie particulièrement Mme le Docteur Colette Deminière, pour sa bienveillante intervention.

A mes camarades d'Internat, avec lesquels nous avons partagé quelques instants de galère et de grands moments de joie.
A tous mes amis. Merci pour tout !

A mon Amie,

A ma Famille,

A mes Parents,

Je dédie cette thèse

PLAN

INTRODUCTION.....p.17

1^{re} PARTIE : RAPPELS ET GENERALITES

D) L'APPAREIL GENTAL MASCULIN.....p. 19

A) TESTICULES ET EPIDIDYMES

- 1) Testicule.....p.20
- 2) Epididyme.....p.20
- 3) Scrotum.....p.21
- 4) Vasculatrisation.....p.21
- 5) Innervation.....p.22

B) LES VOIES EXCRETICES DES SPERMATIZOIDES ET DU SPERME

- 1) Les canaux d'ferents.....p.22
- 2) Les canaux ejaculateurs.....p.22
- 3) L'urètre.....p.23

C) LES GLANDES ANNEXES

- 1) Les vésicules séminales.....p.24
- 2) La prostate.....p.24
- 3) Les glandes de Mery-Cowper.....p.25

II) LES AZOOSPERMIES.....p.26

A) DEFINITIONS ET RAPPELS

- 1) Définition de l'azoospermie.....p.26
- 2) Caractère obstructif ou non de l'azoospermie.....p.26
- 3) Ambiguïté de la classification : azoospermie obstructive ou non obstructive.....p.27

4) Nouvelle classification des azoospermies.....	p.27
a) Azoospermie pré-testiculaire	
b) Azoospermie testiculaire	
c) Azoospermie post-testiculaire	
B) DIFFERENTES ETIOLOGIES DE L'AZOOSPERMIE NON OBSTRUCTIVE	
1) Atteintes testiculaires par des agents exogènes ou de déterminisme inconnu.....	p.29
a) Orchites et epididymorchites	
b) Cryptorchidie	
c) Varicocele	
d) Traumatisme	
e) Torsion testiculaire	
2) Atteintes testiculaires d'origine génétique.....	p.30
a) Anomalies du nombre de chromosomes.....	p.31
α] Syndrome de Klinefelter XXV	
β] Autres anomalies des gonosomes	
b) Anomalies de structure des chromosomes.....	p.33
c) Anomalies géniques.....	p.35
α] Anomalies du chromosome Y	
β] Autres anomalies géniques	
γ] Influence du HLA	
3) Atteintes d'origine endocrinienne.....	p.39
a) Atteinte du système endocrinien	
b) Atteinte dans la biosynthèse et l'action des androgènes	

III)	FACTEURS PREDICTIFS DE LA PRESENCE DE SPERMATOZOIDES	INTRATESTICULAIRES.....p.43
	1) Histologie.....p.43	
	a) <i>Kappel sur la spermatogenèse</i>p.43	
	b) <i>Lecture de la biopsie testiculaire</i>p.45	
	α] Evaluation qualitative (lecture classique)	
	β] Analyse morphométrique	
	c) <i>Etudes de la littérature</i>p.50	
	α] Taux de récupération en fonction du diagnostic histologique	
	β] Etude des spermatozoïdes testiculaires	
	2) Taux de FSH (Follicle Stimulating Hormone).....p.51	
	a) <i>FSH sérique et paramètres spermatozoïdiques</i>	
	b) <i>FSH sérique et diagnostic du type d'azoospermie</i>	
	c) <i>FSH sérique et présence de spermatozoïdes testiculaires</i>	
	3) Volume Testiculaire.....p.55	
	4) Inhibine B.....p.55	
	a) <i>Inhibine B séminale</i>	
	b) <i>Inhibine B sérique</i>	
	5) Hormone Anti-Müllérienne (AMH).....p.58	
	6) Taux de testostérone.....p.59	
	7) Analyse Doppler-couleur du testicule.....p.60	
	8) Evaluation de la méiose par FISH.....p.60	
	9) Détection de l'expression de gènes spécifiques de la lignée germinale.....p.61	
	10) Spermatozoïdes testiculaires.....p.63	
	11) Détection des spermatozoïdes dans l'éjaculat.....p.63	
IV)	LA BIOPSIE TESTICULAIRE.....p.64	
A)	TECHNIQUES DE PRELEVEMENT.....p.64	
	1) La biopsie testiculaire ou TSEF.....p.64	
	a) <i>TSEF conventionnelle</i>	
	b) <i>TSEF microchirurgicale ou TSEF avec microdissection</i>	

1) Patients.....	p.84
a) Sélection des patients	
b) Antécédents des patients azoospermiques non obstructifs	
c) Etude du chromosome Y chez les patients azoospermiques non obstructifs	
D) MATERIEL ET METHODES.....	p.84
DEUXIEME PARTIE : ETUDE	
D) CONGELATION DES SPERMATOZOIDES TESTICULAIRES.....	p.81
a) Tampon de lyse des érythrocytes	
b) Culture in-vitro	
c) Utilisation du test hypo-osmotique (HOS ou hypoosmotic swelling test)	
d) Pentoxifylline	
4) Techniques complémentaires.....	p.77
a) Lavage simple	
b) Gradients de densité	
3) Lavage simple ou gradients de densité.....	p.76
a) Séparation mécanique	
b) Dissociation enzymatique	
2) Séparation mécanique et/ou traitement enzymatique des tissus.....	p.74
1) Aspiration directe des spermatozoïdes (après TESA).....	p.73
C) TECHNIQUES DE PREPARATION DU SPERME.....	p.73
1) Action sur la spermatogénèse.....	p.71
2) Dévascularisation et fibrose.....	p.71
3) Modifications hormonales.....	p.72
4) Conduite à tenir chez les patients avec azoospermie non obstructive (ANO).....	p.72
B) COMPLICATIONS DES BIOPSIES.....	p.71
2) Les ponctions testiculaires percutanées.....	p.68
3) Avantages et inconvénients de chaque technique.....	p.69

2) TESE-ICSI pour azoospermies obstructives.....p.100

- a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes
- b) Analyse des femmes
- c) Taux de fécondation
- d) Hypohaploïdie et hyperhaploïdie
- e) Taux de clivage et échecs de segmentation

1) TESE-ICSI pour azoospermies non obstructives.....p.98

- a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes
- b) Analyse des femmes
- c) Taux de fécondation
- d) Hypohaploïdie et hyperhaploïdie
- e) Taux de clivage et échecs de segmentation
- f) Nombres d'embryons
- g) Taux de grossesse et enfants
- h) Absence de spermatozoïde lors de la biopsie

Tableau 1 Taux de Grossesse des sujets Azoospermiques Non Obstructifs et Obstructifs.(p.96)
 Tableau 2 : Résultats des Fonctions des sujets ANO et AO.....p.97

II) RESULTATS des ANO à BORDEAUX.....p.95

2) Patientes.....p.87

3) Déroulement de la TESE / ICSI.....p.87

- a) Technique de stimulation de l'ovulation.....p.87
- b) Etapes biologiques.....p.88
- c) Préparation du sperme testiculaire.....p.88
- d) Fonction d'ovocytes chez la femme.....p.89
- e) Déroulement de l'ICSI.....p.90
- f) Suivi des zygotes et des embryons.....p.91
- g) Congélation des spermatozoïdes.....p.93
- h) Histologie.....p.95

d) Caryotype des sujets azoospermiques non obstructifs

e) Patients azoospermiques obstructifs

- 3) Comparaison des résultats de TFSF-ICSI entre patients azoospermiques obstructifs et patients azoospermiques non obstructifs.....p.103
- a) Taux de récupération des spermatozoïdes
 - b) Nombres moyens d'ovocytes recueillis, matures et injectés par ponction
 - c) Taux de fécondation
 - d) Nombres d'embryons
 - e) Taux d'accouchement d'enfant vivant
- 4) Ponctions déférentielles et épидидymaires.....p.105
- Tableau 3 : Taux de Grossesse des Ponctions Epididymo-Déférentielles.....p.106
- Tableau 4 : Résultats des Ponctions Epididymo-Déférentielles.....p.107
- a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes
 - b) Analyse des femmes
 - c) Taux de fécondation
 - d) Hypohaploïdie et hyperhaploïdie
 - e) Taux de clivage
 - f) Nombre d'embryons
 - g) Taux de grossesse et enfants
- 5) Comparaison des résultats de TFSF-ICSI entre patients non obstructifs d'une part et ponctions déférentielles et épидидymaires d'autre part.....p.109
- a) Taux de récupération des spermatozoïdes
 - b) Nombre d'ovocytes
 - c) Taux de fécondation
 - d) Nombres d'embryons
 - e) Taux de grossesse par ponction

III) ETUDE DES FACTEURS PREDICTIFS DE LA PRESENCE DE SPERMATOZOIDES INTRATESTICULAIRES.....p.110

A) ETUDE D'UN SEUL FACTEUR PREDICTIF.....p.110

1) Volume testiculaire.....p.110

2) Taux de FSH.....p.111

3) Histologie et extraction de spermatozoïdes.....p.112

a) Examen histologique et extraction de spermatozoïdes chez les patients non obstructifs

b) Examen histologique et extraction de spermatozoïdes chez les patients obstructifs

c) Diagnostic histologique et présence de spermatozoïde

d) Histologie et ammnèse

4) Conclusion sur l'étude d'un facteur prédictif.....p.118

B) ETUDE DE PLUSIEURS FACTEURS PREDICTIFS.....p.119

1) Volume testiculaire et Taux de FSH (quand les 2 étaient disponibles).....p.119

2) Volume testiculaire et Histologie (quand les 2 étaient disponibles).....p.120

3) Taux de FSH et Histologie (quand les 2 étaient disponibles).....p.121

4) Association Volume testiculaire, taux de FSH et Histologie.....p.122

5) Conclusion sur l'association de plusieurs facteurs prédictifs.....p.123

IV) RESULTATS DE LA LITTERATURE POUR LES AZOOSPERMIES NON OBSTRUCTIVES.....p.124

1) Prélèvement.....p.124

2) Résultats et azoospermies non obstructives.....p.126

a) Frais

b) Congele

α) Ponction positives seulement disponibles

β) Ponctions positives et nombre total de ponctions disponibles

II) DISCUSSION DE NOS RESULTATS PAR RAPPORT A LA LITTERATURE

A) ETUDE

- 1) Taux de récupération des spermatozoïdes.....p.130
- a) Patients azoospermiques non obstructifs
 - b) Patients azoospermiques obstructifs
 - c) Après ponction épidymo-déferentielle

2) Facteurs féminins.....p.132

- a) Age des femmes
- b) Nombre d'ovocytes, d'ovocytes matures et d'ovocytes injectés recueillis par ponction

3) Grossesses évolutives par ponction.....p.133

- a) Utilisation de spermatozoïdes frais

α] Taux de grossesse évolutive par biopsie positive

β] Taux de grossesses évolutives par biopsie

b) Utilisation de spermatozoïdes congelés

α] Taux de grossesse évolutive par cycle de décongélation

β] Taux de grossesses évolutives par biopsie

4) Utilisation de spermatozoïdes testiculaires frais pour l'ICSI ou utilisation de spermatozoïdes testiculaires congelés.....p.136

a) Avantages

b) Inconvénients

c) Technique de congélation

B) FACTEURS PREDICTIFS.....p.139

BIBLIOGRAPHIE.....p.151

CONCLUSION.....p.149

- 1) Avant prélèvement : *Metrodin (FSH)*.....p.145
- 2) Après prélèvement : l'utilisation des spermatozoïdes.....p.146

C) PERSPECTIVES.....p.145

- 1) Volume testiculaire.....p.139
- 2) Taux de FSH.....p.139
- 3) Histologie ou biopsie diagnostique préalable.....p.140
- 4) Conclusion sur les facteurs prédictifs.....p.142
 - a) *Un seul facteur prédictif*
 - b) *Association des facteurs prédictifs*
- 5) Perspectives.....p.144

ABCD	: Agénésie Bilatérale des Canaux Déferents
AO	: Azoospermie Obstructive
ANO	: Azoospermie Non Obstructive
FIV	: Fécondation In Vitro
IAC	: Insémination Artificielle avec sperme de Conjoint
ICSI	: Intracytoplasmic Sperm Injection (injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans un ovocyte)
MESA	: Microsurgical Sperm Aspiration (prélèvement au niveau de l'épididyme à l'aiguille)
TESA	: Testicular Sperm Aspiration (prélèvement de la pulpe testiculaire à l'aiguille)
TESE	: Testicular Sperm Extraction (biopsie testiculaire)

ABBREVIATIONS

Notre étude a pris en compte de façon rétrospective les cas de TFSB effectués au CHU de Bordeaux concomitantes du recueil ovocytair en vue d'une FIV-ICSI en présence d'une azoospermie non obstructive afin d'évaluer les résultats et de les comparer aux résultats

devenue aussi un geste thérapeutique (TFSB ou Testicular Sperm Extraction). testiculaire ne doit plus être considérée seulement comme un geste diagnostique, elle est (tests), puis elle a été étendue aux azoospermies sécrétoires. Actuellement, la biopsie obstructives sans spermatozoïdes dans l'épididyme (obstruction haute au niveau du rete testis). Cette procédure a été appliquée en premier lieu dans les azoospermies spermatozoïdes testiculaires, pouvant s'adresser à des patients sans spermatozoïdes dans les testicules. Cette procédure a permis d'envisager une nouvelle voie : ICSI avec une meilleure prise en charge des azoospermies excrétoires. L'obtention de résultats fécondation et de grossesse avec les spermatozoïdes déférentiels et épididymaires, permettant intéressants, mais décevants quant aux taux de succès. L'ICSI a nettement amélioré les taux de FIV classique couplée à un prélèvement épididymaire ou déférentiel. Les résultats étaient Par ailleurs, certaines azoospermies obstructives pouvaient être prises en charge par la ovocyte.

féconder, en ICSI il est possible d'obtenir un embryon avec un seul spermatozoïde par dans l'éjaculat. Alors qu'en FIV, 50 000 à 100 000 spermatozoïdes sont nécessaires pour fécondation est alors devenue possible avec un très faible nombre de spermatozoïdes vivants oligoasthénospermie extrême pour lesquels une FIV classique était impossible. La L'ICSI a permis de donner un espoir, tout d'abord aux patients présentant une cytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) dans un ovocyte¹⁰⁵.

dans les années 90, par l'introduction d'un procédé consistant en une injection intra-séparent les gamètes mâles et femelles se sont développées. Une étape décisive fut marquée Des techniques de micromanipulation visant à court-circuiter les dernières barrières qui tourner vers une procréation médicalement assistée avec don de sperme, ou vers l'adoption. sont peu efficaces dans les infertilités masculines sévères. Ces couples devaient donc se (FIV) permettent de proposer un traitement à la majorité de ces patients, mais ces méthodes féminine. L'insémination artificielle avec sperme de conjoint (IAC) et la fécondation in vitro moitié des cas, un facteur masculin est en cause de façon isolée ou associée à une origine Jusqu'à 14 % des couples rencontrent un problème d'infertilité. Dans un tiers à la

INTRODUCTION

obtenus pour les ponctions masculines d'autres indications (TSE pour azoospermie obstructive et prélèvements épididymo-déferentiels), puis nous avons tenté de dégager les principaux facteurs prédictifs de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires et de définir les bases d'une conduite à tenir ultérieure.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS ET GENERALITES

I) L'APPAREIL GÉNITAL MASCULIN²⁸

A) TESTICULES ET EPIDIDYMES

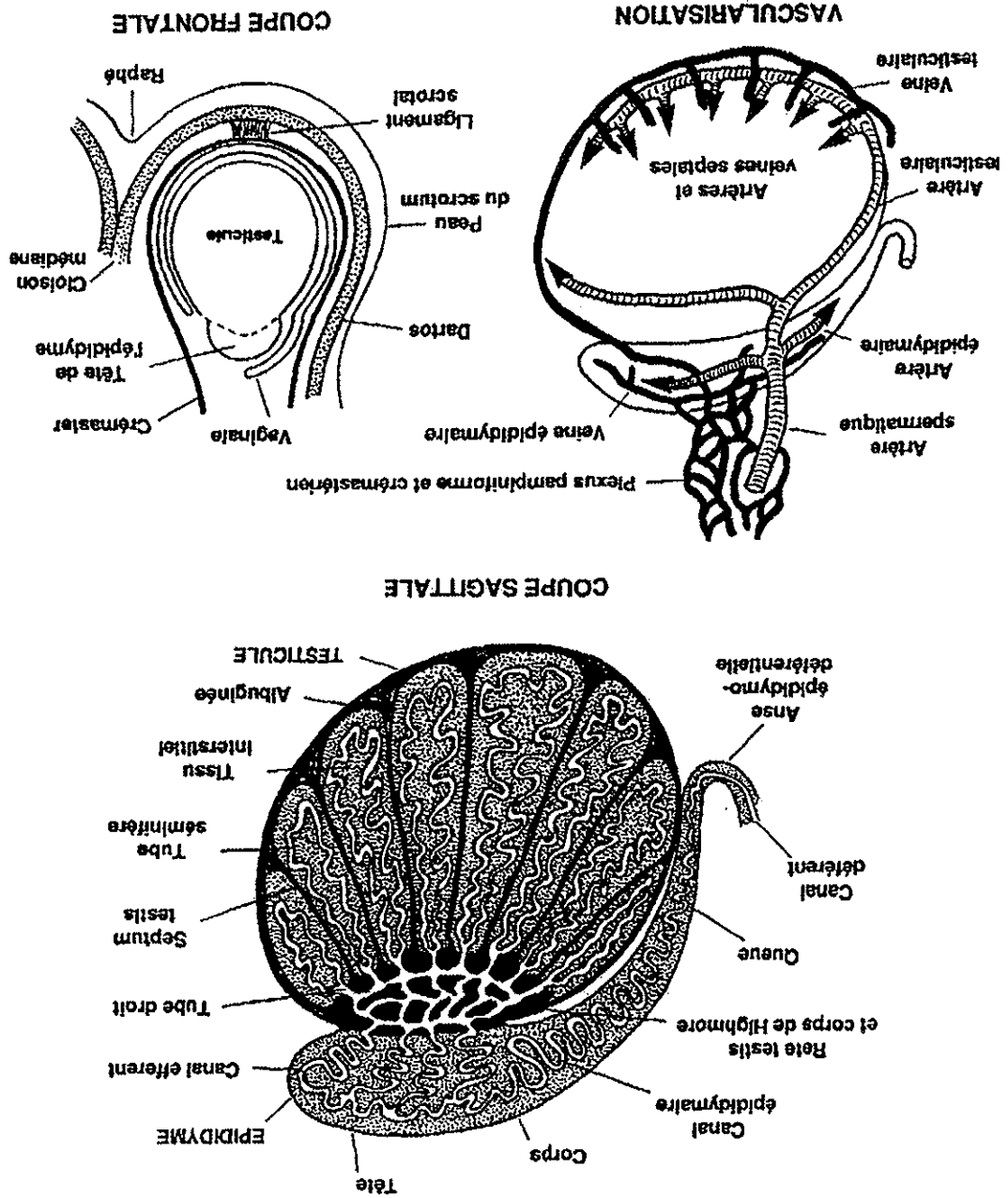


Figure 1 : Organisation générale et vascularisation du testicule et de l'épididyme²⁸ (d'après Czyba et Montella, Biologie de la Reproduction Humaine)

Il est constitué de trois parties : la tête, partie antérieure renflée avec les canaux efférents (au nombre d'une douzaine mesurant une vingtaine de centimètres de long pour un diamètre d'environ 0.2 mm à leur terminaison) et le début du canal épидидymaire ; le corps, séparé du testicule par le sillon épидидymo-testiculaire, avec la plus grande partie du canal

2) Épididyme

Les tubes séminifères débouchent par de courts tubes droits dans le réseau labyrinthique du rete testis creusé dans le tissu fibreux du corps de Highmore. Tubes droits et rete testis constituent les voies spermaticques intra-testiculaires.

interstitielle du testicule, siège de la fonction endocrine (production et excrétion des hormones au contact des capillaires, les îlots de cellules de Leydig dont l'ensemble constitue la glande des spermatozoïdes et du liquide séminal primitif). Dans les espaces interstitiels sont situés, cellules de Sertoli et sont le siège de la fonction exocrine du testicule (production et excrétion lymphatiques. Les tubes séminifères contiennent les éléments de la lignée germinale et les interstitiels sont remplis d'un tissu conjonctif lâche riche en capillaires sanguins et 1.5 m de long pour un diamètre de 150 à 300 µm. Entre les tubes séminifères, les espaces Chaque lobule testiculaire contient 2 ou 3 tubes séminifères mesurant de 30 cm à qui délimitent 200 à 300 lobules testiculaires.

Le testicule est enveloppé d'une albuginée conjonctive formée de faisceaux de fibres collagènes et peu extensible. Au pôle supérieur du testicule, un épaississement conjonctif constitue le corps de Highmore relié à l'albuginée par des cloisons radiaires, les septa testis,

1) Testicule

enveloppes musculaires et fibreuses.

recouverts par le sac séreux de la vaginale qui est elle-même entourée par plusieurs embryonnaires, les hydatides pédiculées et sessiles. Testicule et épидидyme sont en partie antérieure et renflée, la palpation met en évidence les petites masses kystiques des reliquats environ 5 cm de long et se poursuit par le canal déférent ; au contact de son extrémité d'épaisseur et le volume de 16 ml. Chaque testicule est coiffé par l'épididyme qui mesure masses ovoïdes dont les dimensions sont d'environ 5 cm de long, 3 cm de large et 2.5 cm A l'intérieur du scrotum, chez l'homme adulte, les deux testicules constituent deux

La vascularisation du testicule et de l'épididyme est assurée par l'artère spermatique, anastomosée avec les artères déférentielle et funiculaire. L'artère spermatique se distribue en deux artères épидидymaires (antérieure pour la tête, postérieure pour le corps et la queue) et en deux artères testiculaires, interne et externe. Les artères testiculaires forment un réseau dans l'albuginée à l'origine de branches septales qui se poursuivent par les capillaires du tissu

4) Vascularisation

A l'intérieur du scrotum, le testicule est entouré de plusieurs enveloppes : la vaginale ; le crémaster, muscle strié émanant des muscles petit oblique et transverse ; la tunique fibreuse profonde qui recouvre le crémaster ; le dartos, constitué de fibres musculaires lisses, qui participe à la formation de la cloison médiane entre les deux loges testiculaires ; la peau du scrotum.

3) Scrotum

Lors du transit épидидymaire, sous l'influence des sécrétions des cellules glandulaires, les spermatozoïdes subissent une maturation progressive qui, pour l'essentiel consiste dans : l'acquisition de la mobilité, l'achèvement de la condensation de la chromatine nucléaire, des transformations membranaires qui font apparaître l'aptitude à reconnaître la zone pellucide et à fusionner avec la membrane ovocytaire.

Dans la tête et le corps de l'épididyme, les cellules glandulaires constituant la paroi du canal épидидymaire synthétisent et excrètent des glycoprotéines spécifiques (Specific Epididymal Proteins : SEP), de l' α -1 4 glucosidase, des sialoprotéines, de la glycéro-phosphorylcholine (GPC), de l'inositol et du lactate. Dans la région du corps, les cellules épидидymaire. Dans la queue, à partir des acides gras sanguins, les cellules synthétisent des lipides.

épидидymaire. Dans un tissu conjonctif dont l'épaississement périphérique constitue l'albuginée mètres de long pour un diamètre d'environ 0.5 mm. L'ensemble des canaux est enveloppé du canal épидидymaire et le début du canal déférent. Le canal épидидymaire mesure de 5 à 7 épидидymaire; la queue, accolée à la face externe du testicule et qui contient la partie distale

D'une longueur d'environ 2 cm pour un diamètre de 1 mm, ils sont pratiquement entièrement contenus dans la prostate qu'ils traversent pour venir s'aboucher à la paroi postérieure de l'urètre, au milieu du *veru montanum*, de part et d'autre de l'utricule prostatique.

2) Les canaux éjaculateurs

Ils font immédiatement suite aux canaux épидидymaires et sont contenus dans le cordon spermatique des anatomistes. Ils mesurent environ 40 cm de longueur pour un diamètre d'environ 2 mm. Chaque canal traverse le canal inguinal et la fosse iliaque puis se recourbe vers le bas-fond vésical où il se continue par le canal éjaculateur. Dans sa portion terminale il présente une dilatation allongée sur 4 à 7 cm : l'ampoule du déférent.

1) Les canaux déférents

Les deux canaux déférents et les deux canaux éjaculateurs constituent les derniers segments des voies spermatiques extra-testiculaires. Les canaux éjaculateurs débouchent dans l'urètre prostatique, premier segment de la voie génito-urinaire.

B) LES VOIES EXCRETtrices DES SPERMATOZOIDES ET DU SPERME

L'innervation du testicule et de l'épididyme provient du plexus spermaticque(parasympathique) et du plexus déférentiel (sympathique). Il s'agit de fibres vaso-motrices et de fibres « efféctrices » qui se terminent au contact de la membrane propre des tubes séminifères.

Le scrotum reçoit des branches du nerf honteux interne.

5) Innervation

La vascularisation du scrotum est indépendante (artères honteuses et veines scrotales), sanguins jusqu'au carrefour aortique.

Les vaisseaux lymphatiques en provenance du testicule suivent le trajet des vaisseaux pampiniforme et crémastérien.

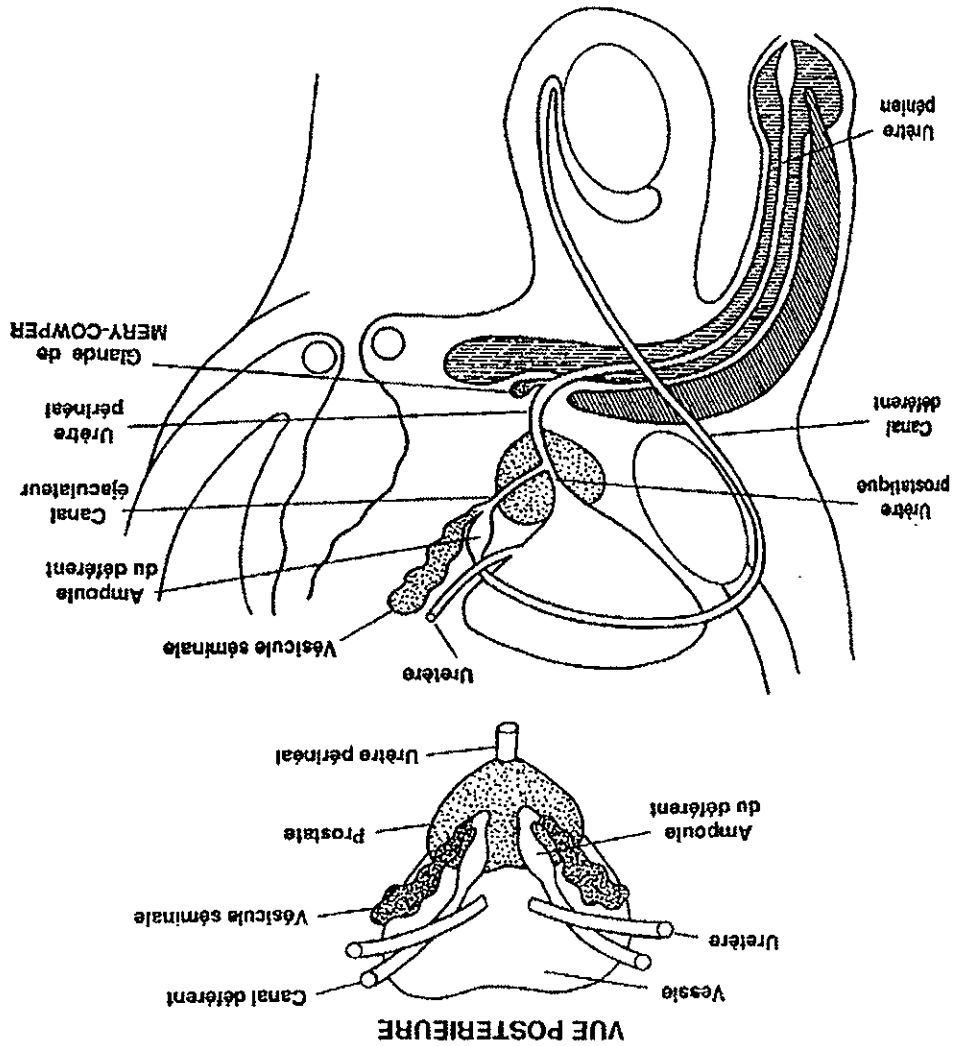
interstitiel. Les veines épидидymaires et testiculaires aboutissent aux plexus veineux

L'urètre prostatique traverse verticalement la prostate sur une longueur d'environ 3cm. La forme de la lumière varie selon le niveau considéré ; dans la région du *verru montanum*, elle est déformée pour figurer un croissant à branches postérieures. Les canaux collecteurs des glandes prostatiques viennent s'ouvrir à travers la paroi.

L'urètre périnéal (membraneux) suivi de l'urètre pénien (spongieux) constitue un canal à lumière aplatie transversalement sauf au niveau du méat urinaire où elle est disposée verticalement.

3) L'urètre

Figure 2 : Les voies excrétrices des spermatozoïdes et du sperme et les glandes annexes (d'après Czyba et Montella²⁸)



C) LES GLANDES ANNEXES

1) Les vésicules séminales

Elles apparaissent comme des organes à surface bosselée, très irrégulières, de dimension très variable selon les individus : de 1 à 8 cm de longueur pour 1,5 à 3 cm de largeur. Elles sont constituées d'un ou plusieurs tubes pelotonnés d'une longueur de 5 à 12 cm. Ces tubes sont collectés par un court canal excréteur qui débouche dans la voie spermatique à l'union du canal déférent et du canal éjaculateur.

L'épithélium est constitué d'une couche de cellules glandulaires prismatiques qui élaborent un liquide de composition complexe, la plasma séminale, à pH alcalin. Les vésicules en contiennent environ 2,5 ml. Parmi les principaux composants, nous relèverons :

- du **fructose** produit à partir du glucose ;
- des protéines diverses, parmi lesquelles : la lactoferrine qui masque les antigènes de surface des spermatozoïdes, des facteurs de décapacitation des spermatozoïdes, des facteurs responsables de la coagulation du sperme, des facteurs immuno-dépresseurs ;
- des prostaglandines.

2) La prostate

La prostate est un organe musculo-glandulaire, de la forme et de la taille d'une petite châtaigne, adhérant à la face inférieure de la vessie et traversé par l'urètre prostatique qui reçoit, dans sa partie moyenne, les deux canaux éjaculateurs (carrefour urogénital). L'urètre est entouré d'un sphincter à chacune de ses deux extrémités. L'essentiel du parenchyme est de nature glandulaire. La prostate est entourée d'une capsule fibro-élastique.

Le sphincter lisse de la prostate (ou sphincter interne) est une extension du trigone de la vessie. Il entoure la partie supérieure de l'urètre dont il est séparé par du parenchyme (glandes intra-sphinctériennes). Le sphincter strié (ou sphincter externe) forme un anneau à la partie inférieure de la prostate ; ses fibres se prolongent pour constituer une lame disposée sur les faces antérieure et antéro-latérales de la prostate. Le sphincter lisse, par sa tonicité en dehors de la miction, assure de façon permanente un obstacle à l'écoulement de l'urine vésicale ; le sphincter strié est l'agent de l'occlusion vésicale volontaire.

Les glandes prostatiques sont des glandes tubulo-alvéolaires, au nombre d'une cinquantaine. Leurs canaux excréteurs débouchent dans l'urètre, pour la plupart dans la région

Encore appelées bulbo-urétrales, elles constituent deux petites masses dont le canal excréteur débouche dans l'urètre périnéal avant sa pénétration dans le corps spongieux. Les conduits excréteurs, de 3 à 4 cm de long, présentent une dilatation (sinus excréteur) dans laquelle peut s'accumuler le produit de sécrétion. Le liquide élaboré par les glandes a une constitution voisine de celle du liquide prostatique. Il s'écoule en permanence au cours de l'érection et en plus grande quantité au cours de l'éjaculation. Les glandes de Mery-Cowper sont androgène-dépendantes.

3) Les glandes de Mery-Cowper

du *vern montanum*. Les glandes sécrètent le liquide séminal (0.5 à 1 ml) à pH légèrement acide. Sa composition complexe diffère sensiblement de celle du plasma séminal, et contient en particulier :

- Des électrolytes et des sels minéraux (le magnésium du sperme est d'origine exclusivement prostatique) ;
- Du **zinc** à fortes concentrations, jouant un rôle majeur dans la transformation de testostérone en DHT ;
- De l'**acide citrique** en grande quantité ;
- De la spermine et de la spermidine, composés azotés responsables de l'odeur particulière du sperme ;
- De la phosphorylcholine dont la transformation en cristaux de phosphates de spermine permet l'identification en médecine légale ;
- De nombreuses enzymes : phosphatase acide, facteurs de liquéfaction du sperme...

Toutes les cellules prostatiques contiennent des récepteurs aux androgènes. La structure et la fonctionnement de la prostate sont étroitement androgène-dépendants.

II) LES AZOOSPERMIES

A) DEFINITIONS ET RAPPELS

1) Définition de l'azoospermie

L'azoospermie se définit par l'absence de spermatozoïdes dans le culot de centrifugation de l'éjaculat lors de trois examens successifs à intervalle de 2 mois. Elle est retrouvée chez environ 5 % de tous les couples infertiles étudiés, et chez 10 à 20 % des hommes infertiles présentant une analyse anormale du sperme¹³⁹.

2) Caractère obstructif ou non de l'azoospermie

L'origine obstructive ou non de l'azoospermie est évoquée sur les données de l'anamnèse, de l'examen clinique, des spermogrammes, du bilan biochimique et hormonal (taux de FSH plasmatique, inhibine...) et complétés parfois d'une exploration échographique, chirurgicale voire anatomo-pathologique après biopsie.

L'apport de l'analyse des marqueurs biochimiques séminaux n'est pas négligeable. Parmi les marqueurs étudiés, l'alpha 1-4 glucosidase¹⁶² est un bon critère décisionnel pour différencier une azoospermie excrétoire d'une azoospermie sécrétoire, mais ce n'est pas le seul (fructose). En effet, dans les azoospermies obstructives, le taux d'alpha-glucosidase est diminué par rapport à celui retrouvé dans les azoospermies non obstructives. Le taux d'alpha-glucosidase est exprimé en UI/l ou en mUI/éjaculat. Selon Zöpflgen¹⁶², tous les patients du groupe azoospermie obstructive présentent des taux d'alpha glucosidase < 9 UI/l ou 26 mUI/éjaculat après 6 à 7 jours d'abstinence sexuelle et sous imprégnation androgénique correcte.

Toutefois, les marqueurs biochimiques sont normaux dans les cas d'obstruction bilatérale en amont de l'épididyme. Les marqueurs prostatiques n'ont pas d'intérêt dans la classification choisie des différentes azoospermies.

Cette classification devrait classer les causes différentes d'azoospermie en catégories distinctes qui autant que possible devraient être complètes et avoir des étiologies, présentations, pronostics et traitements communs. Cela permettrait d'enclencher un processus clinique plus sûr, et par conséquent un diagnostic et une prise en charge meilleurs¹²⁴.

Normalement, les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire stimulent le testicule, le testicule produit des spermatozoïdes qui voyagent vers l'extérieur à travers des canaux séminaux fonctionnels. Logiquement, donc, l'azoospermie pourrait être classée en trois catégories selon la cause de l'azoospermie : stimulation hormonale déficiente du testicule, dysfonction testiculaire, et obstruction ou dysfonction des canaux séminaux ; l'origine de l'azoospermie est donc respectivement **pré-testiculaire, testiculaire, et post-testiculaire**. Une classification similaire de l'infertilité masculine a déjà été décrite¹⁶.

4) Nouvelle classification des azoospermies

Traditionnellement, l'azoospermie est classée en « obstructive » et « non obstructive »¹⁰⁹. Dans les cas obstructifs, la spermatogénèse est normale mais il existe une obstruction dans la voie séminale, tandis que dans les cas non obstructifs, la spermatogénèse est déficiente (ou absente).

Cette classification (azoospermie obstructive / non obstructive) s'explique du fait que dans la grande majorité des cas (98 %), il existe soit une obstruction des voies séminales (obstructif) soit une déficience du testicule (non obstructif) ; l'azoospermie hypogonadotrope et la dysfonction du canal éjaculatoire correspondent à 2 % seulement des causes d'azoospermie⁴⁰.

La classification traditionnelle est peut-être artificielle, elle regroupe des étiologies différentes, ce qui peut être la source d'ambiguïté voire d'un mauvais diagnostic. Une nouvelle classification claire, logique et orientée cliniquement est donc nécessaire.

3) Ambiguïté de la classification : azoospermie obstructive ou non obstructive

L'anomalie peut également être d'origine acquise, secondaire à un traumatisme, à une infection ou après vasectomie. Les traumatismes de l'épididyme ou du déférent peuvent se voir après contusion ou traumatisme des bourses, ou après cure chirurgicale de cryptorchidie, de hernie inguinale, d'hydrocèle, de kyste du cordon, de varicocèle. Les infections de l'appareil génital (prostate, épididymite, orchite, déférite), outre les altérations histologiques qu'elles peuvent provoquer, peuvent aussi laisser des lésions scléreuses au

Il existe un obstacle sur les voies séminales. L'anomalie peut être d'origine congénitale. Il peut s'agir de l'agénésie des voies séminales, habituellement bilatérale, mais pas forcément symétrique. L'agénésie peut toucher de façon étagée et plus ou moins importante les voies génitales : oblitération ou absence plus ou moins étendue du déférent, agénésie de l'anse épididymo-déférentielle, sténose épididymaire, absence de captation entre le testicule et la tête de l'épididyme. L'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) serait l'expression clinique d'une forme mineure de mucoviscidose, et doit faire rechercher une mutation du gène CFTR.

c) *Azoospermie post-testiculaire*

Cela inclut les désordres testiculaires qui peuvent être génétiques (syndrome de Klinefelter, délétion de l'Y), acquis (radiothérapie, chimiothérapie, toxiques, torsion testiculaire, orchite due aux oreillons), ou survenir au cours du développement (cryptorchidie, varicocèle). Les spermatozoïdes sont extraits chez environ 50 % des patients⁵⁶. Le pronostic, par conséquent, doit être prudent.

b) *Azoospermie testiculaire*

Cela inclut tous les cas d'hypogonadisme hypogonadotrope central ou périphérique, qu'il soit congénital (syndrome de Kallmann), acquis (traumatisme, tumeur hypophysaire) ou idiopathique. Cela demande une évaluation de la fonction pituitaire (à la fois au niveau fonctionnel et morphologique) et répond très bien à un traitement substitutif de l'hormone déficiente (LH). Après qu'une spermatogénèse correcte ait été restaurée, la grossesse survient parfois sans l'aide de l'AMP.

a) *Azoospermie pré-testiculaire*

■ Orchites et orchitépépididymites bactériennes
 Plusieurs types de bactéries sont impliquées : *Chlamydia*, entérobactéries, gonocoques. L'épididyme est le site initial de l'infection. La persistance de l'orchitépépididymite peut être suivie d'une phase de hyalimisation des tubes séminifères pouvant entraîner un arrêt de la spermatogénèse.

■ Orchites virales
 Plusieurs types de virus ont un tropisme pour le testicule et entraînent des orchites. L'orchite ourlienne est la plus fréquente (15 à 35 %) de ces infections chez l'homme en période pré- et post-pubertaire. L'atteinte de la spermatogénèse est variable selon les individus, on peut observer un arrêt total irréversible ou une récupération de la spermatogénèse avec la présence de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

a) Orchites et orchitépépididymites

1) Atteintes testiculaires par des agents exogènes ou de déterminisme inconnu

B) DIFFÉRENTES ÉTIOLOGIES DE L'AZOOSPERMIE NON OBSTRUCTIVE

Dans certains cas, il est possible de reconstruire les voies séminales par chirurgie. Lorsque l'opération ne réussit pas ou lorsqu'elle n'est pas justifiée comme dans le cas de patients atteints d'ABCD, l'extraction chirurgicale des spermatozoïdes au niveau de l'épididyme peut être réalisée par MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration ou microaspiration des spermatozoïdes au niveau de l'épididyme).
 Les spermatozoïdes devraient ainsi pouvoir être obtenus dans presque tous les cas d'azoospermie post-testiculaire¹¹⁷.

niveau de l'épididyme et du déférent, mais aussi au niveau des canaux éjaculateurs, des vésicules séminales et du rete testis.

Ces aspects comprennent des anomalies du nombre des chromosomes et des anomalies de structure des chromosomes. Kupper et al. (1999) ont estimé que 30 % des cas sévères d'infertilité masculine (azoospermie ou oligoasthénospermie) pouvaient être dus à des anomalies génétiques d'origine chromosomique ou génique⁸³.

2) Atteinte testiculaire d'origine génétique

L'ischémie après torsion testiculaire induit une atteinte de la spermatogénèse qui peut être irréversible si elle dépasse 6 heures.

e) Torsion testiculaire

Un traumatisme est également susceptible d'entraîner de graves altérations de la spermatogénèse.

d) Traumatisme

Par définition, la varicocèle est une tuméfaction molle formée par la dilatation varicueuse des veines du cordon spermatique.

c) Varicocèle

L'altération de la fertilité pourrait exister très tôt, même dans les formes unilatérales. Elle s'aggraverait avec le temps, peut-être du fait de l'hyperthermie prolongée. La biopsie testiculaire montre finalement des altérations d'intensité variable : hypospérmogénèse modérée, syndrome des cellules de Sertoli seules ou arrêt de maturation des spermatozoïdes. cause connue.

Parfois associée à une anomalie des chromosomes sexuels, à un hypogonadisme hypogonadotrope ou à une résistance aux androgènes, elle est le plus souvent isolée et sans

b) Cryptorchidie

a) Anomalies du nombre de chromosomes

α] syndrome de Klinefelter XXXY

Ce syndrome a été décrit pour la première fois par Klinefelter et al (1942) au sujet de patients présentant à la fois une gynécomastie, une azoospermie et un taux de FSH élevé⁸¹. Par la suite, Jacobs et Strong (1959) ont montré que ce syndrome était la conséquence d'une aneuploïdie chromosomique, de type 47 XXY⁷¹. Le syndrome de Klinefelter est l'anomalie la plus commune au niveau du nombre des chromosomes (environ 1 cas sur 800 garçons): quatre-vingt-dix pour cent des hommes affectés présentent la forme classique 47 XXY, mais des formes mosaïques 46 XY / 47 XXY existent aussi. Le syndrome de Klinefelter classique est dû à une non-disjonction méiotique d'un chromosome sexuel, l'X en particulier dans les cellules germinales parentales. Environ la moitié des cas sont liés à des anomalies survenant dans la première phase de la méiose de la spermatogénèse. Les formes mosaïques sont causées par une non-disjonction mitotique du chromosome X après fécondation. L'incidence du syndrome de Klinefelter est de 0.1 % dans la population générale¹⁰² et de 3.1 % dans la population masculine infertile⁶¹.

Dans les formes homogènes, le testicule est classiquement de petite taille avec une azoospermie. Au moment de la puberté, les concentrations de LH s'élèveront au-dessus de la normale puisque des cellules de Leydig anormales secréteront des quantités abaissées de testostérone mais de grandes quantités d'oestradiol. Cette imprégnation hormonale conduira à un aspect gynoïde. L'aspect clinique toutefois, peut varier et inclut un grand spectre de phénotypes, de l'hypogonadisme à une virilisation normale chez des hommes infertiles. Ainsi, le variant mosaïque peut être très proche de la normale, et variable en fonction du taux du mosaïcisme. La taille des testicules peut être normale, l'azoospermie est moins fréquente ; une spermatogénèse focale peut être détectée.

Les patients présentant un syndrome de Klinefelter connaissent une détérioration progressive de leur architecture testiculaire. À partir de la puberté, les tubules séminifères grossissent et se développent éventuellement jusqu'aux derniers stades cellulaires de la spermatogénèse. Avec le temps, les testicules deviennent plus petits et de consistance ferme. Du fait des concentrations constamment élevées de gonadotrophines, les tubules séminifères se fibrosent et se hyalinisent. Leur lumen disparaîtra ainsi que les cellules germinales. Une

hyperplasie des cellules de Leydig est habituelle. Au final, l'histologie du testicule montrera une fibrose extensive et une hyalinisation.

Le syndrome de Klinefelter homogène est donc considéré comme une cause majeure d'infertilité par azoospermie. Toutefois, l'azoospermie n'est pas constante⁵³. La plupart des patients Klinefelter 47 XXY présentent une aplasie germinale à l'examen histologique, tandis que chez quelques patients 46 XY / 47 XXY, une spermatogénèse focale était présente⁴⁵. Seulement quelques cas d'individus homogènes 47 XXY montrant une spermatogénèse focale ont été décrits¹⁰⁶. Des naissances d'enfants normaux ont été décrites à partir de spermatozoïdes extraits du testicule ou de l'éjaculat de sujets Klinefelter homogènes^{114, 143}. Par ailleurs, un fœtus de caryotype 47 XXY a été conçu après injection de spermatozoïdes testiculaires provenant d'un patient Klinefelter homogène¹¹⁵.

Il est donc nécessaire de s'intéresser à la constitution génétique des spermatozoïdes de sujets Klinefelter quand cela est possible. Les patients présentant une oligoasthénospermie ont un taux d'anomalies chromosomiques concernant les chromosomes sexuels de 0,64 % dans le spermatozoïde et présentent 1,07 % de spermatozoïdes diploïdes¹⁰. Ces chiffres sont significativement plus élevés que ceux trouvés dans la population générale (0,37 et 0,25 % respectivement). Le taux de spermatozoïdes haploïdes parmi les patients présentant un syndrome de Klinefelter mosaïque est évalué par FISH de 90,2 à 96,3 %^{22, 94}. Parmi les patients Klinefelter homogènes, le taux de spermatozoïdes haploïdes varie de 76,5 à 92 %^{49, 62}. Tandis que l'hyperpléidie des chromosomes sexuels varie entre 0,9 et 2,5 % dans la forme mosaïque, son incidence dans la forme non-mosaïque varie de 3,48 %⁶² à 21,76 %⁴⁹. Toutes ces études analysant les anomalies chromosomiques de spermatozoïdes provenant de sujets Klinefelter ont été réalisées sur des spermatozoïdes éjaculés.

L'analyse chromosomique de cellules intratesticulaires provenant de deux patients Klinefelter homogènes présentant une spermatogénèse résiduelle intratesticulaire a montré 100 % d'hyperpléidie (47 XXY) dans les 630 cellules de Sertoli et dans les 30 spermatozoïdes et les spermatozoïdes de 1^{er} ordre, 30 % d'hyperpléidie (24 XY et 24 XX) parmi les 51 spermatozoïdes de 2nd ordre et spermatozoïdes et 20-25 % d'hyperpléidie parmi les 45 spermatozoïdes⁵⁰. Malgré le faible nombre de cellules analysées, cette étude montre que les spermatozoïdes 47 XXY sont capables de réaliser le processus de la spermatogénèse pour aboutir à la formation de spermatozoïdes matures et présentant un nombre normal de chromosomes sexuels (23X ou 23Y). D'un autre côté, la proportion relativement élevée de

C'est la fusion apparente entre deux chromosomes acrocentriques qui aboutit à la formation d'un chromosome métacentrique. L'impact de ces translocations sur la spermatogénèse est

Translocation robertsonienne

Ces anomalies sont dix fois plus importantes chez l'homme infertile que chez l'homme fertile. Plusieurs chromosomes peuvent être impliqués tels que les chromosomes 1, 3, 5, 6, 9 et 10. Plusieurs types d'anomalies sont observées.

▪ Autosomes

Ces anomalies peuvent affecter aussi bien les autosomes que les chromosomes sexuels.

b) Anomalies de structure des chromosomes

▪ D'autres mosaïques sont possibles : XX, XY/XO, mais aussi des translocations entre X et autosomes, entre Y et autosomes. Il existe surtout des anomalies de structure de l'Y.

Le phénotype est habituellement féminin, mais des testicules en position abdominale peuvent être présents. Une ambiguïté sexuelle est possible.

▪ Dysgénésie gonadique mixte (45X0 / 46XY)

β] autres anomalies des gonosomes

Donc, jusqu'à maintenant, des études montrant un faible taux d'anomalies des chromosomes sexuels dans les spermatozoïdes de patients Klinfehter étaient encourageants pour leur utilisation en ICSI. Toutefois, les couples recourant à la PMA quand le partenaire mâle est atteint du syndrome de Klinfehter devraient bénéficier d'informations complètes sur le risque de produire des embryons ou des enfants atteints par cette anomalie chromosomique ou par un triplo X. Un diagnostic pré-implantatoire concernant les embryons à réimplanter chez la femme pourrait être utile. Le diagnostic prénatal pourrait parfois être discuté.

parmi les spermatozoïdes affectés des anomalies chromosomiques chez les sujets Klinfehter. méiotique. Cet événement est probablement associé à une incidence élevée de mort cellulaire sexuels montre la progression difficile des cellules germinales 47 XXY durant le processus spermatides et de spermatozoïdes matures détenant un nombre normal de chromosomes

Des délétions importantes du chromosome X sont incompatibles avec le développement d'un fœtus mâle (par atteinte de multiples organes). Deux types d'atteintes peuvent être mentionnées :

- la microdélétion Xp22-pter liée à un syndrome polymalformatif, avec le syndrome de Kalmán dû à la perte du gène KALIG-1
- les translocations du chromosome X sur les autosomes où les patients présentent des oligo- ou des azoospermies dues, en général, à des arrêts de la spermatogenèse au stade de la méiose.

Anomalies du chromosome X

■ Chromosomes sexuels

Une trentaine de translocations autosomiques recensées sont associées à une atteinte de la spermatogenèse. D'autres seront probablement identifiées dans les années à venir. Certaines translocations influencent directement la spermatogenèse. Elles peuvent être transmises aux générations suivantes et donc pourraient poser, là aussi, des problèmes lors du choix d'une aide médicale à la procréation. Toutefois, ces anomalies n'ont aucun caractère spécifique, et leur association avec des troubles de la spermatogenèse est le plus souvent fortuite.

Translocations autosomiques

Cette anomalie est due à la délétion d'un seul gène situé sur le chromosome 17q24-q25. chez ces individus, le caryotype est 46XY, le phénotype est féminin, on observe un arrêt complet de la spermatogenèse.

Dysplasie campomélique

Ces inversions sur les chromosomes sont associées à une atteinte de la lignée germinale ici aussi très variable, mais ce sont le plus souvent des hommes tout à fait normaux.

Inversion para et péracentrique

intermédiaire de la lignée germinale, mais la spermatogenèse est le plus souvent normale. imprévisible, il peut aller d'un défaut complet de la spermatogenèse à un développement

c) Anomalies génétiques

Il existe des mutations génétiques affectant le chromosome Y et le gène du récepteur des androgènes⁸³.

[α] anomalies du chromosome Y

Le chromosome Y est responsable de la différenciation sexuelle du testicule grâce en particulier au gène SRY localisé sur le bras court du chromosome. Le chromosome Y contient aussi des gènes impliqués dans la spermatogenèse. En effet, il y a plus de 20 ans, Triepolo et Zuffardi (1976)¹⁴⁰ avaient montré par des études de cytogénétique que les délétions sur le chromosome Y étaient associées aux stérilités, suggérant ainsi la présence de gènes clés de la spermatogenèse sur le bras long (q) du chromosome Y.

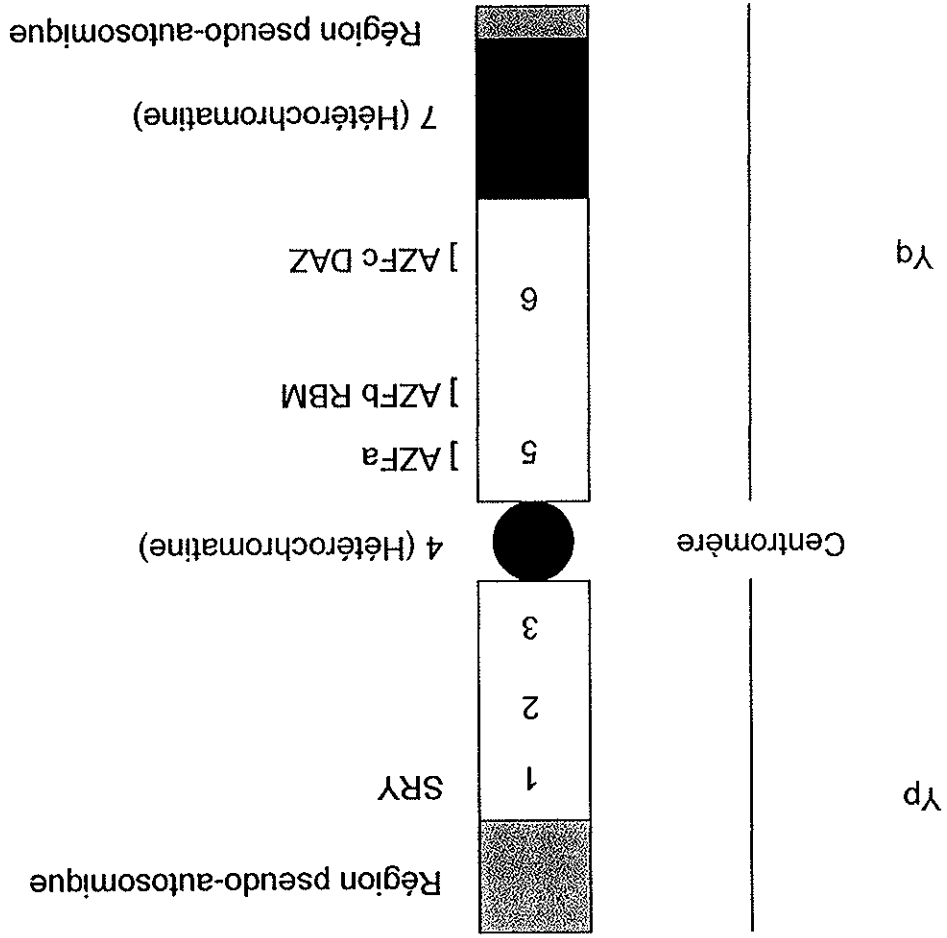
Globalement, trois types d'anomalies sont décrites :

- les délétions du gène SRY : SRY oriente la différenciation sexuelle, il est localisé sur la portion Yp. Les patients ont un phénotype féminin avec une dysgénésie gonadique et un caryotype 46XY. Une autre famille de gènes potentiellement importante pour la spermatogenèse TSPY est localisée dans la partie Yp. Ces gènes sont transcrits dans les spermatogonies et les spermatoocytes. Ils pourraient avoir des fonctions dans la différenciation des spermatozoïdes mais aussi d'autres fonctions au cours de la spermatogenèse.
- les délétions dans Yq11 : elles sont associées avec des oligospermies et même des azoospermies sévères. Les portions du chromosome Y impliquées dans le contrôle de la spermatogenèse semblent se situer vers Yq11.21-23 ;
- les microdélétions dans la région Yq11 : elles pourraient être en rapport avec au moins un tiers des azoospermies sévères.

Les microdélétions dans la région Yq11.21-23 (correspondant à AZF) apparaissent directement liées à la seule atteinte de la spermatogenèse, le phénotype étant normal par ailleurs. Trois à cinq loci AZF en rapport avec la prolifération des cellules germinales sont actuellement identifiées.

AZFα correspondrait à une atteinte de la spermatogenèse rencontrée dans le syndrome des tubes vides (« *Sertoli cell only syndrome* »). Les gènes situés dans le locus AZFα comprendraient USF9Y (ubiquitin specific protease 9, chromosome Y) et DBY (dead box on the Y).

Figure 3 : Anatomie du Chromosome Y



AZFb correspond à des gènes de la famille RBM (gènes codant des protéines se liant à l'ARN). RBM1 s'exprime dans les cellules germinales fœtales, les spermatogonies et les spermatozoïdes. Une délétion de RBM1 est en rapport avec une atteinte de la spermatogénèse avec une perte de toutes les cellules germinales.

AZFc comprend plusieurs copies du gène DAZ (deleted in azoospermia), codant pour une protéine se liant à l'ARN. Les patients dépourvus du gène DAZ montrent au niveau testiculaire un large éventail de phénotypes histologiques différents^{111, 112} : de l'absence complète de cellules germinales (Sertoli cell only syndrome) à l'arrêt méiologique avec production occasionnelle de spermatozoïdes matures et condensées. Par ailleurs, certains patients déletés du gène DAZ présentent une spermatogénèse suffisante pour avoir des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Un autre gène se trouve sur le locus AZFc, près de DAZ : le gène SPGY (*Spermatogenesis Gene on the Y*) semblant être aussi important pour la spermatogénèse car ses délétions sont associées à des atteintes de la spermatogénèse comparables à celles observées dans les délétions de DAZ, gène avec lequel il présente des analogies structurales.

La nature sécrétoire de l'affection doit être établie par l'examen clinique, les dosages hormonaux et la biochimie séminale. L'analyse génétique des patients débutera ensuite par l'établissement du caryotype, qui fait partie du bilan normal à réaliser pour ce genre d'infertilité masculine, et par une proposition d'étude moléculaire du chromosome Y, étude réalisable actuellement dans des laboratoires de plus en plus nombreux. Ces deux analyses relèvent en effet des mêmes indications. Il n'existe pas de seuil fixe dans les chiffres du spermogramme au-dessus duquel ces examens se révèlent systématiquement normaux mais la plupart des équipes s'accordent sur le fait que l'analyse chromosomique soit réalisée lorsque le nombre de spermatozoïdes par ml est inférieur à 10 millions et que la recherche de

Si les premières études concernant la recherche des microdélétions du chromosome Y ont principalement porté sur des populations d'hommes azoospermiques ou oligospermiques sévères, la constatation d'atteintes très variables de la spermatogénèse, à la lecture de biopsies testiculaires effectuées chez des hommes délétes¹¹¹, et même d'oligospermies plus modérées (5 millions de spermatozoïdes/ml) chez certains d'entre eux⁵⁷, rend difficile l'établissement de relations génotype-phénotype fiables et la sélection des patients chez qui cette recherche doit être effectuée.

L'intérêt est de savoir si la présence de microdélétions donne quelque chance d'extraire des spermatozoïdes. Selon Brandell et al. (1998)¹⁷, 11 % des patients azoospermiques présentaient des microdélétions. Il semble que les microdélétions limitées à la région AZFc (la plus distale et contenant le gène DAZ) permettent dans de nombreux cas de retrouver des spermatozoïdes à la biopsie testiculaire. Par contre, la présence de délétions englobant la région AZFc et s'étendant au delà (dans les régions AZFb et AZFc) tend à être associée à une absence complète de spermatozoïdes.

Environ 7 % de tous les hommes se présentant pour bilan d'infertilité se trouveraient atteints de microdélétions du chromosome Y¹¹⁰. La fréquence de détection d'anomalies du chromosome Y dépend dans une certaine mesure du degré de trouble de production des spermatozoïdes⁵⁷. Chez des hommes présentant une azoospermie ou une sévère oligospermie, près de 18 % auront des anomalies du chromosome Y détectables par PCR¹⁰¹.

L'identification de plusieurs anomalies du chromosome Y associées avec une infertilité masculine majeure a rendu le concept de « facteur azoospermique » improbable¹⁶⁰. Au contraire, il semble que de multiples facteurs soient responsables d'une spermatogénèse déficiente, incluant les délétions de portions du chromosome Y⁸⁵.

L'incidence de ce syndrome est de 1 pour 1 000 à 5 000 naissances. Il se traduit par plusieurs malformations avec chez la moitié des hommes atteints une cryptorchidie bilatérale et une stérilité avec un arrêt de la spermatogénèse (peut-être en rapport avec l'augmentation de la température testiculaire). Toutefois, l'infertilité est loin d'être la règle dans ce syndrome.

Syndrome de Noonan

[β] Autres anomalies géniques

adulte.

qu'ils seront susceptibles de connaître eux-mêmes des problèmes de reproduction à l'âge donnée comme certitude le fait que tous les garçons hériteront du chromosome Y paternel et d'affirmer un risque génétique supplémentaire chez les enfants nés après ICSI. Seule doit être donner d'autres pathologies que leur infertilité, aucune donnée scientifique actuelle ne permet des grossesses évolutives⁸³. Etant donné que ces délétions sont présentes chez les pères sans testiculaire en cas d'azoospermie, sont parfaitement féconds et capables de donner lieu à soient récupérés directement dans le sperme en cas d'oligospermie ou après biopsie descendance. Il apparaît en effet que les spermatozoïdes porteurs de telles délétions, qu'ils également présentes au niveau germinatif et sont donc susceptibles d'être transmises à la à ces nouvelles thérapeutiques. Mises en évidence au niveau somatique, ces délétions sont délétion moléculaire du chromosome Y chez un patient peut difficilement lui interdire l'accès *in vitro* par ICSI mais impose une proposition de diagnostic prénatal, la découverte d'une homme infertile ne représente pas une contre-indication à la pratique d'une fécondation *in* De la même manière que l'existence d'une translocation chromosomique chez un chromosomes Y anormaux dans les cellules somatiques.

délète ont déjà été décrits, ce qui laisserait supposer une instabilité particulière de ces recherche de délétions moléculaires de l'Y mais des cas de mosaïques 45, X/46, XY avec l'Y translocation équilibrée, etc.) suffit à expliquer l'infertilité chez un homme et rend inutile la A priori, la découverte d'une anomalie chromosomique (syndrome de Klinefelter, précisés.

fertiles dans une de leurs études, sans toutefois que les spermogrammes de ces hommes soient par ml, bien que Pryor et al (1997)¹¹⁰ aient décrit 4 cas de microdélétions chez 200 témoins microdélétions de l'Y soit pratiquée pour des chiffres encore plus bas, inférieurs à 1 million

Le système neuro-endocrinien est indispensable à l'initiation, au maintien et à la restauration de la spermatogénèse. L'action hormonale ne s'exerce pas directement sur les cellules germinales, mais plutôt sur les cellules somatiques. Les anomalies du système endocrinien qui conduisent à une atteinte de la spermatogénèse sont bien connues chez l'homme, mais elles ne permettent d'expliquer qu'environ 3 % des stérilités masculines. L'atteinte, dans certains arrêts de la spermatogénèse, du relais intratesticulaire au système hormonal pourrait être aussi impliquée.

3) Atteintes d'origine endocrinienne

La découverte des bases génétiques de l'infertilité masculine en est encore à ses premiers pas mais de rapides progrès sont réalisés dans ce sens. Une classification génétique des azoospermies pourrait constituer une approche intéressante

Des défauts dans les antigènes HLA de classe I pourraient prédisposer à une azoospermie idiopathique⁹⁷. Leur étude montre que la fréquence des HLA-A33, B13 et B44 est significativement augmentée chez les hommes japonais présentant une azoospermie idiopathique en comparaison à des contrôles normaux. Dans le même sens, Van der Ven et al. (2000)¹⁴⁹ ont montré des différences dans la constitution des allèles HLA de classe 2 entre des hommes présentant une infertilité et des hommes normozoospermiques.

γ] Influence du HLA

Syndrome du mâle XX (46 XX)

Les hommes présentant une azoospermie associée à un caryotype 46 XX sont retrouvés moins fréquemment (1 / 20 000 nouveaux-nés et 2 % des hommes infertiles). Le développement d'un phénotype mâle chez ces patients est dû à une translocation du bras court du chromosome Y (contenant le gène SRY) sur le bras court du chromosome X durant la méiose. Le phénotype de ces hommes dépend de l'endroit de la cassure sur le chromosome Y. Ces patients ont une réduction du volume testiculaire, leur épithélium séminifère ne contient que des spermatozoïdes allongés, et il est possible d'observer une azoospermie au niveau de l'éjaculat.

Les origines génétiques ainsi que les mécanismes à l'origine de cette affection sont inconnus. On observe chez ces individus un déficit en FSH, le phénotype est masculin, la spermatogénèse est altérée allant de l'absence des cellules germinales avec des tubes vides (« *Sertoli cell only syndrome* ») à un arrêt au niveau des spermatozoïdes avec quelques rares spermatozoïdes. Le syndrome de déficit isolé en LH est connu aussi sous le nom de syndrome de l'œunogue fertile : son origine génétique n'est pas encore connue. Le testicule présente une baisse de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse, mais tous les types de cellules germinales sont présents, y compris des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Une activité hormonale normale et une correction de l'hypogonadisme peuvent être obtenus dans les déficits isolés en FSH ou

- Déficit isolé en LH et FSH

C'est un syndrome polymalformatif rare avec hypogonadisme hypogonadotrophique. Au niveau testiculaire, il existe une atteinte de la spermatogénèse (arrêt au niveau des spermatozoïdes) et de la stéroïdogénèse, probablement due à une atteinte centrale.

- Syndrome de Laurence-Moon-Bardet-Biedl

Ce syndrome associe une cryptorchidie, une petite taille, un retard mental et une obésité. Son origine serait liée à une anomalie dans la région q11-13 du chromosome 15 ayant comme conséquence une anomalie fonctionnelle de l'hypothalamus (GnRH). Le traitement hormonal substitutif permet l'induction de la spermatogénèse.

- Syndrome de Prader-Labardt-Willi

L'incidence de cette anomalie est de 1 pour 7 000 à 8 000 naissances. Ce syndrome a pour origine une absence ou une mutation d'un gène KALIG-1 (KAL-1) localisé sur le chromosome X. La conséquence de cette anomalie est d'empêcher la migration des neurones à GnRH dans l'hypothalamus du cerveau fœtal. L'absence de FSH et de testostérone explique le développement insuffisant de la spermatogénèse. Ces patients sont en général azoospermiques et la spermatogénèse peut être initiée par administration d'hormones (GnRH ou gonadotrophines).

- Syndrome de Kallmann de Morsier

a) Atteinte du système endocrinien

Le récepteur aux androgènes appartient à la superfamille des récepteurs stéroïdes. Il est constitué de trois principaux domaines fonctionnels. La régulation de la transcription est médiée par des séquences N-terminales. Il existe par ailleurs des régions de liaison à l'ADN et aux hormones. Chez l'homme, le récepteur aux androgènes, s'il se présente sous une forme muée, entraîne des anomalies de virilisation chez des personnes 46 XY. Ces affections surviennent avec une incidence de 1 pour 50 000 naissances. Les phénotypes sont divers, de phénotypes féminins en passant par des phénotypes ambigus jusqu'à des phénotypes mâles présentant seulement un léger défaut de masculinisation⁶⁷. La forme extrême de cette affection présente une absence (ou non action) du récepteur des androgènes et correspond à la dénomination du « testicule féminisant ». Les patients ont un phénotype féminin avec un

transcription des gènes cibles dans ces cellules. La dihydrotestostérone agissent par le biais du récepteur aux androgènes (AR) pour réguler la synergique avec la FSH pour assurer la maturation des spermatozoïdes¹³⁸. La testostérone et testostérone. La testostérone permet de prévenir l'apoptose des cellules de Sertoli de manière La spermatogénèse dépend du métabolisme des androgènes, principalement de la

- Atteinte des récepteurs des androgènes

modérée. être corrigé par administration de testostérone chez les patients où l'affection revêt une forme température dans la gonade en position intra-abdominale. L'arrêt de la spermatogénèse peut testostérone entraîne une atteinte de la spermatogénèse, aggravée par l'augmentation de la et des testicules qui restent en position abdominale ou inguinale. A l'âge adulte, la baisse de la anomalies de la différenciation sexuelle mâle (pseudohermaphrodisme au phénotype femelle) qui se traduisent par des anomalies de développement pendant la vie fœtale, avec des mutations autosomiques récessives entraînent-elles une chute de la production de testostérone importantes pour la biosynthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig. Ainsi, des Les enzymes 17, 20 lyase et 17 β hydroxystéroïde déshydrogénase sont deux enzymes

- Déficit en 17, 20 lyase et 17 β hydroxystéroïde déshydrogénase

b) Atteinte dans la biosynthèse et l'action des androgènes

se situer au niveau de l'hypothalamus. en LH par administration de GnRH, suggérant que le point d'impact de ces anomalies pourrait

caryotype 46 XY, le testicule présente des tubes vides ne contenant que les cellules de Sertoli. De façon intéressante, les patients présentant une insensibilité aux androgènes ont tous un déficit sévère de la spermatogénèse, même dans les formes modérées de résistance aux androgènes.

Le gène du récepteur aux androgènes est localisé sur le chromosome X (en Xq11-12) et les mutations sont héritées de femmes porteuses saines. Il comprend 8 exons codant pour une protéine de 919 acides aminés. A l'intérieur du premier grand exon existe deux régions polymorphes à séquences répétées, une de forme CAG (poly-glutamine) et une autre de forme GGN (poly-glycine). Toutefois, les exons 2 à 8 sont hautement conservés à l'intérieur de la famille des récepteurs stéroïdes.

Avec le clonage du gène du récepteur aux androgènes, plus de 300 patients ont été décrits, avec des mutations différentes⁵⁹. Ces mutations peuvent être décelées à travers le gène entier, affectant tous les domaines majeurs de la protéine AR. Toutefois, même pour la même mutation, le phénotype peut être très variable⁶⁷. Jusqu'à ce jour, 9 hommes ont été décrits, avec un point de mutation distinct sur le gène AR et un déficit sévère de la spermatogénèse sans anomalie de la virilisation. Ces hommes souffraient d'oligotératozoospermie sévère ou même d'azoospermie. Toutefois, chez trois hommes un traitement par clomifène, tamoxifène, ou par des doses élevées d'androgènes a été instauré avec succès conduisant à une augmentation significative de la numération des spermatozoïdes, et même à l'obtention de grossesses.

En conclusion, le gène du récepteur aux androgènes pourrait jouer un rôle important comme déterminant génétique de l'infertilité masculine. Le fait que des hommes infertiles présentant des mutations de l'AR répondent bien à certains traitements doit être exploré. Toutefois, une identification plus poussée des anomalies moléculaires du gène de l'AR chez les hommes infertiles permettra de mieux connaître le mode d'action des androgènes dans le déroulement de la spermatogénèse.

V) FACTEURS PREDICTIFS DE LA PRESENCE DE SPERMATOZOIDES
INTRATESTICULAIRES

1) Histologie

a) Rappel sur la spermatogenèse

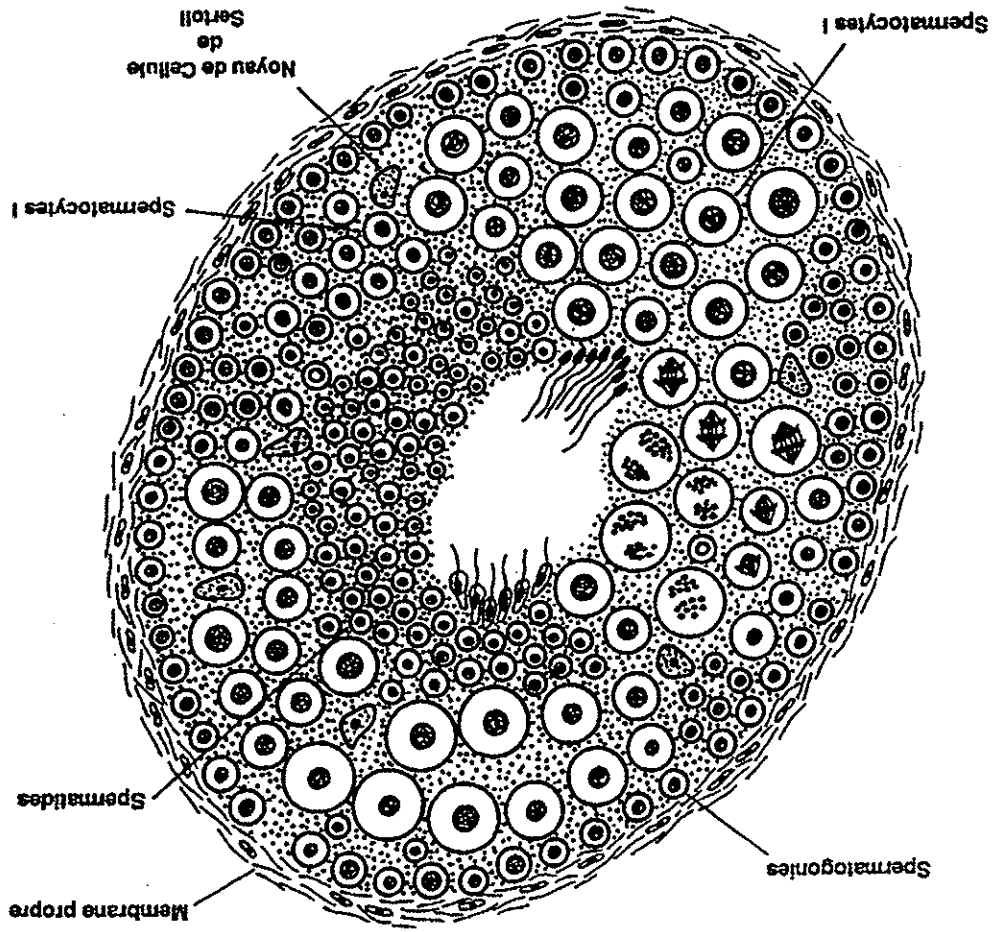


Figure 4 : Coupe transversale d'un tube séminifère (d'après Czyba et Montella²⁸)

Les testicules sont des organes pairs doués d'une double fonction : gamétogène et endocrine. La fonction gamétogène, ou spermatogénèse, est assurée par les tubes séminifères qui à partir de la puberté, sont engagés dans la production généralement continue d'un grand nombre de spermatozoïdes. Les tubes séminifères renferment des cellules appelées cellules de Sertoli et des cellules de la lignée germinale. Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par un tissu conjonctif lâche au sein duquel sont disséminés des petits amas de cellules interstitielles, ou cellules de Leydig.

La spermatogenèse demeure le processus de différenciation qui à partir des cellules souches de la lignée germinale aboutit à la production de spermatozoïdes. Elle se déroule essentiellement en trois phases :

- une phase de prolifération à partir des cellules souches appelées spermatogonies haploïdes.
- une phase de divisions méiotiques aboutissant à la formation de spermatozoïdes appelés spermatozoïdes en spermatozoïdes appelée spermiogenèse.

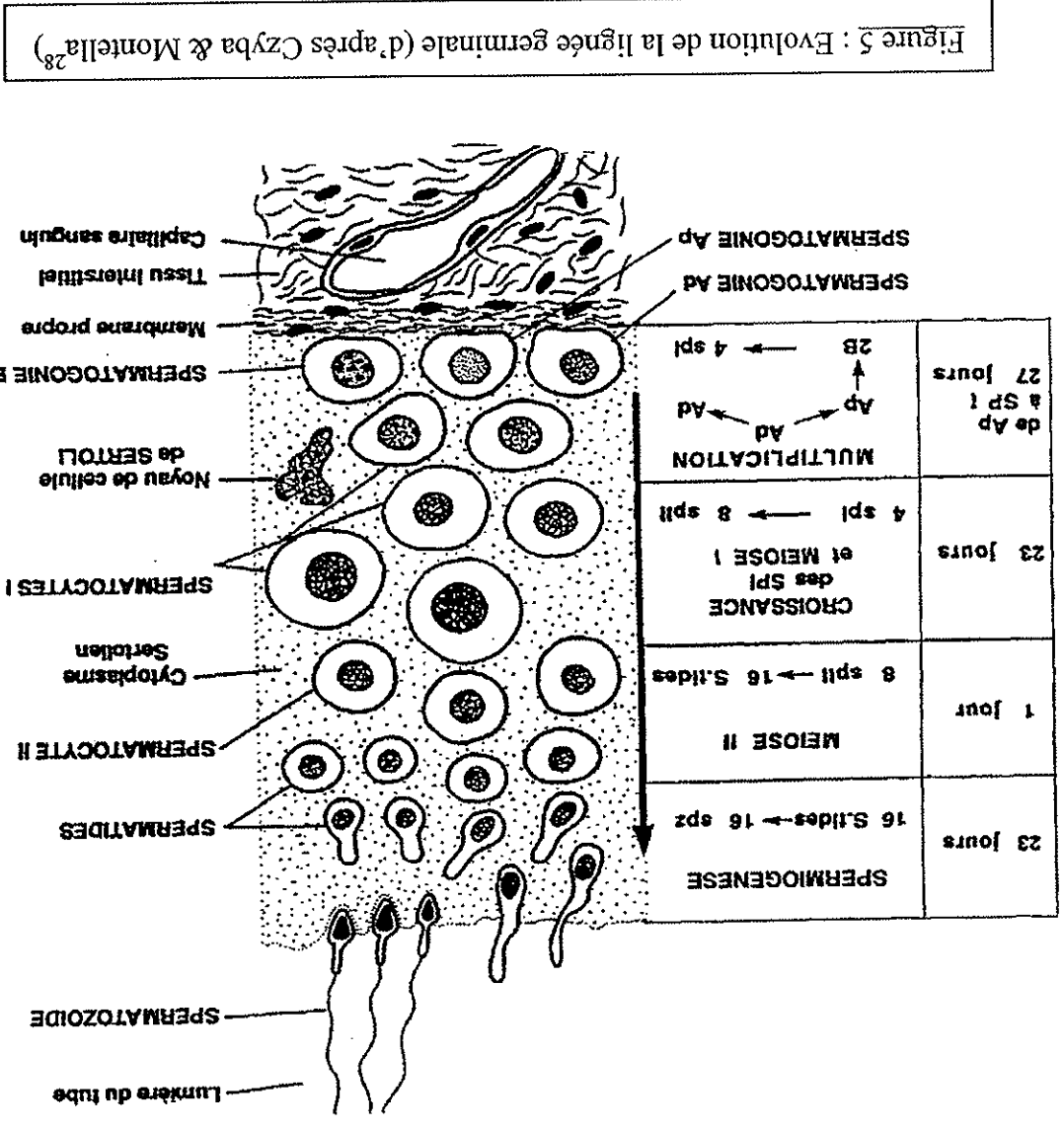


Figure 5 : Evolution de la lignée germinale (d'après Czyba & Montella²⁸)

Laquelle ils deviennent de grandes cellules ovalaires, au noyau arrondi, situées à distance de la

Les spermatoocytes de premier ordre subissent une phase de croissance au terme de

arrondi, foncé avec une chromatine en amas (spermatogonies croûteuses).

chromatine fine et dispersée. Les spermatogonies de type B sont caractérisées par un noyau central. Les spermatogonies type Ap présentent un noyau ovalaire, clair avec une caractérisé par une chromatine finement granuleuse, chromophile occupée par une vacuole décrits en microscopie photomique en fonction de leur aspect nucléaire. La type Ad est séminifères, près de la membrane basale, entre les cellules de Sertoli. Trois types ont été

Les spermatogonies (diamètre 9 à 15 mm) sont localisées à la périphérie des tubes

localisation de la cellule au sein des tubes séminifères.

s'effectue en microscopie optique principalement selon la morphologie (taille et forme) et la fixation, inclusion en paraffine et coupe du matériel testiculaire prélevé. L'identification cytoplasme par une technique bichromique classique (hématoxyline-éosine par exemple) après La visualisation des cellules repose surtout sur la coloration des noyaux et du la classification histologique des troubles de la spermatogénèse.

purement descriptive des différents constituants du testicule et établit les principaux types de

En anatomopathologie, la lecture de la biopsie testiculaire repose sur l'analyse

α] évaluation qualitative (lecture classique)

diagnostique grâce à sa lecture en histologie classique.

obtention d'une grossesse après micro-injection dans l'ovocyte). Elle présente un rôle précieuses au-delà de sa finalité thérapeutique (récupération de spermatozoïdes testiculaires et

La biopsie testiculaire est un matériel de choix qui permet de fournir des informations

b) Lecture de la biopsie testiculaire

défini le cycle spermatogénétique, d'une durée définie chez l'homme (74 jours).

maturation depuis la première division goniale jusqu'au détachement des spermatozoïdes de la réorganisation du cytoplasme. La succession chronologique des différents stades de place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi, l'assemblage des structures du flagelle et

La spermiogénèse concerne la réorganisation du noyau, le développement et la mise en

gaine péritybulaire. La cellule passe par six stades successifs (préleptotène, leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacrinèse) correspondant aux différentes étapes de spiratisation des chromosomes. Le stade zygotène est caractérisé en particulier par l'appariement des chromosomes sous la forme de complexes synaptonémaux. L'identification précise de ces stades nécessite cependant des techniques plus approfondies d'analyse de la méiose.

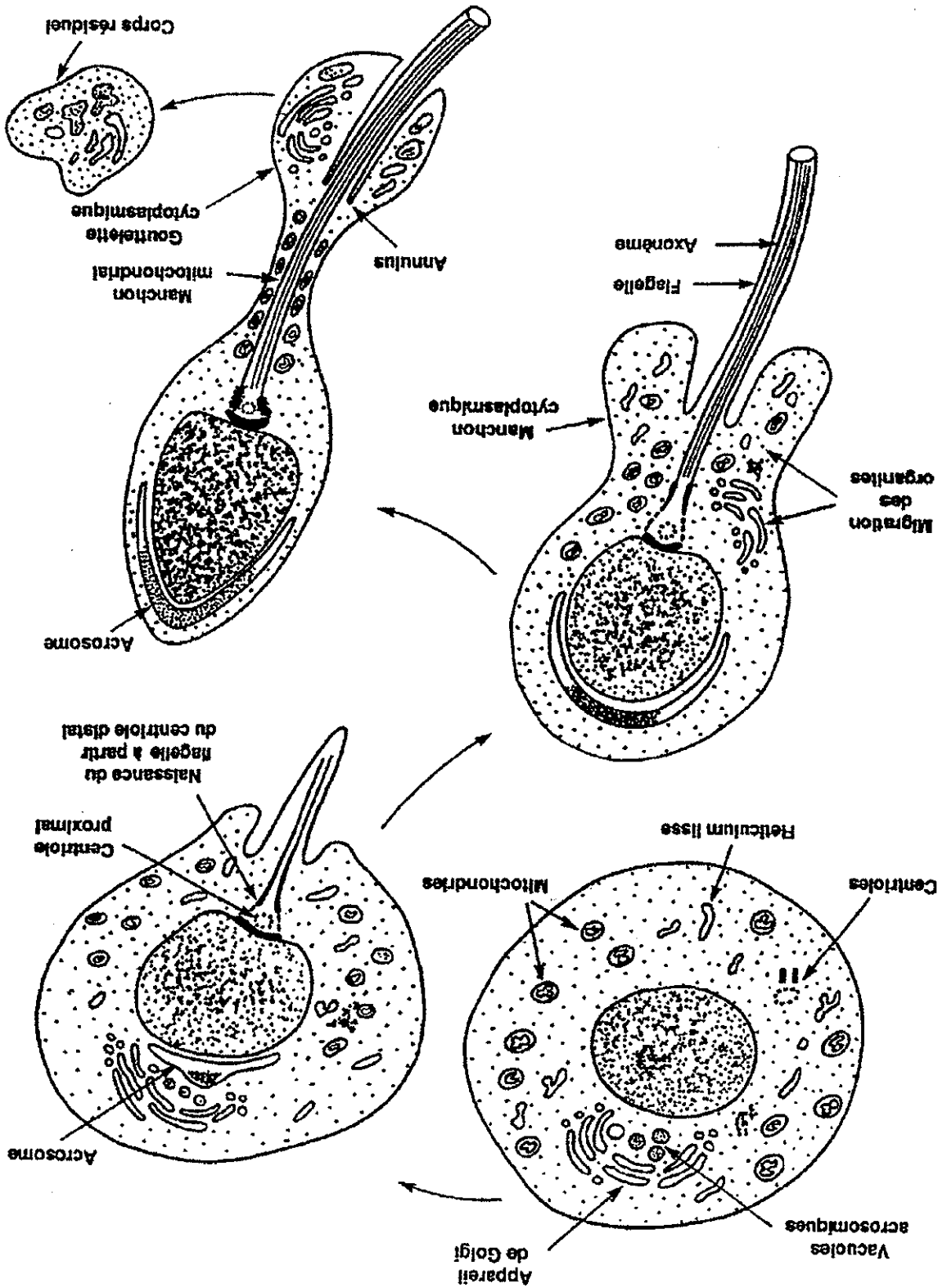
Les spermatozoïdes soulèvent un grand intérêt en procréation médicale assistée puisque la micro-injection de telles cellules dans l'ovocyte génère des grossesses et la naissance d'enfants viables^{46, 136}. En microscopie optique, six types de spermatozoïdes ont été distingués en fonction de la forme du noyau, de l'aspect de la chromatine et de la morphologie générale de la cellule : *Sa, Sb1* (spermatozoïdes ronds), *Sb2, Sc* (spermatozoïdes en élongation), *Sd1, Sd2* (spermatozoïdes matures). En cas de biopsie testiculaire, la technique d'apposition du fragment biopsique sur lame permet l'identification de chacun des types²⁹.

- le stade *Sa* représente au cours de la spermiogénèse la phase de Golgi caractérisée par la formation du granule acrosomique dans la zone de Golgi. La spermatozoïde présente alors un corps cytoplasmique de forme polyédrique et un noyau central contenant un nucléole peu visible. L'appareil de Golgi apparaît sous la forme d'une structure sphérique proche du noyau légèrement colorée à l'acide périodique Schiff.

- *Sb1* représente la phase du capuchon correspondant à la mise en place de la coiffe céphalique. Le granule acrosomique augmente légèrement de volume et s'aplatit partiellement à la surface du noyau, alors que la structure globale de la cellule reste identique au stade *Sa*.
- *Sb2* et *Sc* représentent la phase de l'acrosome. La spermatozoïde subit une série de transformations complexes affectant principalement le noyau et la structure acrosomique. Le noyau migre à la périphérie de la cellule avant de connaître un phénomène d'élongation. Le cytoplasme s'allonge sous la forme d'un lobe le long du flagelle.

- *Sd1* et *Sd2* représentent la phase de maturation durant laquelle la spermatozoïde complète sa métamorphose en spermatozoïde. En microscopie optique est noté essentiellement un allongement considérable du lobe cytoplasmique éliminé sous la forme d'une masse basophile appelé corps résiduel.

Figure 6 : Aspects de la spermiogénèse (microscopie optique). D'après Czyba & Montella²⁸



La spermatogénèse focale réunit le cas des tubules séminifères isolés présentant quelques spermatoïdes dans les champs des tubules séminifères en arrêt de maturation, dans les champs des tubules séminifères présentant un syndrome de cellules de Sertoli seules ou dans les champs des tubules séminifères présentant une sclérose tubulaire.

- une spermatogénèse normale (présence de tous les stades cellulaires mis en jeu dans la spermatogénèse en quantité acceptable dans chaque tube séminifère)
- l'hypospERMATOGÉNÈSE (réduction des cellules spermatogènes normales)
- l'arrêt de maturation (absence des stades tardifs de maturation)
- le syndrome des cellules de Sertoli isolées (absence de cellules germinales dans les tubules séminifères)
- la sclérose tubulaire (absence des cellules germinales ou des cellules de Sertoli dans les tubules)

L'histologie du testicule permet de différencier sur frotis (Levin, 1979)⁸⁷ :

L'identification des spermatoïdes en procréation médicalement assistée n'est pas si aisée. Le geste de dilacération du fragment testiculaire ne permet plus d'identifier les cellules germinales en fonction de leur localisation spécifique au sein du tube séminifère. De plus, la reconnaissance des cellules repose uniquement sur des critères morphologiques¹⁵⁰. Les colorants ou les marqueurs spécifiques de l'acrosome utilisés par Mendoza et al (1996)⁹⁵ pour identifier les cellules rondes ne permettent pas de maintenir la viabilité cellulaire et ne peuvent donc pas être utilisés avant micro-injection. Seul un système optique à contraste de phase ou une méthode de sélection cellulaire sur gradient de Percoll développée par Angelopoulos et al (1997)⁸ semblent pouvoir contribuer à une meilleure identification des cellules germinales.

Les modifications spécifiques de la spermiogénèse (disparition de la manchette, condensation de la chromatine ou acquisition de la structure définitive du flagelle) sont surtout visualisées en microscopie électronique. Il existe cependant une étroite corrélation entre les stades optiques et les huit stades décrits par Holstein (1976)⁶⁸ en microscopie électronique articulant également la spermiogénèse en trois familles : spermatoïdes ronds (stades 1 et 2 ou *Sa/Sb1*), spermatoïdes intermédiaires (stades 3 à 5 ou *Sb2 / Sc*) et spermatoïdes matures (stades 6 à 8 ou *Sd1 / Sd2*).

[β] l'analyse morphométrique

En dehors de la lecture classique, il est possible d'effectuer une analyse morphologique quantitative et semi-quantitative de la biopsie testiculaire. Les méthodes quantitatives basées sur la morphométrie ont permis d'obtenir des données numériques, dans des dimensions telles que le volume des densités de divers compartiments cellulaires, dans le testicule humain normal et pathologique. Cette approche très intéressante en recherche fondamentale possède une faible valeur pronostique et diagnostique en raison d'une méthodologie longue, difficile et minutieuse¹⁵².

Les méthodes semi-quantitatives aboutissent à un score en fonction du paramètre étudié (comme l'épaisseur de la gaine tubulaire ou le nombre de cellules de la ligne germinale), reflétant le développement morphologique ou le degré d'évolution. Ces méthodes impliquant une standardisation de la lecture histologique sont simples, rapides et possèdent une valeur prédictive certaine, déjà démontrée dans de nombreuses pathologies comme la varicocele. De telles méthodes d'analyse commencent à être développées sur les biopsies testiculaires réalisées dans le cadre de l'AMP.

Le score de Johnsen⁷⁴ est un exemple d'analyse histologique semi-quantitative de la biopsie testiculaire. Entre 100 et 200 tubules peuvent être examinés par lame. À chaque lame est attribuée un score : l'aspect des tubules séminifères le plus tardif est évalué sur une échelle de 1 à 10 :

- Score 1 = pas de cellules présentes
- Score 2 = pas de spermatogonies, seulement des cellules de Sertoli
- Score 3 = spermatogonies seules
- Score 4 = quelques spermatoocytes
- Score 5 = pas de spermatozoïdes, pas de spermatoïdes, nombreux spermatoocytes
- Score 6 = quelques spermatoïdes
- Score 7 = pas de spermatozoïdes, nombreux spermatoïdes
- Score 8 = quelques spermatozoïdes
- Score 9 = nombreux spermatozoïdes mais spermatogénèse désorganisée
- Score 10 = spermatogénèse complète

Dans le but d'obtenir un index moyen, le nombre de tubules enregistrés pour un score donné est multiplié par ce score ; la somme de toutes les multiplications est divisée par le nombre total de tubules examinés.

α] taux de récupération en fonction du diagnostic histologique

Jow et al. (1993)⁷⁵ ont rapporté des TFSE permettant d'extraire des spermatozoïdes chez 7 des 11 patients (54%) atteints d'hypospématogénèse, mais également chez 2 sur 9 patients (33%) présentant un arrêt de maturation et chez 0 des 9 patients présentant seulement des cellules de Sertoli, cela parmi 29 patients azoospermiques d'origine testiculaire.

Tournaye et al. (1996)¹⁴² ont étudié 124 patients infertiles azoospermiques ou non subissant une procédure TFSE-ICSI. Des spermatozoïdes ont été retrouvés chez 114 patients. Chez tous les patients présentant une spermatogénèse normale ou une «hypospématogénèse», des spermatozoïdes ont été retrouvés dans la préparation extemporanée. Le taux de récupération a été de 84% (22 cas sur 26) lors d'aplasie des cellules germinales et d'arrêt de maturation incomplets, et de 76% (13 cas sur 17) lors d'aplasie des cellules germinales et d'arrêt de maturation complets.

Amner et al (1999)⁴ ont étudié le pourcentage de récupération des spermatozoïdes chez des patients azoospermiques non obstructifs. Dans le cas du syndrome des cellules de Sertoli seules (SCO), ce pourcentage est de 23.2% en cas de biopsie bilatérale unique (19/82). En cas de fibrose, ce pourcentage est de 22.2% en cas de biopsie bilatérale unique (81/216).

Selon Ezeh et al. (1998)³⁶, après l'examen cytologique de la biopsie testiculaire, la pathologie la plus fréquemment associée à l'extraction fructueuse de spermatozoïdes testiculaires pour l'ICSI est l'hypospématogénèse, ce qui est en accord avec les résultats des autres études. Des spermatozoïdes testiculaires ont été découverts chez tous les patients atteints d'hypospématogénèse, chez 91% des patients présentant une spermatogénèse focale, chez aucun des patients présentant un arrêt de maturation et chez 67% des patients présentant seulement des cellules de Sertoli. Il est à noter que dans cette étude, il a été utilisé autant de tissu testiculaire pour l'analyse histologique que pour l'extraction des spermatozoïdes.

Selon Ezech et al. (1998)³⁶, il existerait une bonne corrélation entre le fait de visualiser des spermatozoïdes testiculaires à l'histologie et le résultat de la TESH (valeur prédictive positive de 95 %). Mulhall et al. (1997)⁹⁹ ont également étudié la présence de spermatozoïdes à l'histologie du testicule chez 30 patients présentant une azoospermie non obstructive. La présence de spermatozoïdes à l'histologie donne une valeur prédictive positive de 100 % pour prévoir la présence de spermatozoïdes lors de la TESH. Une étude rétrospective évaluant la distribution de la spermiogénèse dans les testicules de 45 hommes azoospermiques a trouvé que chez 22 des 26 hommes présentant des spermatozoïdes matures, la TESH retrouve des spermatozoïdes donnant une valeur prédictive positive de 85 %¹²⁸.

Le fait que les spermatozoïdes matures soient des facteurs prédictifs de la présence de spermatozoïdes n'est pas étonnant. L'arrêt de maturation survient généralement durant la méiose plutôt que durant la spermiogénèse⁹⁹. En effet durant la spermiogénèse, l'apoptose se réduit de façon remarquable et les divisions cellulaires s'arrêtent, de telle sorte que des spermatozoïdes testiculaires seraient invariablement produits une fois que la spermatogénèse a progressé jusqu'à ce stade.

Par ailleurs, d'excellentes corrélations ont été mises en évidence entre le nombre moyen de spermatozoïdes matures par tube séminifère et les numérations de spermatozoïdes éjaculés¹²⁷ ou les spermatozoïdes testiculaires extraits^{99, 126}. Toutefois, le fait de ne pas déceler des spermatozoïdes testiculaires à l'analyse histologique n'exclut pas la possibilité d'une production de spermatozoïdes, puisque des foyers de spermatozoïdes peuvent être extraits dans certaines régions du testicule non analysées par l'histologie.

2) Taux de FSH (Follicle Stimulating Hormone)

La FSH (Follicle Stimulating Hormone) ou hormone folliculo-stimulante est une hormone polypeptidique sécrétée au niveau de l'antéhypophyse. C'est une glycoprotéine de masse relative environ 35 kDa constituée de 2 chaînes α et β : la chaîne α est commune aux autres glycoprotéines antéhypophysaires (TSH, LH) et la chaîne β est spécifique. La sécrétion est sous la dépendance d'un facteur hypothalamique, la LH-RH, hormone

libératrice de l'hormone lutéinisante ou GnRH, hormone libérant les gonadotropines. Plusieurs types de rétrocontrôle à la LH-RH ont été décrits : par sa propre sécrétion (cycle rapide), par les taux de FSH-LH (cycle court) et par les stéroïdes ovariens (cycle long). Un autre facteur est impliqué dans la régulation de la sécrétion de FSH : l'inhibine sécrétée chez l'homme par les cellules de Sertoli. Elle semble agir en inhibant la synthèse et la libération de la FSH.

La FSH agit conjointement avec la LH pour stimuler les gonades. Chez l'homme, elle stimule la spermatogenèse. Les dosages sont réalisés par technique sandwich et les taux sériques usuels chez l'homme pubère sont généralement compris entre 2 et 10 U/L. Il peut toutefois exister des variations selon les trousseaux diagnostiques utilisés.

En raison de son rôle physiologique dans la spermatogenèse, la FSH sérique a été analysée depuis longtemps acceptée comme test standard de laboratoire pour l'évaluation de l'homme infertile. Après avoir pris connaissance de l'histoire du patient, après examen clinique et analyse d'un sperme anormal, le dosage de la FSH constitue généralement l'étape suivante dans l'évaluation d'une infertilité masculine.

La FSH sanguine peut être normale lors de déficits sévères de la spermatogenèse, son augmentation n'indique pas toujours un épithélium germinatif endommagé. En effet, elle peut aussi refléter une adaptation compensatrice d'une destruction partielle : cette altération testiculaire a comme conséquence une augmentation de FSH, afin de permettre une production de spermatozoïdes subnormale⁷⁶.

La triade azoospermie sécrétorie, FSH augmentée et hypotrophie testiculaire n'est plus synonyme de stérilité : chez de tels patients, des grossesses ont été obtenues avec des spermatozoïdes testiculaires³⁴.

Lors d'une azoospermie avec une FSH supérieure à 30 U/L, la découverte de spermatozoïdes dans la biopsie varie de 22 à 48 %^{76,54}.

Un volume testiculaire normal et une valeur basse de la FSH semblent être associées à une forte probabilité de retrouver des spermatozoïdes dans la biopsie, mais elles ne prédisent en aucun cas le succès de la découverte^{144,20}.

Chen et al (1996b)²⁰ ont montré la présence de spermatozoïdes et spermatisés dans 51 % des cas d'azoospermie non obstructive (26/50). Dans presque tous les cas, les spermatozoïdes et spermatisés ont été trouvés chez des patients présentant des taux sériques de FSH < 30 mIU/ml. Pour les auteurs, cela suggère, à l'ère de l'ICSI, qu'une biopsie testiculaire devrait être pratiquée pour toute azoospermie non obstructive et altération de la spermatogénèse, même chez les patients qui présentent des taux élevés de FSH sérique.

D'après Jezek et al. (1998)⁷³, quand la concentration de FSH est normale, la TBSE retrouve des spermatozoïdes chez la plupart des 103 patients infertiles étudiés. Dans leur étude :

d) FSH sérique et présence de spermatozoïdes testiculaires

Une concentration sérique normale de FSH chez un homme azoospermique oriente vers une obstruction des canaux excréteurs ; d'un autre côté, la concentration de FSH est élevée dans l'azoospermie non obstructive¹⁵⁷. Cette différenciation est importante pour déterminer le type de traitement futur, mais ne préjuge en rien du succès de l'ICSI. Toutefois, selon Hausser et al (1995)⁶⁴, les taux de FSH plasmatiques ne permettent pas de différencier l'azoospermie obstructive de l'azoospermie non obstructive.

d) FSH sérique et diagnostic du type d'azoospermie

Parmi les paramètres spermatisés, seule sa relation avec la concentration en spermatozoïdes est bien documentée. Novero et al. (1997)¹⁰³ confirment une corrélation inverse entre le taux de FSH sérique et la concentration en spermatozoïdes ($P < 0.001$). La concentration en spermatozoïdes diminue quand la concentration en FSH augmente. Les concentrations de FSH sérique sont aussi corrélées de façon inverse avec la mobilité spermatisée totale ($P = 0.036$) en présence de hautes concentrations de FSH > 25 mIU/ml, la mobilité totale médiane diminue à 7 %. Par contre, la mobilité progressive des spermatozoïdes et la morphologie des spermatozoïdes n'étaient pas significativement corrélées avec les concentrations de FSH sérique.

c) FSH sérique et paramètres spermatisés

selon Martin-du-Pan & Bischof (1995)⁹³, des taux de FSH élevés ne sont pas toujours dus à un épithélium germinatif endommagé mais peuvent aussi être le signe d'une adaptation compensatoire à une destruction partielle ou à l'ablation de parenchyme testiculaire, avec une production de spermatozoïdes subnormale. Selon les auteurs, la biopsie testiculaire est utile même dans les cas d'azoospermie avec des taux de FSH élevés : si la recherche de spermatozoïdes est positive, ces derniers pourront être utilisés lors de l'ICSI.

Tournaye et al (1997)¹⁴⁴, chez 132 patients azoospermiques sécrétatoires (selon l'auteur avec une histologie n'ayant pas révélé une spermatogénèse normale ou une hypospertogénèse) pensent que les taux de FSH ne permettent pas de prédire avec justesse la présence de spermatozoïdes lors de la biopsie testiculaire. En effet, pour la meilleure valeur-seuil possible de 21.9 UI/l, les taux de FSH montrent une sensibilité de 71.7 % mais une spécificité de seulement 41.7 %. Ezech et al (1999)³⁷ ont analysé les taux de FSH chez 40 patients azoospermiques non obstructifs. En utilisant une valeur-seuil de 12.7 UI/l, la sensibilité est de 50 % et la spécificité de 92 %.

De même, Kim et al (1997)⁸⁰ ont réalisé des biopsies testiculaires chez 57 patients azoospermiques présentant des taux de FSH trois fois plus élevés que la normale et présentant pour la plupart une atrophie testiculaire. Chez 17 patients (30 %), des spermatozoïdes ont été retrouvés. Donc chez des hommes présentant une azoospermie associée à une atrophie testiculaire et à des taux de FSH élevés, une biopsie testiculaire ne devrait pas être écartée.

Bien qu'il existe une différence statistiquement significative entre les taux plasmatiques de FSH de sujets chez lesquels il a été retrouvé des spermatozoïdes à la TESE (TESE+) par rapport à ceux chez lesquels aucun spermatozoïde n'a pu être retrouvé (TESE-), à l'intervalle de confiance de 95 % toutefois, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Par ailleurs, il y avait à l'intérieur même des groupes TESE+ et TESE-, un grand éventail des concentrations de FSH (Ezech et al., 1998).

Donc chez les hommes infertiles présentant une azoospermie avec des valeurs de FSH élevées, la TESE ne doit pas être écartée.

- 1/3 des patients avec une FSH légèrement élevée n'avaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie.
- 39 % des patients chez lesquels la FSH était deux fois plus élevée que la normale n'avaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie
- 50 % des patients avec une FSH très élevée n'avaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie

Il existe deux types d'inhibines : l'inhibine A et l'inhibine B. Chacune est composée de sous-unités alpha identiques et de sous-unités bêta différentes reliées par des ponts disulfures. Bien que les inhibines soient sécrétées selon une grande variété de précurseurs de poids moléculaires plus élevés et sous forme de sous-unités libres, l'activité biologique de l'inhibine dépend de la formation de dimères α/β . Jusqu'à récemment, la compréhension de la physiologie de l'inhibine était limitée du fait que la seule méthode de dosage de l'inhibine ne pouvait pas différencier les formes biologiquement actives et inactives de l'inhibine.

L'axe reproductif masculin est une entité finement régulée qui contrôle la stéroïdogénèse et la spermatogénèse. La LH sécrétée par l'hypophyse antérieure, stimule la production de testostérone et de 17β oestradiol par les cellules de Leydig. Par mécanisme de feed-back, la testostérone régule la sécrétion de LH. De façon similaire, la FSH stimule la spermatogénèse dans les cellules germinales et la production d'inhibine par les cellules de Sertoli. L'inhibine est supposée exercer un effet négatif sur la production de FSH et de moduler la spermatogénèse.

4) Inhibine B

Selon Tournaye et al (1997)¹⁴⁴, le volume testiculaire ne prédit pas efficacement l'extraction de spermatozoïdes. En prenant comme valeur seuil un volume testiculaire de 6.3 ml chez 78 patients azoospermiques sécrétoires, la sensibilité est de 56.1 % et la spécificité de 54.1 %.

Selon Ezech et al (1999)³⁸, le volume testiculaire ne prédit pas avec fiabilité la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. En effet, l'analyse des volumes testiculaires de 40 patients azoospermiques non obstructifs quant à la présence de spermatozoïdes intratesticulaires en prenant comme valeur seuil un volume de 27 ml donne une sensibilité de 75 % et une spécificité de 67 %.

3) Volume Testiculaire

Récemment, 2 nouveaux tests hautement sensibles et spécifiques de l'inhibine biologiquement active ont été développés⁶⁰. En utilisant ces nouveaux tests, Illingworth et al (1996)⁷⁰ ont démontré que l'inhibine B était la forme physiologique d'inhibine importante chez les mâles, tandis que l'inhibine A s'avérait indétectable (< 2 pg/ml chez les sujets étudiés). Les concentrations d'inhibine B sérique ont été corrélées négativement et de façon significative avec les concentrations de FSH chez les donneurs de sperme, les hommes infertiles et chez les sujets présentant des taux élevés de FSH. D'autres chercheurs¹⁰⁷ ont démontré que les niveaux d'inhibine B étaient corrélés à la fois avec les numérations de spermatozoïdes et avec le volume testiculaire.

a) *Inhibine B séminale*

Dans l'expérience d'Anderson et al (1998)⁷, l'inhibine B est présente dans les plasmas séminaux d'hommes fertiles, mais aussi chez des hommes présentant une infertilité clinique : de grands écarts de concentrations ont été observés, de taux indétectables (< 15 pg/ml) jusqu'à des taux de 54 100 pg/ml. Il existe une corrélation importante et significative entre les taux d'inhibine B séminale et la concentration en spermatozoïdes ($r = 0.46$, $P < 0.001$), mais pas de corrélation entre les taux d'inhibine B et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une mobilité progressive ou une morphologie normale. Après vasectomie, l'inhibine B devient indétectable, ce qui montre que le testicule en est la source principale. Chez des hommes présentant une infertilité clinique, l'inhibine B était indétectable chez 17 % des sujets, avec une corrélation hautement significative entre les concentrations séminales d'inhibine B et la concentration en spermatozoïdes ($r = 0.55$, $P < 0.0001$)

Néanmoins, la concentration séminale d'inhibine B est extrêmement variable même chez le sujet sain et en cas d'oligospermie ou d'azoospermie (> 20 millions/ml), elle est plus basse chez les sujets présentant une FSH plasmatique élevée, ce qui est en accord avec son rôle endocrinien⁷. Les sous-unités alpha et bêta de l'inhibine ont été localisées de façon prépondérante dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, en utilisant des techniques histochimiques.

L'inhibine B d'origine testiculaire est donc présente dans le plasma séminal humain normal, avec de très grands écarts possibles de concentration, et serait susceptible de refléter l'état fonctionnel de l'épithélium séminifère. Toutefois, en cas d'azoospermie sécrétoire, Fenichel et al. (2000)⁴⁴ n'ont pas retrouvé de corrélation avec l'état de la spermatogénèse.

b) Inhibine B sérique

Dans l'étude de Bailly et al. (2000)¹² étudiant 78 patients azoospermiques, un dosage d'inhibine B inférieur à 15 ng/ml donne 86 % de risque de ne pas retrouver de spermatozoïdes. Inversement, un taux d'inhibine B supérieur à 40 pg/ml correspond à 84 % de chances de retrouver des spermatozoïdes. Chez 2 des 3 patients présentant une inhibine B supérieure à 40 pg/ml et qui n'avaient pas de spermatozoïdes, l'analyse histologique a montré un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatide. En comparaison, le cut-off de la FSH à 10 pg/l est prédictif à 53 %.

Ballesca et al (2000)¹⁴ ont montré que les concentrations sériques d'inhibine B mesurées chez 17 patients azoospermiques non obstructifs étaient significativement plus élevées) chez des patients pour lesquels des spermatozoïdes avaient été retrouvés lors de la biopsie par rapport aux patients pour lesquels aucun spermatozoïde n'avait été retrouvé (78,3 ± 10,5 versus 26,7 ± 3, P<0,001), alors qu'il n'existait pas de différence tant au niveau des taux de FSH sérique qu'au niveau du volume testiculaire. Après analyse des courbes ROC (receiver operating characteristics), le seuil d'inhibine B sérique permettant d'obtenir une TSE positive était évalué à 40 pg/ml, avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 100 % (la technique de dosage des dimères d'inhibine B sérique utilise un test ELISA sandwich à l'aide de 2 anticorps monoclonaux (Serotec, Oxford, UK). Le premier anticorps monoclonal est dirigé contre la sous-unité β B de l'inhibine, le second anticorps monoclonal est dirigé contre la sous-unité α et couplé à la phosphatase alcaline. La sensibilité du test est de 15 pg/ml et les coefficients de variation intra- et inter-essais étaient inférieurs à 11 et 15 % respectivement).

De même, Kolb et al (2000)⁸² ont montré que les concentrations sériques d'inhibine B corrèlaient positivement avec les concentrations en spermatozoïdes (P = 0,0001), et négativement avec les taux de FSH (P = 0,01) et de LH (P > 0,05)

La concentration sérique de FSH constituerait plutôt un marqueur indirect de l'activité des cellules de Sertoli et de la spermatogenèse : en effet la FSH est modulée par la fonction hypothalamique, par des facteurs testiculaires et par les hormones stéroïdes. Par ailleurs, la concentration sérique d'inhibine B serait un marqueur plus direct de l'activité des cellules de Sertoli et de la spermatogenèse : l'inhibine B est un produit des tubes séminifères et sa sécrétion est stimulée par la présence de stades avancés de la spermatogenèse¹⁰⁷.

Selon Fenichel (1999)⁴³, ce test retrouve des concentrations élevées d'AMH dans le liquide séminal de donneurs fertiles supérieures à celles détectées dans le plasma chez le même sujet. L'AMH séminale était indosable après vasectomie ou en cas d'azoospermie obstructive et à des taux faibles ou nuls en cas d'azoospermie sécrétoire. En outre le taux séminal était corrélié dans les cas d'azoospermie sécrétoire avec l'état de la spermatogénèse, analysé sur une biopsie testiculaire réalisée sur chacun des deux testicules. La valeur prédictive individuelle est meilleure que celle de la FSH plasmatique puisque le taux d'AMH est souvent nul (11/14) en cas d'absence de spermatogénèse avec une valeur prédictive positive de 70 % et une valeur prédictive négative de 83 %. La centrifugation rapide après liquéfaction du sperme et la congélation immédiate à -20°C paraissent primordiales pour éviter la dégradation de la protéine par les protéines séminales (travaux en cours). Après confirmation des résultats sur une plus grande série, le dosage de l'AMH séminale seul ou associé à d'autres marqueurs pourrait être proposé pour indiquer la répétition des biopsies en cas de prélèvement initial négatif.

L'AMH est une glycoprotéine de la famille des TGFB comme l'inhibine, strictement d'origine sertolienne, dont le principal rôle connu à ce jour est de permettre la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle. Son taux plasmatique chute considérablement à la puberté en relation avec l'élévation de la testostérone. A l'âge adulte, l'AMH est sécrétée préférentiellement vers la lumière du tube séminifère⁴³. Son dosage séminal en ELISA pourrait représenter un marqueur pronostic simple avant prélèvement testiculaire en vue d'une ICSI.

5) Hormone Anti-Müllérienne (AMH)

Toutefois, selon l'étude de Von Eckardstein et al. (1999)¹⁵⁵ étudiant 91 patients infertiles azoospermiques ou oligospermiques, l'inhibine B en combinaison avec la FSH montrent une sensibilité de 75 % et une spécificité de 73 % pour l'extraction des spermatozoïdes par TESE. L'inhibine B apparaît donc comme un paramètre intéressant pour évaluer la qualité de la spermatogénèse et notamment chez les sujets azoospermiques, en complément de la FSH et du volume testiculaire, avant de procéder à la biopsie testiculaire.

La testostérone, stéroïde à 19 carbones, est l'androgène majeur. Elle est d'origine essentiellement leydigienne chez l'homme et pour une faible part (1 à 5 %) surrénalienne. La testostérone circule dans le plasma liée à des protéines : albumine, transcortine et surtout Testostérone-estradiol Binding Globulin (TeBG), la protéine liant les hormones sexuelles. La TeBG lie la testostérone avec une spécificité et une affinité nettement supérieures aux autres protéines. Seule la fraction libre (1 à 2 %) est physiologiquement active. Le métabolisme de la testostérone est à la fois périphérique (conduisant sous l'action de la 5 α -réductase à la dihydrotestostérone (DHT)) et hépatique (donnant une partie des 17-cétostéroïdes, métabolites inactifs). La sécrétion de la testostérone est stimulée par la LH sur laquelle elle exerce un rétrocontrôle négatif. Son rôle principal est de permettre la différenciation, le développement et la maintenance des caractères sexuels secondaires (prostate, organes génitaux). Elle a en outre un rôle anabolisant. En liaison avec la FSH, elle contrôle la spermatogénèse en agissant sur l'activité des cellules de Sertoli.

Chez l'homme, la testostérone est soit libre (2%), soit liée à l'albumine (38 %) ou à la TeBG et à la CBG (60 %). Il est possible de doser la testostérone totale (2,5 à 10 ng/ml environ), la testostérone biodisponible (testostérone libre et testostérone liée à l'albumine de 0,8 à 4,3 ng/ml environ) et la testostérone libre (60 à 230 pg/ml environ). Selon les trousseaux diagnostiques utilisées, les normes peuvent changer légèrement. La testostérone suit un rythme nyctéméral avec des valeurs plus élevées dans la matinée et des variations saisonnières. Il semblerait que la testostérone biodisponible reflète mieux l'imprégnation androgénique que la testostérone libre. Le dosage direct de la testostérone libre présente l'avantage d'être indépendant des modifications concomitantes des taux des protéines transportées (syndromes inflammatoires, affections hépatiques).

Selon Ezech et al (1999)³⁸, les taux de testostérone de 40 patients azoospermiques non obstructifs sont positivement associés à la présence de spermatozoïdes testiculaires (au degré de signification de 5% en utilisant une régression linéaire). Toutefois, les taux de testostérone ne permettraient pas de prédire avec fiabilité la présence de spermatozoïdes intratesticulaires.

Dans l'étude de Yogev et al (2000)¹⁵⁹, 22 hommes azoospermiques ayant subi une tentative de TSE-ICSI ont été divisés en trois groupes en fonction de l'histologie qualitative (arrêt de maturation, hypospérmatoogénèse, et spermatogénèse normale) et de l'examen extemporané des biopsies. La présence de spermatozoïdes et/ou de spermatozoïdes matures, le pourcentage de formation de vésicule sexuelle (chromosomes X et Y à proximité) et l'appariement des deux chromosomes 18 a été vérifié dans chaque cas. Lorsque quelques spermatozoïdes matures et/ou spermatozoïdes ont été mis en évidence (17 cas sur 22), les taux de bivalents X-Y et 18 étaient significativement supérieurs ($73\% \pm 13\%$, $91\% \pm 7\%$) par rapport à ceux trouvés dans les cas d'arrêt de maturation au stade de spermatoocyte ($23\% \pm 8$

8) Evaluation de la méiose par FISH

Douze sujets azoospermiques non obstructifs atteints de déficit testiculaire primaire intratesticulaires. Les sujets présentant une azoospermie obstructive présentaient toujours plus de 3 vaisseaux et trois vaisseaux intratesticulaires visibles ; catégorie 2, plus de trois vaisseaux visibles. L'analyse des vaisseaux intratesticulaires par testicule a été quantifiée de façon semi-quantitative : catégorie 0, aucun vaisseau visible ; catégorie 1, entre déficit testiculaire primaire. L'analyse des vaisseaux intratesticulaires par testicule a été intratesticulaires. Foresta et al (1998)⁴⁸ ont examiné les testicules de patients présentant un déficit testiculaire primaire. L'analyse des vaisseaux intratesticulaires par testicule a été quantifiée de façon semi-quantitative : catégorie 0, aucun vaisseau visible ; catégorie 1, entre un et trois vaisseaux intratesticulaires visibles ; catégorie 2, plus de trois vaisseaux visibles. Les sujets présentant une azoospermie obstructive présentaient toujours plus de 3 vaisseaux intratesticulaires avant de réaliser l'extraction des spermatozoïdes intratesticulaires.

L'analyse couleur Doppler du testicule pourrait donc être utile non seulement dans le diagnostic différentiel de l'azoospermie mais aussi pour évaluer la distribution des vaisseaux intratesticulaires avant de réaliser l'extraction des spermatozoïdes intratesticulaires. L'analyse couleur Doppler du testicule pourrait donc être utile non seulement dans le diagnostic différentiel de l'azoospermie mais aussi pour évaluer la distribution des vaisseaux intratesticulaires avant de réaliser l'extraction des spermatozoïdes intratesticulaires.

7) Analyse Doppler-couleur du testicule

La spermatogénèse est un processus complexe de différenciation à la fois morphologique et biochimique de la cellule germinale. Les changements morphologiques des cellules germinales au cours de la spermatogénèse arrivent de manière concomitante avec la modification de populations d'ARNm codant pour des protéines spécifiques des différents stades.

Des études récentes auraient identifié le gène *DAZ* (Deleted in Azoospermia) comme un gène clé du facteur d'azoospermie AZF (Azoospermia Factor). Le gène *DAZ*, exprimé exclusivement dans la spermatogonie code pour une protéine qui contient un motif de fixation à l'ARN, ceci suggérant un rôle potentiel dans le métabolisme de l'ARN de la cellule germinale mâle. La transcription du gène de la phosphoglycérate kinase 2 (*PGK2*) apparaît commencer au stade des cellules germinales méiotiques et des spermatoocytes pachytènes, et continuer au stade des spermatozoïdes ronds⁸⁹. Le gène de la *protamine-2* est transcrit de façon postméiotique au stade de la spermatide ronde⁸⁶.

Song et al (2000)¹³² ont essayé de mettre en évidence les ARNm de la *protamine-2* par PCR avec Reverse-Transcriptase dans les biopsies testiculaires de patients azoospermiques ou oligospermiques sévères. Dans leur étude, les spermatozoïdes ont été extraits dans 85,7 % des patients présentant des transcrits de *protamine-2* (18/21). En effet, seulement 3 patients avec des transcrits de *protamine-2* n'ont pas montré de spermatozoïdes. Par ailleurs, chez 1 patient, bien que le gène de la *protamine-2* ne soit pas exprimé, des spermatozoïdes ont été retrouvés. Au total, l'expression de la *protamine-2* était significativement associée à la présence de spermatozoïdes dans le tissu testiculaire. Donc les transcrits du gène de la *protamine-2* utilisés comme marqueurs moléculaires pourraient être utiles afin de prédire la présence de spermatozoïdes testiculaires, et notamment chez les sujets azoospermiques non obstructifs.

9) Détection de l'expression de gènes spécifiques de la lignée germinale

testiculaire.

malgré un échec de récupération des spermatozoïdes matures lors de l'examen de la biopsie bivalents augmente la probabilité de découvrir une spermatogénèse focale dans le testicule, déroulement normal de la spermatogénèse. L'existence de taux élevés de formation de %, 60 ± 12 (%). L'appariement des chromosomes durant la méiose est donc reliée au

10) Spermatozoïdes testiculaires

Ezeh et al (1999)³⁸ ont étudié 40 patients azoospermiques non obstructifs chez lesquels a été réalisée une biopsie testiculaire diagnostique pour études génétiques et évaluation de la spermatogénèse. Les biopsies testiculaires et l'extraction des spermatozoïdes n'ont pas été synchronisées avec la ponction d'ovocytes. Les spermatozoïdes obtenus ont été congelés. Parmi les facteurs prédictifs étudiés et analysés par courbe ROC, la visualisation de spermatozoïdes testiculaires à l'examen histologique s'est révélée le meilleur facteur prédictif de succès de la TFSF. Dans cette étude, la visualisation des spermatozoïdes testiculaires permettrait de prédire l'extraction des spermatozoïdes dans 77% des cas.

11) Détection des spermatozoïdes dans l'éjaculat

Selon Ezech et al (1998)³⁶, la détection immunologique de spermatozoïdes dans l'éjaculat pourrait être utilisée comme facteur prédictif de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. Un anticorps monoclonal spécifique de l'acroosome est utilisé et la détection s'effectue par fluorescence. Chez 12 patients présentant une fluorescence positive (une ou deux spermatozoïdes présentes), des spermatozoïdes testiculaires ont été extraits (cinq cas d'hypospermatogénèse, sept cas de spermatogénèse focale). Chez 16 patients, la fluorescence était absente (pas de spermatozoïdes). Ces patients présentaient soit un SCO (12 patients) soit un arrêt de maturation (4 patients). Toutefois, quatre patients présentant un SCO avaient des spermatozoïdes extraits lors de la biopsie (25 % des cas sans spermatozoïde détectable dans l'éjaculat). La sensibilité était donc de 100 %, et la spécificité de 75 %.

Amner et al (2001)⁹ ont proposé de mettre en évidence les cellules germinales dans l'éjaculat de 100 patients azoospermiques non obstructifs par simple coloration au MGG. Selon leur travaux, les spermatozoïdes de 1^{er} ordre ont été mis en évidence dans 100 % des cas de TFSF positives (sensibilité de 100 %), et dans 50 % des cas de TFSF négatives (spécificité de 50 %)

Par ailleurs, les spermatozoïdes ronds ont été détectés dans 83,7 % des cas de TFSF positives (sensibilité de 83,7 %) et dans 22 % des cas de TFSF négatives (spécificité de 78 %). Donc, ce test simple et de faible coût pourrait prédire de façon plus efficace l'extraction des spermatozoïdes lors de la biopsie.

III) LA BIOPSIE TESTICULAIRE

A) TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

Plusieurs techniques de prélèvement testiculaire sont d'ores et déjà disponibles :

- Biopsie testiculaire ouverte, comprenant la TEFSE (Testicular Sperm Extraction)^{122, 123, 125}
- Biopsie à l'aiguille et la TEFSE microchirurgicale (microsurgical TEFSE)¹²¹.
- Biopsie à l'aiguille ou TESA (Testicular Sperm Aspiration) et à l'aiguille fine ou TEFNA (Testicular Fine Needle Extraction)^{26, 27, 52, 147}.

3) La biopsie testiculaire ou TEFSE

a) TEFSE conventionnelle

La biopsie testiculaire est effectuée en milieu chirurgical. Celle-ci est pratiquée sous anesthésie générale, locorégionale, voire locale.

L'incision de la peau est médiane verticale permettant d'aborder l'une et l'autre bourse. Après incision de la vaginale, le contenu de la bourse est extériorisé.

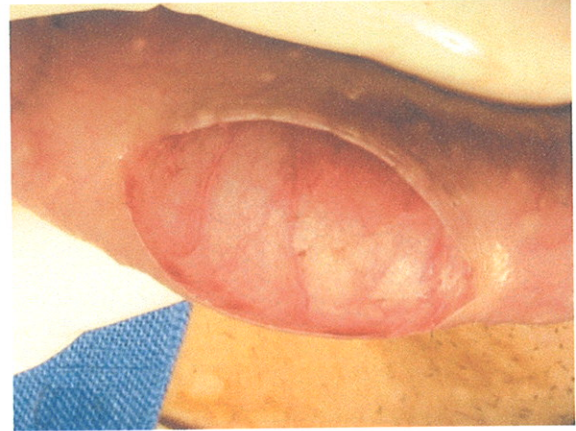


Photo 1 : incision du scrotum
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

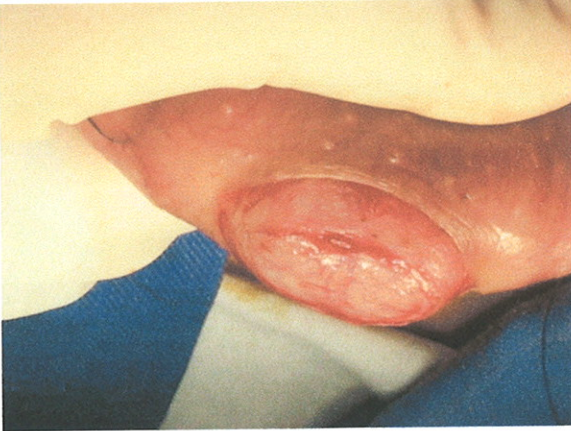


Photo 2
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

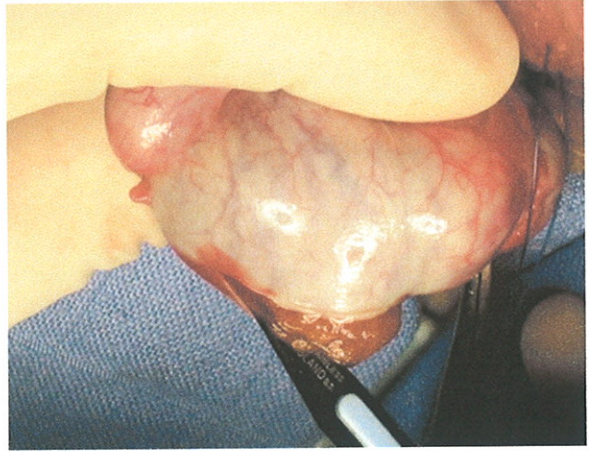


Photo 5 : incision de l'albuginée
(bloc opératoire CHU Pellegrin)



Photo 6 : pulpe testiculaire
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

Après stabilisation du testicule, l'albuginée est incisée sur une longueur de 6-7 mm, en évitant les vaisseaux bien visibles par transparence, ce que facilite l'utilisation de loupes spéciales grossissant de 6 à 8 fois environ.



Photo 3
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

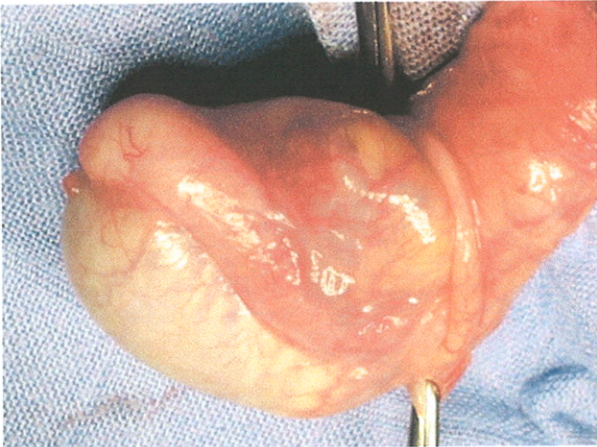


Photo 4 : testicule et épiddidyme
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

Photo 9: suture de l'albuginée
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

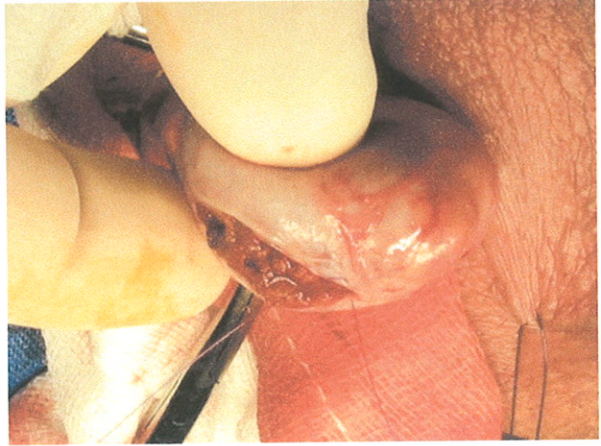
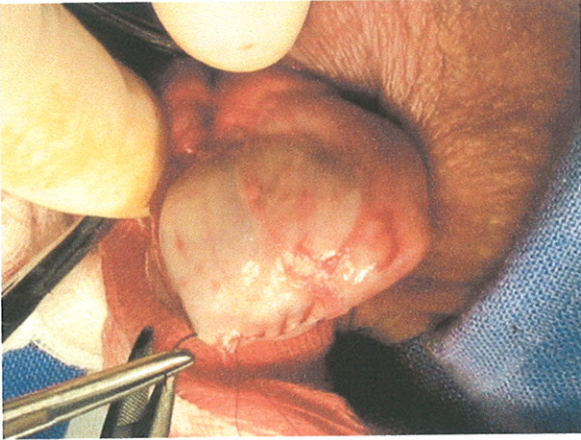


Photo 10
(bloc opératoire CHU Pellegrin)



Par simple pression sur le testicule, la pulpe testiculaire saille à travers l'incision, ce qui permet de la prélever à l'aide d'un ciseau microchirurgical. Si un petit vaisseau saigne, il doit être électrocoagulé à la bipolaire afin d'éviter un hématome sous-albuginéeal.

Photo 7 : prélèvement pulpe testiculaire
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

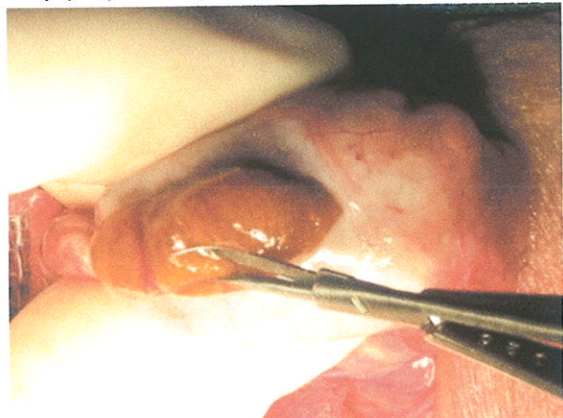
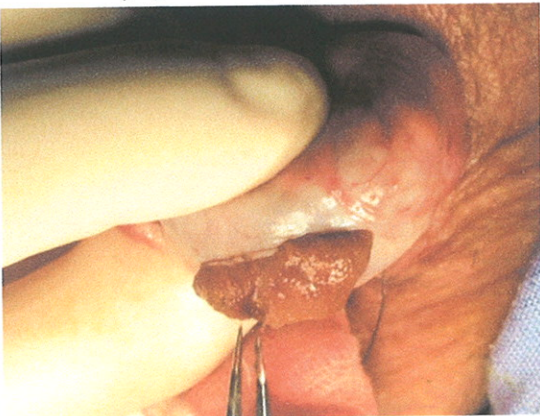


Photo 8 : électrocoagulation
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

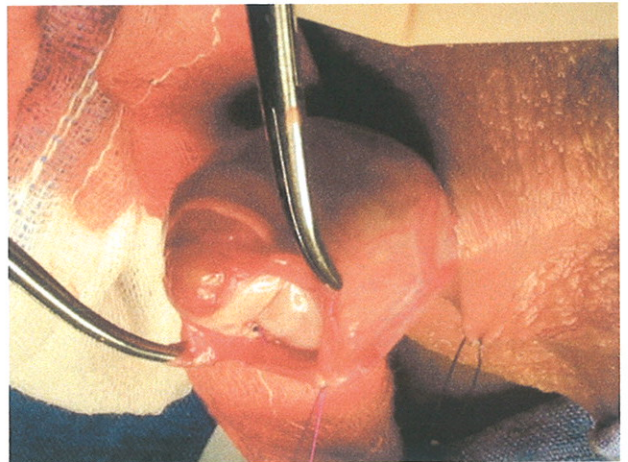


et l'extraction positive de spermatozoïdes.
 azoospermiques non-obstructifs : il n'ont retrouvé aucune corrélation entre le site de ponction
 al. (1998)⁶⁴ ont réalisé 3 prélèvements par testicule à des sites différents chez 29 hommes
 équipe, deux sites par testicule sont prélevés : le pôle supérieur et le pôle inférieur. Hausser et
 sites à prélever est différent selon les équipes et l'étiologie de l'azoospermie. Dans notre
 Le nombre et le site des biopsies est encore relativement empirique. Le nombre de
 (JCD, Lyon).

placée dans des tubes contenant 1ml de milieu de survie des spermatozoïdes : Fertilcult Hépès
 La biopsie testiculaire, mesurant environ 5 mm de long sur 1 à 1.5 mm de large, est
 de rapprochement. La peau est suturée soit par un surjet de fil résorbable, soit par des agrafes.
 superficiel. Si la cloison interscrotales a été ouverte, elle est reconstituée par plusieurs points
 suturée en bourse avec un fil 4/0. Le crémaster est ensuite suturé, constituant un plan plus
 l'incision albuginée. Le testicule est ensuite réintégré dans la bourse et la vaginale est
 qu'aucun fragment de pulpe ne dépasse. Aucun saignement ne doit persister sous ou à travers
 Puis l'albuginée est refermée hermétiquement (fil résorbable 4/0 ou 6/0) de façon à ce

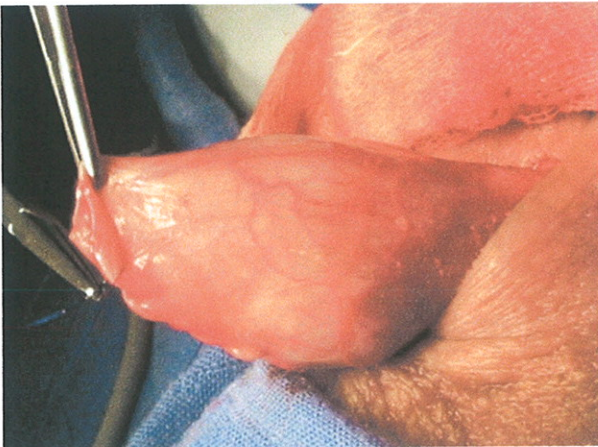
(bloc opératoire CHU Pellegrin)

Photo 11



(bloc opératoire CHU Pellegrin)

Photo 12



est terminée lorsque des spermatozoïdes sont extraits. L'examen est réalisé sur autant de parenchyme testiculaire que possible. L'opération

taille pourront être excisés. point de vue morphologique n'est identifié, alors les tubules différenciant des autres dans leur tubules plus larges et typiquement plus opaques (ou plus blancs). Si aucun tubule normal au parenchyme testiculaire. De petits échantillons (2 à 10 mg) sont excisés, concernant les 25 à l'aide d'un microscope. Les tubes séminifères d'aspect plus large sont identifiés dans le site. Un examen direct du parenchyme testiculaire est alors entrepris au grossissement 20-visualisation du parenchyme testiculaire sans affecter l'apport sanguin du testicule et affiner la vaginale est ouverte de façon étendue près de sa portion moyenne pour optimiser la

b) TSESE microchirurgicale ou TSESE avec microdissection (Schlegel, 1999)¹²¹

puisse augmenter le taux des complications. pourcentage d'extraction des spermatozoïdes, bien que cela allonge le temps opératoire et n'y a pas de doute que le fait de pratiquer des biopsies multiples permette d'augmenter le réellement positifs, ce qui confirme les résultats de Hausser et al. (1998). Selon cette équipe, il et al (1999)⁴, réaliser 3 biopsies testiculaires permettra de sélectionner la majorité des cas recommandent de pratiquer au moins trois biopsies ouvertes sur chaque testicule. Selon Arner de retrouver des spermatozoïdes en cas d'azoospermie sécréttoire. Hausser et al. (1998)⁶⁴ Devroey et al. (1995)³⁴, quatre à cinq sites de prélèvement par testicule optimisent les chances zones focales de spermatogénèse (échecs de recueil dans 18,5 % des cas). De même, selon conseillent la pratique de nombreuses biopsies (jusqu'à vingt ou plus) afin de retrouver des régions du testicule, et en cas d'arrêt de maturation ou d'aplasie de la lignée germinale, ils Tournay et al (1996)¹⁴² au contraire pensent que la spermatogénèse est limitée à certaines testiculaires permettrait de prédire à 85 % la présence de spermatozoïdes lors de la TSESE. En effet, une seule biopsie-diagnostic positive montrant la présence de spermatozoïdes quoique très diminuée reste diffuse dans le testicule sous forme d'une multitude de petits foyers. (1997)¹²⁸ pensent que la spermatogénèse chez les sujets azoospermiques non obstructifs, différents des spermatozoïdes chez les patients azoospermiques non obstructifs. Silber et al De 2 conceptions différentes de la spermatogénèse découlent 2 protocoles d'extraction

Plusieurs auteurs ont étudié la corrélation entre la ponction à l'aiguille et la biopsie testiculaire à ciel ouvert. Comme la quantité de matériel prélevé est moins importante lors d'une TEFNA, plusieurs prélèvements dans différentes régions du testicule sont nécessaires, car les lésions sont souvent bigarrées, en particulier dans le cas des azoospermies non obstructives^{144, 166}. Le nombre de tubules prélevé est moindre dans les biopsies percutanées (15 en moyenne contre 64 en TFSF pour Kassarlis et al. (1995)⁷⁹), ce qui rend le recueil de spermatozoïde plus improbable. En effet, du fait du peu de spermatozoïdes ramenés par la ponction à l'aiguille, une congélation de ceux-ci n'est pas envisageable si un seul ou deux prélèvements seulement sont réalisés. Dans l'étude de Friedler et al (1997)⁵² portant sur 37 hommes présentant une azoospermie sécrétoire vraie et comparant la ponction à l'aiguille et la biopsie ouverte, seuls 43 % des prélèvements ont permis de retrouver des spermatozoïdes,

impliquerait la perte du testis. testicule est souhaitable après le geste afin d'éviter la survenue d'un hématome qui l'albuginée. Du fait de la taille plus importante de la biopsie, une pression prolongée du *gun*, le prélèvement est réalisé après une incision cutanée de 1 cm et de 0.5 cm sur En cas d'utilisation d'une *aiguille à biopsie* (TESA), plus ou moins reliée au *Biopsy*

matériel, mais peut entraîner certaines distorsions du parenchyme⁹⁰. lieu lors de la dépression de la seringue. Celle-ci est importante pour obtenir suffisamment de dans chaque testicule et de 3 à 6 points d'entrée sont utilisés^{27, 52}. L'aspiration de la pulpe a peau du scrotum et les différentes tuniques. Plusieurs mouvements de va-et-vient sont réalisés maintenant fermement le testicule, directement à l'intérieur de celui-ci en passant à travers la 21 Gauge peut être reliée à une seringue de 20 ml servant à l'aspiration. Elle est introduite en Pour la réalisation d'une ponction testiculaire à l'*aiguille fine* (TEFNA), l'aiguille de et de la paroi scrotale par de la xylocaïne).

L'anesthésie est générale, locorégionale ou locale (infiltration du cordon spermaticque

minutes et dans une ou plusieurs directions⁵². aiguille de 19-20-21 Gauge qui permet d'aspirer de la pulpe testiculaire durant quelques soit une aiguille à biopsie (*Tru-cut*), plus ou moins reliée à un pistolet (*Biopsy-gun*), soit une Les techniques de ponction testiculaire percutanée peuvent être réalisées en utilisant

Dardashti et al. (2000)³⁰ ont comparé les effets post-biopsie de la TESE et de la TESE microchirurgicale : d'une part, des hématomas du scrotum ont nécessité un drainage chirurgical dans 3 cas sur 119 opérés par TESE et une atrophie testiculaire a été notée dans un cas, pour un taux de complication total de 3,4 %. D'autre part, il n'y a pas eu d'épisodes

contre 30 % ; $P > 0.05$).

récupération des spermatozoïdes chez des patients azospermiques non obstructifs (47 % complications chroniques : 3 contre 30 %) et améliore de façon significative la que la technique conventionnelle (complications aiguës : 15 % contre 58.3 % , cette technique ne soit pas à l'abri de complications, elle est relativement moins agressive *vaisseaux du testicule* et donc d'atténuer les effets secondaires post-biopsie⁵. Bien que

◆ Par ailleurs, la technique microchirurgicale permet d'aborder le testicule en évitant les (P < 0.05).

000 spermatozoïdes par échantillon pour 720 mg de tissu étaient retrouvés après TESE spermatozoïdes par échantillon dans seulement 9,4 mg de tissu, tandis que seulement 64 récupérés par microdissection permettaient de retrouver en moyenne 160 000 (17/27) après introduction de la technique microchirurgicale. Par ailleurs, les échantillons que l'extraction des spermatozoïdes augmentait de 45 % (10/22 cas) en TESE à 63 % (1999)¹²¹, en comparant l'efficacité de la TESE et de la TESE microchirurgicale, a montré (*bonne concentration de spermatozoïdes sous un faible volume extrait*). Schlegel

◆ En ce qui concerne la TESE microchirurgicale, *très bonne extraction des spermatozoïdes* notamment).

◆ Bonne récupération des spermatozoïdes par rapport à TESEA notamment (aiguille de 21 G

◆ Choix du site de biopsie et bilan morphologique complet par l'exploration.

◆ Hémostase parfaite

α] Avantages

a) TESE

4) Avantages et inconvénients de chaque technique :

dont 11 % après TEFNA. En cas d'aplasie germinale, dans 1 cas/11 des spermatozoïdes ont été retrouvés à la TEFNA (5 cas/11 après TESE). De même, lors d'un arrêt de maturation, les spermatozoïdes, étaient présents dans 1 cas/14 après TEFNA (4 cas/14 après TESE).

cliniquement détectables d'atrophie testiculaire ou d'hématome du scrotum chez les 107 cas de biopsie opérés de façon microchirurgicale.

β] Inconvénients

- ◆ Technique relativement longue, invasive, coûteuse par rapport à TESFA

b) TESFA ou TEFNA

α] Avantages

- ◆ Anesthésie locale
- ◆ Technique plus rapide, moins traumatique et moins coûteuse par rapport à TESFE)¹¹⁹. La TESFA pratiquée sous anesthésie locale chez des hommes atteints d'azoospermie non obstructive apparaît rapide, efficace et facile pour obtenir du tissu testiculaire²⁷.
- ◆ Comparée à la TESFE, la TESFA extrait moins de tissu mais permet d'atteindre des régions plus profondes du *parenchyme* ; cela permet d'explorer des territoires plus importants que ne le feraient une à deux biopsies testiculaires¹²⁸.

β] Inconvénients

- ◆ Technique aveugle entraînant un risque d'hématome et donc de perte fonctionnelle du testis élevés (mais pas d'incidence au niveau du testicule en terme d'atrophie selon Turek et al (2000)¹⁴⁸).
- ◆ Pas de bilan morphologique complet par l'exploration
- ◆ *Récupération moins bonne par rapport à TESFE* (notamment avec des aiguilles 21 G, mais la récupération des spermatozoïdes serait comparable avec des aiguilles 19 G selon Rosenlund et al (1998)¹¹⁶).

1) Action sur la spermatogénèse

A l'aide d'un modèle animal, Del Vento et al. (1992)³³ ont montré que des changements échographiques transitoires (c'est à dire diminution de l'échogénicité du parenchyme testiculaire aux points de ponction) et des altérations histologiques (c'est à dire une infiltration leucocytaire au point de ponction) sont détectables jusqu'à un mois après la biopsie testiculaire chez les étalons.

Schlegel et al. (1997)¹¹⁹ ont évalué les conséquences de la TFSF sur la fonction testiculaire chez des hommes atteints d'azoospermie non obstructive. Trois mois après la TFSF, et bien que l'examen extérieur du scrotum soit normal, 82 % des patients (14 sur 17) présentent des anomalies à l'échographie témoignant d'hématome persistant et/ou d'inflammation. Ces anomalies sont signalées par la présence de zones hypoéchogènes et d'augmentation de l'hétérogénéité du parenchyme testiculaire. La majorité de ces lésions hypoéchogènes étaient transitoires et ont disparu 6 mois après la TFSF, en laissant des cicatrices linéaires ou des calcifications visibles à l'échographie.

Schlegel et al. (1997)¹¹⁹ ont choisi d'examiner les patients à 3 mois de la TFSF en raison de la durée de la spermatogénèse qui dure près de trois mois. Puisque l'inflammation est fréquemment présente dans le testicule après 3 mois et disparaît presque toujours après 6 mois, les résultats des nouvelles tentatives de TFSF réalisées moins de 6 mois après la 1^{ère} ont été comparées à celles réalisées plus de 6 mois après. Il a clairement été montré que la probabilité d'extraire des spermatozoïdes était beaucoup importante (80 %) 6 mois après une 1^{ère} tentative de TFSF réussie.

2) Dévascularisation et fibrose

En plus des effets transitoires de la TFSF sur la spermatogénèse, une dévascularisation permanente du testicule peut survenir. D'après les travaux de Jarow (1991)⁷², de multiples incisions dans la tunique albuginée pour retirer des spermatozoïdes peuvent entraîner l'interruption d'une proportion suffisante d'artères testiculaires pour dévasculariser le testicule. En conséquence, éviter de pratiquer de multiples incisions dans la tunique albuginée tout comme minimiser le nombre de tentatives de TFSF permettrait d'éviter le risque d'une ischémie permanente du testicule après biopsie.

La spermatogénèse est un processus délicat facilement influencé par l'environnement. Bien que les hommes normaux produisent environ de 80 à 100 millions de spermatozoïdes par jour, les hommes atteints d'ANO produisent à peine quelques spermatozoïdes. N°importe quel effet négatif sur la fonction testiculaire d'un homme atteint d'ANO serait susceptible de supprimer sa production de spermatozoïdes.

Schlegel et al. (1997)¹¹⁹ proposent :

- l'utilisation d'une technique de biopsie ouverte avec grossissement optique permettrait d'améliorer l'identification des vaisseaux situés sous la tunique et donc de minimiser le risque d'altération involontaire du testicule.

azoospermiques non obstrués ?

4) Comment atténuer les conséquences des biopsies testiculaires chez les sujets azoospermiques non obstrués ?

Dans l'étude de Manning et al (1998)⁹¹, 15 patients azoospermiques non obstrués présentant des taux normaux de testostérone sont programmés pour subir une TSE. Le biopsie testiculaire a été adaptée au volume testiculaire : 6 biopsies par testicule si le volume testiculaire était supérieur à 8 ml, 2 biopsies par testicule si le volume était inférieur ou égal à 8 ml ou s'il n'existait qu'un testicule. Six mois après l'opération, les concentrations de testostérone diminuent de façon significative chez tous les patients (17,2 nmol/l en moyenne au départ et 12,1 nmol/l six mois après, $p = 0,0007$). Chez 8 patients sur 15, les concentrations de testostérone tombent au-dessous de la normale 6 mois après (de 16,8 nmol/l au départ à 9,9 nmol/l à 6 mois, $p = 0,0117$). Les concentrations de testostérone diminuent le plus chez les patients qui ont subi 6 biopsies par testicule ($p = 0,0077$) par rapport à ceux qui en ont subi 2 par testicule ($p = 0,0277$). La fonction leydigienne du testicule peut donc être touchée après TSE. Des contrôles réguliers des concentrations de testostérone chez des sujets ayant subi une TSE pourraient être utiles.

3) Modifications hormonales

De même, Schlegel et al. (1997)¹¹⁹ ont décrit le cas d'un patient ayant déjà subi une TSE qui avait retrouvé des spermatozoïdes. Par la suite, au cours d'une nouvelle tentative, le patient présentait une fibrose testiculaire extensive. Il est possible que la TSE ait causé un saignement intratesticulaire et la fibrose extensive du testicule.

La technique consiste à disposer des gouttes de milieu de culture dans une boîte Falcon de 5 cm de diamètre sous huile paraffine stérile avec une ou deux gouttes centrales, l'une servant de réservoir à spermatozoïdes, et l'autre contenant de la PVP en vue de l'ICSI.

Selon Craft et al.(1995)²⁵, l'aspiration directe des spermatozoïdes (Direct Sperm Aspiration) est un moyen simple de récupérer les spermatozoïdes de l'échantillon de testicule prélevé par TESEA : plutôt que d'utiliser des méthodes conventionnelles de préparation des spermatozoïdes telles que gradient de densité, migration ascendante ou migration-sédimentation, le biologiste aspire directement les spermatozoïdes sous microscope à l'aide de micropipettes. Toutefois, cela entraîne fréquemment de faibles taux de récupération des spermatozoïdes qui en général présentent une faible mobilité.

1) Aspiration directe des spermatozoïdes (après TESEA)

- ◆ Pentoxifylline
- ◆ Test hypo-osmotique
- ◆ Culture in vitro des tissus testiculaires
- ◆ Tampon de lyse des érythrocytes

4) Techniques complémentaires :

3) Lavages ou gradients de densité

2) Séparation mécanique et/ou traitement enzymatique des tissus suivi de :

1) Aspiration directe des spermatozoïdes (en cas de TESEA)

spermatozoïdes :

Une fois la TESE réalisée, il existe plusieurs façons de procéder à la recherche des

C) TECHNIQUES DE PREPARATION DU SPERME

- un délai d'au moins 6 mois avant une nouvelle TESE est recommandé.
- la conservation des tissus testiculaires ou spermatozoïdes congelés après TESE dans le but de diminuer la nécessité de répéter les TESE et donc de diminuer l'altération des testicules.

différentes méthodes.

Pour les 4 techniques, le pourcentage de vitalité des spermatozoïdes est augmenté de façon significative après Percoll, mais il n'existe pas de différence significative entre les différentes méthodes.

de spermatozoïdes mobiles est obtenu après séparation fine à l'aide de pincettes, et de manière différente techniques avant Percoll. Après Percoll, le meilleur taux de récupération global et En nombre total de spermatozoïdes, aucune différence n'a été observée entre les

pourcentage de mobilité, pourcentage de vitalité et morphologie normale. évaluées avant et après Percoll à l'aide de 4 paramètres : nombre total de spermatozoïdes, pincettes, ou de l'utilisation du vortex, ou d'un écrasement léger. Ces 4 méthodes ont été entre deux lames de verre, suivie éventuellement d'une séparation plus fine à l'aide de spermatozoïdes en étudiant 17 biopsies testiculaires divisées en 4 parties : dispersion simple Verheyen et al. (1995)¹⁵³ ont comparé 4 méthodes mécaniques d'extraction des libérés.

G. Les spermatozoïdes éventuellement présents dans le tissu testiculaire pourront ainsi être lames de verre dans une boîte de Pétri en verre contenant du milieu de survie pour spermatozoïdes, et en passant le produit de dilacération à travers une seringue de diamètre 19 La séparation mécanique des tissus peut être réalisée en dilacérant la biopsie entre 2

a) *Séparation mécanique*

2) Séparation mécanique et/ou traitement enzymatique des tissus

être centrifugé à 3000 T/m : le culot peut être utilisé pour la même technique. Si les échantillons récupérés contiennent très peu de spermatozoïdes, le tube Eppendorf peut milieu neuf avant d'être aspiré par la micropipette et placé dans la goutte centrale. immobiles, ou d'autre matériel cellulaire, ils sont transférés dans des gouttes contenant spermatozoïdes mobiles ou renuant faiblement sont localisés près de spermatozoïdes avant le transfert dans la goutte centrale servant de réservoir. Toutefois, quand des entre l'échantillon et le milieu de culture, ce qui rend l'isolation des spermatozoïdes plus aisée microtube Eppendorf à 37 °C. Une mobilité importante peut être parfois observée à l'interface un microscope inversé destiné à l'ICSI ; l'échantillon testiculaire est conservé dans un ayant soin de ne pas disposer trop d'échantillon dans chaque goutte), avant observation sous Des aliquots d'échantillon testiculaire sont alors placés dans une ou plusieurs gouttes (en

azospermiques non obstructifs. donc de réduire les échecs concernant la recherche de spermatozoïdes chez les sujets chez 7 de ces 27 patients (26%), rendant possible l'ICSI : la digestion enzymatique permet érythrocytes : l'utilisation de collagénase de type IV a permis de retrouver des spermatozoïdes retrouvé après plusieurs heures de recherche minutieuse en utilisant un tampon de lyse des Selon Crabbe et al.(1997,1998)^{23, 24} : dans 27 cas sur 41, aucun spermatozoïde n'a été d'utiliser la collagénase à faible concentration pour le traitement du tissu testiculaire.

amélioreraient l'efficacité de récupération du sperme En 1996, Salzbrunn et al.¹¹⁸ proposent spermatozoïdes, mais des études montreraient qu'elles sont relativement sûres et Les **enzymes protéolytiques** modifieraient les protéines de membrane des provenant des tubules.

extracellulaire, peuvent être séparées par des protéases dans le but de recueillir les cellules testiculaire, la membrane basale et un composant majeur de l'interstitium, la matrice cellules de leur tissu, et avec des taux élevés de cellules matures et viables¹⁹. Dans le tissu préparation enzymatique utilisant la collagénase procure une meilleure dissociation des Il est connu depuis quelque temps en culture cellulaire que l'utilisation d'une cellules doivent être séparées des tubules séminifères.

aussi la spermatogénèse. Pour obtenir une suspension cellulaire du tissu testiculaire, les aux tubules séminifères et régulent non seulement la fonction des cellules de Sertoli mais protéines : collagène, élastine, et protéines de liaison, qui procurent une intégrité structurale d'interstitium fibromusculaire. Cet interstitium est un réseau complet de plusieurs types de plusieurs couches de cellules germinales, et repose sur une membrane basale entourée Par ailleurs, dans le testicule, l'épithélium des tubules séminifères est composé de

b) *Dissociation enzymatique*

imputé au faible nombre d'échantillons inclus). après Percoll, la morphologie des spermatozoïdes n'a pas été améliorée (ce qui peut être léger). Pas de différence significative n'a été observée entre les techniques avant Percoll : normaux était extrêmement bas (de 1.3 % dans le contrôle jusqu'à 3 % après écrasement Pour toutes les techniques, le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement

3) Lavage simple ou gradients de densité

a) Lavage simple

Après dissociation du tissu testiculaire, il est possible de procéder à un lavage simple : dans ce cas, la suspension est centrifugée (300 g à 600g en général pendant 5 à 10 minutes), puis le culot est remis en suspension dans du milieu de culture spécifique aux spermatozoïdes.

b) Gradients de densité

Après dissociation, la préparation peut être déposée sur des gradients de densité constitués d'une solution hyperosmotique de type Puresperm® d'une part et de milieu de survie des spermatozoïdes d'autre part : une, deux ou trois couches de concentration croissantes en Puresperm® peuvent être utilisées. Il est important de déposer un faible volume d'échantillon au dessus du gradient afin de ne pas saturer l'interface et donc de préparer plusieurs gradients. Il est également possible d'utiliser des tubes de diamètre plus large (par exemple des tubes Falcon de 10 ml) afin d'obtenir une interface plus importante. Quand plusieurs prélèvements sont réalisés, tels plusieurs prélèvements sur les deux testicules d'un même patient, l'identification des différentes fractions est nécessaire. Après centrifugation (20 minutes à 300 g en général), les différentes fractions correspondantes sont rassemblées. Puis pour chaque fraction, un lavage par centrifugation (5 mm en général) en présence de milieu de culture pour spermatozoïdes permettra d'éliminer le Puresperm®. Puis les différentes fractions seront numérotées en spermatozoïdes après observation sous microscope inverse.

Pour le gradient composé de 3 couches, il est possible d'utiliser les concentrations en Puresperm® de 90 %, 80 % et 47,5 % dilué avec du milieu de culture des spermatozoïdes. La densité de la solution de 47,5 % en Puresperm® correspond en fait à la densité des cellules rondes.

Si 2 couches sont utilisées, des concentrations en Puresperm® de 80 et 47,5 % peuvent être employées.

Selon Mollari-Fabricelli (1997)⁹⁸, il serait également possible d'utiliser une seule couche à 80 % de Puresperm : après dilacération du prélèvement testiculaire, la suspension spermatique nécessite une incubation de 1 à 2 heures. Elle est ensuite déposée sur un gradient

de densité à une couche de 80 %, dans un ou plusieurs tubes à fond rond (il est nécessaire de déposer seulement 0,5 à 0,75 ml de suspension sur 1 ml de la fraction 80 % afin de ne pas saturer l'interface).

4) Techniques complémentaires

a) Tampon de lyse des érythrocytes

L'addition d'un tampon de lyse des érythrocytes permet une meilleure identification des spermatozoïdes car le principal obstacle à la recherche des spermatozoïdes dans le tissu testiculaire est l'abondance des érythrocytes¹⁰⁰. En effet, la présence d'une très grande concentration d'érythrocytes et la rareté des spermatozoïdes rend la recherche beaucoup plus longue.

Selon Nagy et al. (1997)¹⁰⁰, après dissociation et centrifugation de la préparation, le

culot est remis en suspension dans 2 à 4 ml de tampon de lyse des érythrocytes (155mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, et 2mM ethylenediaminetetraetic acid ; pH 7,2) pendant 10 minutes à température ambiante. Puis 2 lavages sont réalisés dans différents milieux de culture pour éliminer le tampon de lyse des érythrocytes. Le culot de centrifugation est alors examiné. Lors de 15 cycles réalisés chez des patients azoospermiques non obstructifs, aucun spermatozoïde n'avait été retrouvé après dissociation mécanique. L'utilisation du tampon de lyse des érythrocytes a permis de retrouver des spermatozoïdes lors de 7 cycles, mais le temps moyen de recherche était encore de 81 minutes (de 60 à 120 mn). Par ailleurs, aucune différence n'a été observée entre les taux de fécondation et de transfert d'embryon après utilisation des deux méthodes sur 5 prélèvements de sujets azoospermiques obstructifs. Ce qui montrerait que le tampon de lyse des érythrocytes n'a pas d'effet délétère sur les spermatozoïdes.

Dans l'expérience du centre de FIV du CHU de Bordeaux, le tampon de lyse des érythrocytes testé sur des spermatozoïdes émis entraînait une diminution nette de la mobilité des spermatozoïdes entre 1h et 4h après son utilisation, ce qui était susceptible de gêner le repérage des spermatozoïdes lors de l'ICSI (résultats non publiés).

Nous savons que lorsque les spermatozoïdes des mammifères quittent les tubesséminifères, ils sont encore immatures et n'ont pas encore acquis une mobilité progressive. Les spermatozoïdes subissent un processus de maturation en gagnant une mobilité progressive lors de leur passage dans l'épididyme, où surviennent des changements importants dans la fonction, la composition et l'organisation du spermatozoïde¹⁵⁸.

Certains auteurs ont pensé que dès que des spermatozoïdes quittent les tubes séminifères, et si ils sont mobiles (ou tremblant légèrement), ils pourraient avoir le potentiel d'acquérir une mobilité progressive et une morphologie améliorée par culture in vitro sans passage au préalable par l'épididyme.

Lin et al. (1997)⁸⁸ ont étudié l'effet de la culture in vitro (dans du milieu H-HTF ou liquide tubaire humain tamponné à l'HEPES ; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) sur les spermatozoïdes de sujets azoospermiques obstructifs et non obstructifs. Il existe une amélioration significative de la morphologie et de la mobilité des spermatozoïdes après culture in vitro de spermatozoïdes frais et congelés dans le cas d'azoospermie obstructive (la mobilité des spermatozoïdes cultivé atteignait un pic après 72 heures).

Les sujets azoospermiques non obstructifs (20 patients) ont été subdivisés en 2 groupes : un premier groupe de 11 patients présentant des spermatozoïdes frais tremblant légèrement, un deuxième groupe de 9 patients présentant seulement des spermatozoïdes immobiles. Dans le 1^{er} groupe, la mobilité de 6 échantillons sur 11 a été améliorée : dans ces 6 cas, il n'existait au départ aucun spermatozoïde présentant une mobilité progressive. La culture in vitro a permis d'obtenir des spermatozoïdes progressifs chez ces 6 cas. Par contre, dans les 5 autres cas la mobilité n'a pas été améliorée. Les auteurs concluent que dans le cas de spermatozoïdes remuant faiblement, le résultat de la culture est donc incertain. Dans le 2^{ème} groupe présentant seulement des spermatozoïdes immobiles, la culture in vitro n'a pas permis d'obtenir de spermatozoïdes mobiles. Les auteurs conseillent donc, dans le cas d'azoospermie non obstructive d'extraire les spermatozoïdes et de les injecter le même jour que la ponction oocytaire.

Toutefois, une question peut être posée : l'ICSI nécessitant des spermatozoïdes mobiles, est-il nécessaire de réaliser une culture in vitro dans les cas où il existe déjà au départ des spermatozoïdes mobiles ?

Une alternative pour sélectionner les spermatozoïdes testiculaires viables est le test hypo-osmotique : il consiste à plonger les spermatozoïdes dans un environnement d'osmolarité plus faible : les spermatozoïdes dont la membrane cellulaire est restée intacte présenteront un flagelle gonflé et enroulé. Selon Casper et al. (1996)¹⁸, les taux de fécondation en ICSI étaient de 26 % après sélection randomisée de spermatozoïdes testiculaires, mais après injection des spermatozoïdes sélectionnés par le test hypo-osmotique, les taux de fécondation augmentaient à 43 %, ce qui se rapproche des résultats obtenus avec des spermatozoïdes mobiles⁸⁸. Néanmoins, l'utilisation de solutions hypo-osmotiques standards

c) *Utilisation du test hypo-osmotique (HOS ou hypoosmotic swelling test)*

D'après cet auteur, la culture in vitro utilisant de la FSH recombinante permet d'augmenter la mobilité des spermatozoïdes testiculaires, et partant le succès de l'ICSI. La différenciation in vitro des cellules de la spermatogénèse¹⁴⁵.

L'effet de la FSH recombinante sur la mobilité des spermatozoïdes pourrait être médiate par les cellules de Sertoli. Le récepteur à la FSH et l'ARNm du récepteur de la FSH ont déjà été mis en évidence dans les cellules de Sertoli⁶⁵. Les spermatozoïdes testiculaires perdent probablement le contact avec les cellules de Sertoli après dilacération mécanique. Donc pendant la culture, l'action des cellules de Sertoli sur les spermatozoïdes doit s'effectuer à distance. Cette action supposée à distance des cellules de Sertoli sur la mobilité des spermatozoïdes doit être similaire à l'effet (déjà mis en évidence) de la FSH sur la viabilité et

supplémentaire en FSH recombinante par rapport au groupe utilisant le milieu simple. Soixante douze pour cent des ovocytes du groupe utilisant le milieu simple (29 supplémentaires en FSH recombinante ont pu être injectés avec des spermatozoïdes mobiles) supplémentaires dans le groupe utilisant le milieu simple. Par ailleurs, les taux de fécondation (69 contre 42 %), les taux d'implantation par embryon (20 contre 13 %), et les taux de grossesse (48 contre 30 %) étaient significativement augmentés dans le groupe utilisant le milieu

Netherlands) chez 73 patients. Balaban et al (1999)¹³ ont cultivé in vitro des spermatozoïdes testiculaires provenant de 143 sujets azoospermiques non obstructifs. Ils ont comparé les résultats obtenus en utilisant d'une part un milieu simple : EBSS (Earle's balanced salt solution, Sigma, Aldrich Co. Ltd, Irvine, Paisley, UK) supplémenté avec 0,5 % d'albumine sérique humaine HSA (human serum albumin, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) chez 70 patients et d'autre part ce même milieu supplémenté de FSH recombinante (Puregon ; Organon, Os, The

contenant du fructose et de la glycine peut être toxique pour les spermatozoïdes avant l'ICSI. Tsai et al (1997)¹⁴⁶ ont mis au point un test hypoosmotique optimal après essai de quatre types de solutions hypoosmotiques différentes. Selon cette équipe, une solution de 150-mOsm de NaCl est optimale pour sélectionner les spermatozoïdes viables avant ICSI, mais les spermatozoïdes ne doivent pas être mis en présence de cette solution plus d'une minute. Ahmadi et Ng (1997)¹ ont modifié le test hypoosmotique : ils aspirent les spermatozoïdes individuellement dans une micropipette remplie au préalable par du milieu hypoosmotique, et quand le flagelle commence à enfler, le spermatozoïde viable est injecté directement.

d) *Pentoxifylline*

D'après Hinev et al. (2000)⁶⁶, il est bien établi que de hauts taux de fécondation et de grossesse en ICSI avec des spermatozoïdes testiculaires sont étroitement corrélés au pourcentage de spermatozoïdes mobiles extraits.

L'immobilité des spermatozoïdes n'est pas rare dans les biopsies testiculaires. Le manque de mouvement ne signifie pas la mort toutefois, et cela peut être mieux mis en évidence après simple culture du tissu testiculaire : on observe un léger mouvement du spermatozoïde. Quelquefois les spermatozoïdes doivent être observés pendant longtemps, jusqu'à ce que finalement l'on remarque un tremblement à peine perceptible. Cela peut être un procédé assez long et qui souvent ne retrouve pas de spermatozoïdes mobiles. Selon cette équipe, après un lavage simple en milieu de culture, une mobilité spontanée des spermatozoïdes était retrouvée chez seulement 15/48 (31.2%) des échantillons.

Les protéines kinase AMPC dépendantes stimulent la phosphorylation de composants axonémaux, ce qui entraîne le mouvement du spermatozoïde. La pentoxifylline augmentant la concentration intracellulaire d'AMPC pourrait donc induire la mobilité des spermatozoïdes immobiles testiculaires.

L'ajout de pentoxifylline dans les 33 autres cas a induit une mobilité suffisante pour l'ICSI dans 24/33 (72.7%) des échantillons. En traitant le tissu testiculaire par la pentoxifylline, la mobilité des spermatozoïdes devenait plus stable et plus prolongée, en comparaison à un simple lavage en milieu de culture.

Ces résultats mériteraient d'être confirmés par d'autres études.

Toutefois, peu de travaux ont été réalisés dans le but de vérifier si ces spermatozoïdes plus répandue demeurant la dilacération mécanique du tissu testiculaire. Toutefois, certains auteurs³⁷, n'hésitent pas à combiner plusieurs procédés (séparation mécanique, tampon de lyse des érythrocytes, procédés enzymatiques et culture in vitro) pour obtenir un taux de récupération des spermatozoïdes avoisinant les 70 %.

D) CONGELATION DES SPERMATOZOÏDES TESTICULAIRES

La cryoconservation du testicule revêt une extrême importance en procréation médicale assistée. Les explorations testiculaires étant des explorations invasives et coûteuses, il est indispensable de limiter le nombre d'interventions sur le testicule. L'incidence de biopsies multiples sur la spermatogenèse est loin d'être négligeable comme nous le verrons par la suite. De plus, en cas d'insuffisance testiculaire sévère, la probabilité de retrouver des spermatozoïdes au sein des tubes séminifères est fortement diminuée en cas de ponctions répétées. Il est donc indispensable de pouvoir conserver les spermatozoïdes testiculaires recueillis lors d'une exploration ou surnuméraires (non utilisés après dilacération de la biopsie effectuée à visée thérapeutique).

L'utilisation de spermatozoïdes testiculaires congelés procure plusieurs avantages pour l'ICSI, en particulier pour les hommes azoospermiques obstructifs et non obstructifs. La congélation des spermatozoïdes testiculaires permettrait d'éviter des cycles de stimulation inutiles chez la femme lorsqu'aucun spermatozoïde ne peut être retrouvé lors de la biopsie. La congélation des spermatozoïdes permet surtout de diminuer la répétition des biopsies, notamment chez les patients présentant de petits testicules. Par ailleurs, des taux de fécondation identiques ont été retrouvés par certains auteurs avec des spermatozoïdes frais ou congelés utilisés en ICSI^{51, 88}.

Toutefois, peu de travaux ont été réalisés dans le but de vérifier si ces spermatozoïdes présentèrent les mêmes exigences que les spermatozoïdes éjaculés pour réaliser une congélation optimale. La faible quantité de tissu testiculaire disponible et le faible nombre de spermatozoïdes présent dans le tissu testiculaire permettent difficilement de comparer les

protocoles de congélation, les différents cryoprotecteurs et les méthodes de préparation avant et après congélation. Les méthodes de congélation des spermatozoïdes testiculaires reposent donc sur l'expérience acquise avec les spermatozoïdes éjaculés, sans tenir compte des caractéristiques physico-chimiques des différents types cellulaires présents dans le tissu testiculaire.

Plusieurs méthodes de congélation ont été proposées :

Craft et Tzirigotis (1995)²⁵ ont recommandé de placer individuellement chaque spermatozoïde sous huile de paraffine avec un volume égal de glycérol.

Dans des cas où seulement quelques spermatozoïdes sont isolés, Cohen et al (1997)²¹ décrivent l'insertion individuelle des spermatozoïdes dans des ovocytes de hamster dépellucidés. Bien que cette technique permette la congélation individuelle de chaque spermatozoïde, elle est assez coûteuse en temps et en personnel.

Romero et al (1996)¹¹³ ont mélangé chaque spermatozoïde avec du tissu testiculaire pour former des « pilules » congelées. Le tissu était homogénéisé à l'aide d'une lame en verre, et des gouttes de 100 microlitres furent placées sur de la glace pour créer des « pilules » congelées. Puis ces « pilules » furent plongées dans l'azote liquide (Chez 2 sujets atteints du syndrome des cellules de Sertoli seules de manière incomplète, le taux de fécondation avoisinait les 60 %). Gil-Salom et al (1996)⁵⁵ ont obtenu des grossesses en utilisant des « pilules » pour l'ICSI concernant des patients azoospermiques obstructifs et non obstructifs.

La cryoconservation de fragments biopsiques entiers est beaucoup plus rarement utilisée⁶⁹. Les effets de la cryoconservation sur une structure testiculaire intacte (maintien en particulier des interactions entre cellules germinales et somatiques) seraient intéressants à analyser. Il faudrait savoir si le pouvoir fécondant du spermatozoïde après décongélation n'est pas amélioré par rapport aux techniques précédentes.

D'autres chercheurs¹⁰⁸ ont utilisé des techniques simples de congélation en incluant des portions entières de tissu testiculaire. Certaines équipes ont utilisé du glycérol pour la congélation de tissu testiculaire avant ICSI : Crabbé et al. (1998)²⁴ ont montré en utilisant du glycérol que la congélation du tissu testiculaire à l'état de suspension préserve la motilité (type b+c) des spermatozoïdes de façon significative par rapport à la congélation de biopsies entières (9.2 % de b+c contre 4 %). La vitalité était également mieux conservée (39 contre 25 %). D'autres auteurs sont plus sélectifs sur le matériel à congeler : Allen et Colman (1997)³

ont congelé de manière isolée des portions de tubules séminifères, dont les spermatozoïdes étaient extraits plus facilement après décongélation.

Des protocoles plus récents combinent la digestion enzymatique d'échantillons congelés avec des techniques de séparation cellulaire. Par exemple, Aslam et al (1998)¹¹ ont utilisé la digestion enzymatique pour séparer les spermatocytes de premier ordre, les spermatoïdes ronds, et les spermatoïdes allongés par vitesse de sédimentation, gradients de Percoll discontinus, et sélection cellulaire par anticorps fluorescents (FACS pour fluorescent antibody cell sorting). Selon cette équipe, des groupes spécifiques de spermatozoïdes peuvent être congelés après séparation et après décongélation la viabilité de ces groupes isolés de cellules était significativement plus élevée par rapport à celle observée pour les populations mélangées.

Ces types de protocoles FACS pourraient être applicables pour l'identification des spermatoïdes ronds utilisés lors de l'injection de spermatoïdes ronds (ROSI pour round-spermatoïd injection, Tesarik et al, (1998)¹³⁷) ou lors de l'injection du noyau des spermatoïdes ronds (ROSONI, Sofakitis et al, (1998)¹³¹). Ces techniques ont été utilisées dans seulement quelques centres : en effet, d'une part l'identification des spermatoïdes ronds par microscopie optique manque de critères spécifiques¹⁵¹, d'autre part la séparation manuelle des cellules est un processus laborieux. Lorsque cette technologie de séparation cellulaire deviendra disponible, les cellules immatures pourront être identifiées plus rapidement : ces techniques pourraient devenir plus employées en pratique clinique.

En azoospermies non obstructives ont été regroupés les patients présentant une azoospermie d'origine testiculaire (48 tentatives en frais) ou prétesticulaire (4 tentatives en frais). En azoospermie obstructive ont été regroupés les patients présentant une azoospermie histologie.

Les patients ont été classés en azoospermie non obstructive et en azoospermie obstructive de façon rétrospective en tenant compte pour chaque patient des différents éléments disponibles dans les dossiers d'andrologie et de FIV, et après entretien avec l'andrologue : antécédents du patient, volume testiculaire, taux de FSH, taux d' α 1-4 glucosidase séminale, et surtout azoospermie non obstructive, et 38 chez des patients présentant une azoospermie obstructive. Parmi ces 90 tentatives, 52 ont été réalisées chez des patients présentant une azoospermie non obstructive, 38 chez des patients présentant une azoospermie obstructive. Les dossiers d'andrologie ont été confrontés aux dossiers clinico-biologiques d'assistance médicale à la procréation : 90 biopsies testiculaires. Les biopsies testiculaires sont réalisées le même jour que la ponction ovocytaire.

Cette étude rétrospective porte sur tous les cas de biopsies testiculaires en vue de FIV réalisés à Bordeaux depuis 1995 jusqu'à décembre 2000.

a) *Sélection des patients*

1. Patients

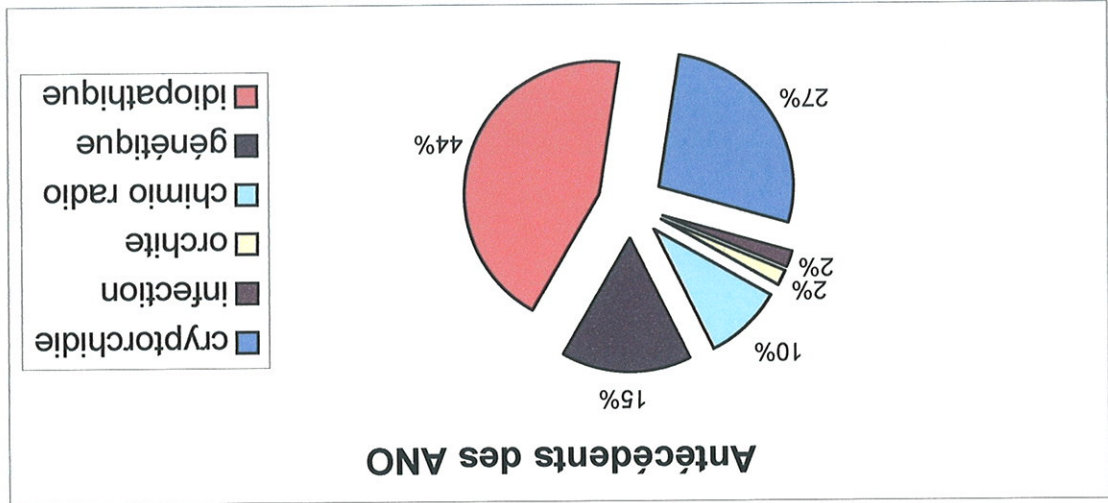
I. MATERIEL ET METHODES

Notre étude a pris en compte de façon rétrospective les cas de TESE effectués au CHU de Bordeaux en présence d'une azoospermie non obstructive soit concomitantes du recueil ovocytaire en vue d'une FIV-ICSI, soit avec des spermatozoïdes congelés afin d'évaluer les résultats et de les comparer à ceux obtenus pour les ponctions masculines d'autres indications (TESE pour azoospermies obstructives et prélèvements épидидymo-déferentiels). Par ailleurs, les différents critères prédictifs de la présence de spermatozoïdes testiculaires ont été étudiés. L'objectif étant la mise en place d'une conduite à tenir ultérieure pour les sujets azoospermiques non obstructifs.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE

Au niveau des antécédents, 14 patients présentent une cryptorchidie (27 % des cas), 1 a présenté une infection génitale à Chlamydia (2 % des cas), 1 patient a été atteint d'une orchite virale (oreillons) à 11 ans (2 % des cas), 5 ont subi des cures de chimio et/ou

Figure 7 : Antécédents des sujets azoospermiques non obstructifs



b) Antécédents des patients azoospermiques non obstructifs

d'origine post-testiculaire (38 tentatives en frais). Les tissus testiculaires de ces patients ont été congelés après la tentative en frais, pour une éventuelle tentative utilisant les spermatozoïdes congelés.

Vingt-trois tentatives utilisent des spermatozoïdes testiculaires ayant été congelés après la première tentative. Parmi ces 23 tentatives, 8 ont été réalisées chez des patients azoospermiques non obstructifs (7 patients dont 1 un a réalisé deux tentatives) et 15 chez des patients azoospermiques obstructifs (12 patients, 3 patients ayant réalisé deux tentatives).

Dans le groupe des azoospermies non obstructives, 51 hommes ont été traités (52 tentatives, 1 patient ayant subi une biopsie testiculaire à deux reprises). La moyenne d'âge est de 33.7 ans avec comme extrêmes : 23 à 52 ans.

L'azoospermie est d'origine testiculaire chez 48 patients, et d'origine prétesticulaire chez 4 patients.

Un patient présente une translocation t(3p14 8q12). Des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la biopsie thérapeutique, mais pas à l'histologie. Un dernier patient présente une formule 45 XY et une translocation robertsonienne t(13q 14q). Chez ce patient, des

lors de la biopsie thérapeutique, ni à l'examen histologique. Chez l'autre patient Klinfelter, aucun spermatozoïde n'a été retrouvé, ni l'examen histologique. Chez ce patient, la biopsie testiculaire a permis l'obtention d'une un patient pour lequel des spermatozoïdes ont été retrouvés à la fois lors de la biopsie et de Par ailleurs, deux autres patients présentent un Klinfelter homogène XXY. Il existe biopsie thérapeutique, mais pas à l'examen histologique.

Un patient présente la formule suivante : 45X, 46 XYq- (il existe une mosaïque du chromosome Y, une lignée prédominante 45 X et une lignée avec un chromosome Y remanié pseudodicertrique par délétion du bras long). Des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la cariotypes sont normaux, 5 anormaux.

Le cariotype des sujets azospermiques non obstructifs a également été réalisé : 47

d) *Caryotype des sujets azospermiques non obstructifs*

L'étude du chromosome Y chez les sujets azospermiques non obstructifs a été réalisée. Chez les 25 sujets azospermiques non obstructifs pour lesquels une délétion de l'Y a été recherchée, une a été identifiée : ce patient présente une délétion de l'Y au niveau de la région AZFc. Le cariotype est normal. Aucun spermatozoïde n'a été retrouvé lors de la biopsie testiculaire.

c) *Etude du chromosome Y chez les patients azospermiques non obstructifs*

obstructive est alors idiopathique. 23 patients (44 % des cas), aucun antécédent n'a été retrouvé, et l'azospermie non familiale, 1 patient une délétion de l'Y en AZFc, 1 dernier patient une drépanocytose). Chez chromosome Y pseudo dicentrique, 1 patient une maladie de Fabry et une azospermie patient une mosaïque 45X 46XYq- avec une majorité de cellules 45 X et une lignée avec un t13q 14q avec un cariotype 45 XY, 1 patient présentait une translocation robertsonienne avec 2 patients Klinfelter homogènes, 1 patient présentait une translocation robertsonienne radiothérapie (10 % des cas), 8 patients présentaient une maladie génétique (15 % des cas

- soit le premier jour du cycle avec stimulation par HMG (Human Menopausal Gonadotrophin) et/ou FSH après désensibilisation hypophysaire.
 - soit en phase lutéale du cycle précédent avec stimulation par HMG et/ou FSH
- Plusieurs types de protocoles d'hyperstimulation contrôlée ovarienne utilisant des agonistes du GnRH retard en IM ou en SC ont été administrés :

a) *Technique de stimulation de l'ovulation*

3) Déroulement de la TESE / ICSI

Les conjoints des sujets azoospermiques non obstructifs ont subi la ponction d'ovocytes (51 femmes dont une à deux reprises). L'âge moyen est de 29,1 ans, avec comme extrêmes de 20 à 39 ans. Cinq patientes présentaient un âge supérieur ou égal à 35 ans (9,8 % des femmes ponctionnées ayant pour partenaire un homme azoospermique non obstructif).

Les conjoints des sujets azoospermiques obstructifs ont subi la ponction d'ovocytes (30 femmes dont 7 à deux reprises). L'âge moyen est de 31,1 ans, avec comme extrêmes de 23 à 40 ans. Huit patientes présentaient un âge supérieur ou égal à 35 ans (24,2 % des femmes ponctionnées ayant pour conjoint un homme azoospermique obstructif).

2) Patientes

Dans notre étude, 38 biopsies ont été réalisées chez des patients azoospermiques obstructifs (31 patients, 7 patients ayant subi une biopsie à deux reprises). L'âge moyen des patients azoospermiques obstructifs est de 33,4 ans avec pour extrêmes 27 à 40 ans.

e) *Patients azoospermiques obstructifs*

spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la biopsie thérapeutique, l'histologie n'a pas été effectuée.

Les meilleures fractions (présentant le plus de spermatozoïdes mobiles progressifs lorsque cela est possible) sont alors sélectionnées pour l'ICSI : juste avant de procéder à l'ICSI, une centrifugation rapide à 5 000 tours /mn pendant 5 mn est réalisée dans une

- numération des spermatozoïdes
- mobilité des spermatozoïdes

évaluées en termes de :
spécifique aux spermatozoïdes (Ferticult® 5 mn à 1300 g), puis toutes les fractions sont 1300 g), toutes les fractions sont récupérées. Un lavage est réalisé dans du milieu de survie supérieurs gauche et droit, pôles inférieurs gauche et droit). Après centrifugation (20 mn à au dessus le tissu testiculaire. Les tubes sont identifiés selon leur origine géographique : pôles 75 et 50 %) mélangé à du Ferticult Hépès® (JCD, Lyon, MT 247B) sont préparés en déposant Plusieurs gradients de Puresperm® (JCD, Lyon, PS 0250) à 3 fractions différentes (90,

Arrivé au laboratoire, les prélèvements sont immédiatement pris en charge par le personnel du laboratoire : les fragments sont dilacérés séparément entre deux jantes stériles sous loupe binoculaire équipée de platine chauffante. Les suspensions ainsi constituées sont passées dans une aiguille de 19 G. Un petit échantillon est envoyé au laboratoire d'anatomopathologie pour l'examen histologique de la biopsie testiculaire.

c) Préparation du sperme testiculaire

La TESE et la ponction sont programmées le même jour : la biopsie testiculaire s'effectue de façon ouverte, en pratiquant une incision de 2 cm à travers le testicule. La pulpe testiculaire est prélevée en appuyant sur le testicule de part et d'autre de l'incision : le tissu émergeant du testicule est prélevé à l'aide de ciseaux chirurgicaux, puis récupéré dans des tubes contenant 1 ml de milieu de culture à 37°C. Le prélèvement est acheminé en suivant le laboratoire pour la recherche de spermatozoïdes : deux prélèvements sont réalisés sur le testicule choisi, un au pôle supérieur et un au pôle inférieur. Si des spermatozoïdes sont présents, la biopsie est terminée ; sinon une autre biopsie est réalisée sur le testicule controlatéral.

b) Etapes biologiques

La décoronisation consistant à dénuder les ovocytes s'effectue en plongeant les ovocytes pendant 1 minute dans un bain contenant de la hyaluronidase à 40 UI/ml (Medicult, Lyon) en procédant par aspiration et refoulement. Au fur et à mesure, la hyaluronidase va permettre l'hydrolyse des ponts reliant les cellules de la granulosa et entourant l'ovocyte. Les ovocytes dénudés sont alors lavés avec de l'IVF 50, et placés dans une étuve à 37°C sous 5 % de CO₂. Les ovocytes pour lesquels une vésicule germinative est observée ou chez lesquels aucun globe polaire ne peut être observé sont considérés comme immatures et ne seront pas microinjectés. Seuls les ovocytes matures en métaphase II (présentant un globe polaire dans l'espace périvitellin) seront microinjectés.

La recherche d'ovocytes s'effectue à partir du liquide folliculaire déversé dans des boîtes de Pétri stériles et sous loupe binoculaire. Les ovocytes isolés à la pipette sont lavés dans un milieu de rinçage spécifique (Ferticult®) puis déposés dans des boîtes NUNC® contenant de l'IVF 50® (JCD, Lyon, 12008) et préparées la veille. Après avoir collecté tous les ovocytes, la boîte est placée à 37°C sous 5 % de CO₂ en attendant la décoronisation.

Après stimulation ovarienne sous contrôle échographique et biologique, l'ovulation est déclenchée 36 h avant l'heure de programmation par injection d'une dose unique de 10 000 UI d'hCG. La ponction ovocytaire est réalisée à l'aiguille, sous contrôle échographique par voie transvaginale au bloc opératoire. Le liquide folliculaire est recueilli dans des tubes en plastiques stériles de 10 ml, eux-mêmes placés dans des blocs chauffés à 37°C.

d) Ponction d'ovocytes chez la femme

microcentrifugeuse en utilisant des microcupules coniques en plastique. La préparation est placée dans une étuve à 37 °C, en attendant l'ICSI.

Des microgouttes de 5 µl de milieu de culture destinées à contenir chacune d'elle un ovocyte sont déposées au fond d'une boîte de Pétri. Une ou deux microgouttes contenant une solution de PVP (polyvinylpyrrolidone, Medicult, Lyon) pure ou à 50 % sont déposées. Ces gouttes sont recouvertes d'huile minérale stérile Ovoil® (JCD, Lyon, 100 ml). Puis les ovocytes recueillis lors de la ponction sont déposés un à un dans les microgouttes, à raison d'un ovocyte par microgoutte. Les spermatozoïdes testiculaires sont déposés dans les microgouttes contenant la PVP, le rôle de la PVP consistant à ralentir les spermatozoïdes dans leur déplacement pour pouvoir être plus facilement attrapés. Le micromanipulateur est constitué de deux bras fixés sur le microscope et relié à des manettes de direction, sur chacun desquels est montée une micropipette :

- La micropipette de gauche servira à assurer le maintien de l'ovocyte lors de l'injection, le globe polaire de l'ovocyte étant positionné dans la direction 12 heures ou 6 heures,
- La micropipette de droite servira dans un premier temps à capturer le spermatozoïde mobile après lui avoir lésé le flagelle puis à l'aspirer dans la pipette, et dans un deuxième temps à injecter le spermatozoïde dans l'ovocyte maintenu par la micropipette de contention.

e) Dérivement de l'ICSI

(labo FIV CHU Pellegrin)

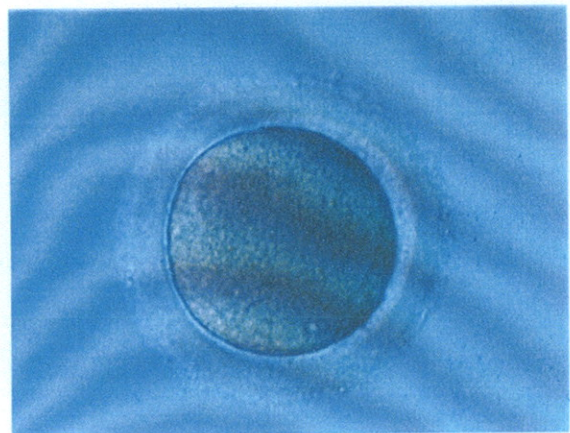


Photo 13 : Ovocyte immature sans GP

(labo FIV CHU Pellegrin)

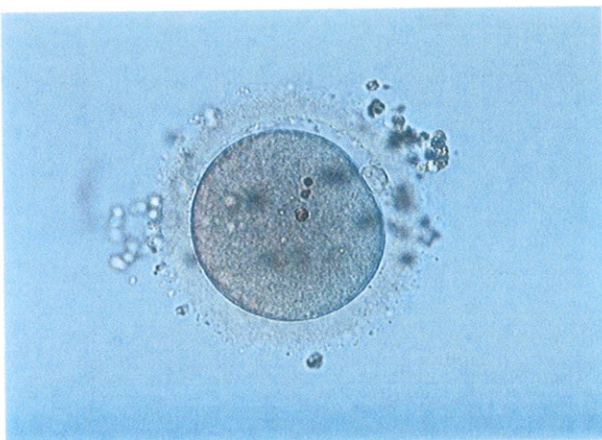


Photo 14 : Ovocyte mature (Métaphase II)

Photo 16 : Ovocyte atreétique (labo FIV CHU Pellegrin)

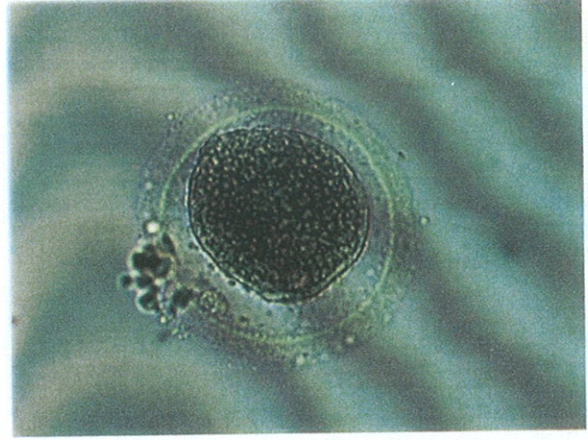
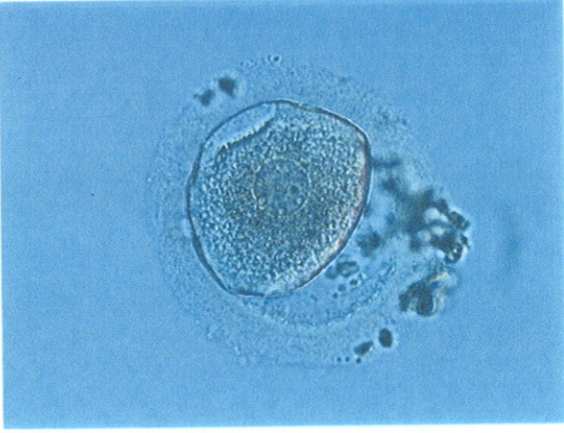


Photo 17 : Ovocyte à 1 PN (labo FIV CHU Pellegrin)



f) *Suivi des zygotes et des embryons*

Après la microinjection, les ovocytes sont récupérés et placés dans des boîtes NUNC à raison d'un par puits dans du milieu de culture embryonnaire (IVF 50®, JCD, Lyon), et mis dans une étuve à 37°C sous 5 % de CO₂.

Photo 15 : Microinjection (labo FIV CHU Pellegrin)

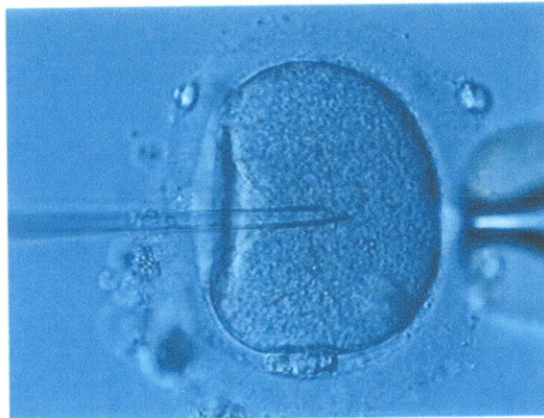


Photo 20 : Embryon à 2 cellules
(labo FIV CHU Pellegrin)

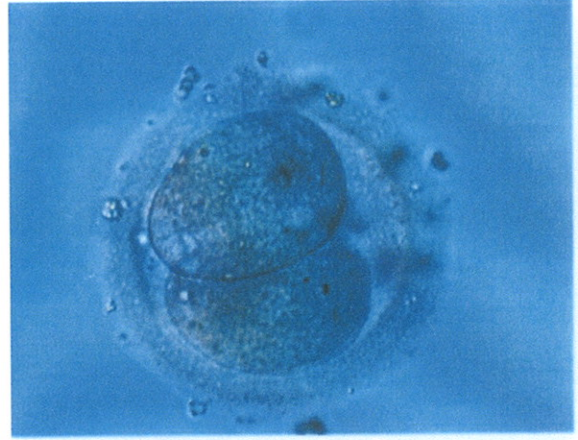
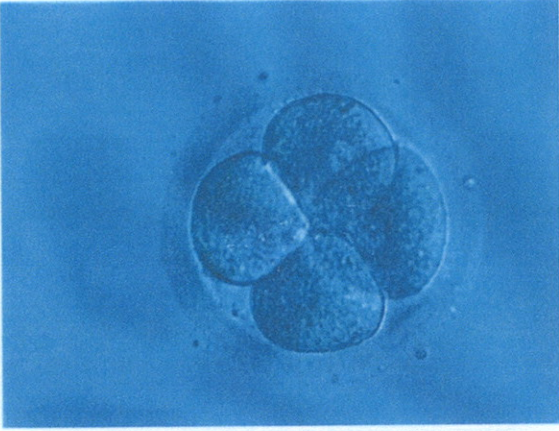


Photo 21 : Embryon à 4 cellules
(labo FIV CHU Pellegrin)



Les embryons sont examinés le lendemain (à J1) après environ 18 h d'incubation : c'est le moment propice à l'observation des deux pronuclei (mâle et femelle) dans l'ovocyte : cela signe la fécondation. Le *taux de fécondation* est le rapport entre les zygotes obtenus à 2 PN et le nombre d'ovocytes injectés.

Photo 18 : Ovocyte à 3 PN
(labo FIV CHU Pellegrin)

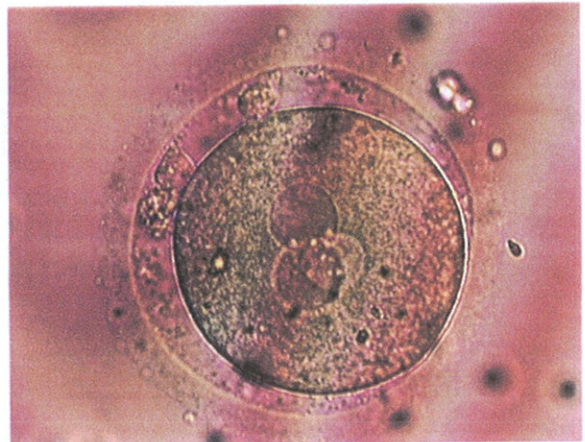
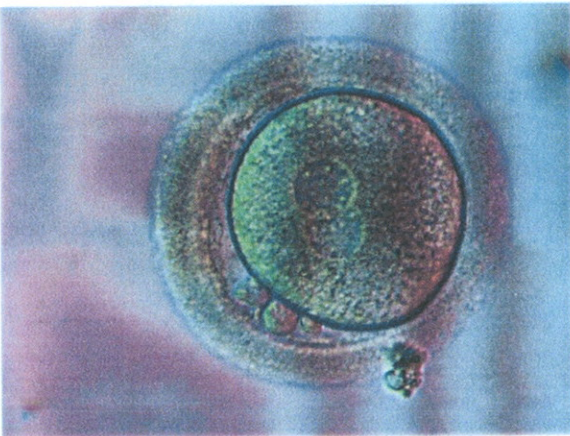


Photo 19 : ovocyte à 2 PN
(labo FIV CHU Pellegrin)



Toutes les fractions de spermatozoïdes testiculaires non utilisées lors de l'ICSI sont congelées en vue d'une nouvelle tentative, en précisant pour chacune la traction, son origine au niveau du testicule, la numération et la mobilité.

Le protocole de congélation utilisé est identique au protocole de congélation des spermatozoïdes éjaculés. L'appareil de congélation utilisé est le Minicool. La suspension testiculaire est diluée volume à volume dans du milieu Irvine® (freezing medium TYB with glycerol, Irvine Scientific). Puis la suspension est montée dans des paillettes (identiques à celles utilisées pour la congélation des spermatozoïdes éjaculés). Trois descentes en température successives sont réalisées : - 5°C / mn de 20°C à - 8°C (température à laquelle est réalisé un apport plus intensif d'azote), - 10°C / mn de - 8°C à - 25°C et - 25°C / mn de - 25°C à - 140°C, avant de plonger les paillettes dans l'azote.

g) Congélation des spermatozoïdes

Quinze jours après, le dosage d'HCG sanguin est pratiqué. Une grossesse clinique est définie par un taux de β HCG > 1000 UI/l ou un sac gestationnel vu à l'échographie. Un simple test positif > 1000 UI/l isolé est considéré comme une grossesse biochimique et ne sera pas comptabilisé dans le décompte des grossesses cliniques. Les grossesses cliniques diminuées des fausses couches spontanées représentent les *grossesses évolutives du 2^{ème} trimestre*. Au final, l'accouchement finalise la tentative d'AMP.

Les embryons excédentaires de bonne qualité (moins de 10 % de fragmentation cytoplasmique) pourront être congelés (en vue d'un transfert éventuel), les autres seront mis en culture en vue d'une congélation éventuelle s'ils atteignent le stade blastocyste.

Il sera alors possible de choisir un, deux ou trois embryons et procéder au transfert. Le *taux de segmentation* calculé dans cette étude est le rapport entre le nombre d'embryons obtenus et le nombre d'ovocytes injectés.

Le surlendemain (à J2), et dans le cas d'un développement favorable, il est possible d'observer des embryons au stade quatre cellules. Les embryons sont évalués en fonction de différents critères, tels que le nombre de blastomères, la régularité des blastomères entre eux, la présence et l'importance des fragments cytoplasmiques.

Un échantillon de la biopsie testiculaire, après dilacération et passage à travers une aiguille de 19 G est envoyé au laboratoire d'anatomopathologie pour examen histologique. Les lames ont subi une coloration triple utilisant l'hémalum (colorant les noyaux en bleu), l'érythroisine (colorant les cytoplasmes en rouge) et le safran (colorant le collagène en jaune). A partir de chaque compte-rendu, il a été possible de déterminer la présence ou l'absence de spermatozoïdes dans l'examen histologique. Le classement histologique de la biopsie testiculaire s'est fait en fonction de la classification donnée par Levin (1979)⁸⁷ (fibrose, syndrome des cellules de Sertoli seules ou SCO ou aplasie germinale, arrêt de maturation, hypospERMATogénèse et histologie normale). Par ailleurs pour chaque cas, le stade histologique le plus avancé de la lame est utilisé pour caractériser le patient (Su et al., 1999)¹³³ : dans notre étude, les comptes-rendus histologiques étant surtout descriptifs, ces derniers ont été classés en différentes catégories :

- **SCO** lorsque le frotis ne présentait que des cellules de Sertoli, et aucune cellule germinale.
- **Arrêt de maturation** quand la spermatogénèse s'arrêtait au stade des spermatogonies, spermatoocytes (de premier ou de second ordre) voire également au stade des spermatozoïdes ne sont pas présents.
- **HypospERMATogénèse** quand la densité des cellules germinales était inférieure à la normale et dans les cas où restaient quelques spermatozoïdes, voire d'exceptionnels spermatozoïdes.
- **Fibrose** lorsque le tissu testiculaire était entièrement hyalinisé.
- Aucun cas d'histologie normale n'a été retrouvé chez les patients azoospermiques non obstrués étudiés.

Selon Su et al (1999)³³, le résultat de la TFSB ne dépend pas en effet de l'état général du testicule prélevé : il suffit d'un petit foyer de spermatogénèse dans un testicule pour pouvoir extraire des spermatozoïdes. Par ailleurs, la quantité de tissu prélevé pour l'histologie étant beaucoup plus faible que celle prélevée pour la récupération des spermatozoïdes, un testicule étiqueté par exemple en hypospERMATogénèse avec la présence d'exceptionnels spermatozoïdes après examen histologique aura de fortes chances de présenter des spermatozoïdes dans l'analyse extemporanée du tissu testiculaire.

2). Par ailleurs, les ponctions déférentielles et les ponctions épididymaires ont été regroupées. Les résultats apparaissent sous la forme de tableaux (Tableaux 3 et 4) : il sera possible d'établir des comparaisons avec les biopsies réalisées chez les patients azoospermiques non obstructifs.

Les biopsies testiculaires ont été réalisées chez des patients présentant une azoospermie obstructive ou non obstructive. Les résultats exprimés en terme de récupération des spermatozoïdes, de grossesses sont récapitulés dans les tableaux suivants (Tableaux 1 et 2). Les biopsies testiculaires ont été réalisées chez des patients présentant une azoospermie obstructive ou non obstructive. Les résultats exprimés en terme de récupération des spermatozoïdes testiculaires.

Dans un deuxième temps, nous étudierons les facteurs prédictifs de la présence de spermatozoïdes testiculaires. Dans un premier temps, nous allons analyser les résultats obtenus pour les TESE réalisées chez les sujets azoospermiques non obstructifs et les comparer d'une part à ceux obtenus après TESE chez les sujets azoospermiques obstructifs, d'autre part à ceux obtenus après ponction épididymaire ou déférentielle.

II) RESULTATS des ANO à BORDEAUX

Les comparaisons des résultats entre les 6 catégories d'ICSI (TESE-ICSI pour azoospermie non obstructive, TESE-ICSI pour azoospermie obstructive et ICSI après ponction épididymaire ou déférentielle après utilisation dans chaque cas de spermatozoïdes frais ou congelés) ont été réalisées au moyen du logiciel Epi-info 6, en prenant le seuil de risque $\alpha = 0.05$.

i) Analyse statistique des données

Sur 52 tentatives réalisées chez des patients azoospermiques non obstructifs, 48 sont documentées au niveau de l'histologie.

Tests statistiques	ANO	ANO	Azoo obst	Azoo obst
Recueil + de spermatozoïdes	20	8	34	15
Age moyen femmes	28.3 ± 3.6	29.5 ± 4.1	30.9 ± 3.9	33.2 ± 4.9
Age moyen hommes	32.2 ± 3.5	33.5 ± 3.5	33.4 ± 3.9	36.7 ± 3.3
Nombre total d'ovocytes recueillis (P+)	149	40	215	106
Nbre ov / P +	7.45 ± 6.26	5 ± 3.02	6.51 ± 4.07	7.07 ± 4.99
Nbre ♀ ≥ 35 ans	0	0	6	5
Nbre ov / P + chez ♀ < 35 ans	7.45 ± 6.26	5 ± 3.02	6.30 ± 3.70	7.20 ± 4.64
Nombre total d'ovocytes matures (P+)	125	36	165	83
Nbre ov matures / P +	6.25 ± 5.62	4.5 ± 2.83	5 ± 2.96	5.5 ± 3.5
Nbre ov matures / P + chez ♀ < 35 ans	6.25 ± 5.62	4.5 ± 2.83	4.92 ± 2.74	5.9 ± 3.3
Nombre total d'ovocytes injectés	100	36	165	83
Nbr ov injectés / P +	5 ± 5.48	4.5 ± 2.83	5 ± 2.96	5.5 ± 3.5
Nbr ov injectés / P + chez ♀ < 35 ans	5 ± 5.48	4.5 ± 2.83	4.92 ± 2.74	5.9 ± 3.3
Nombre zygoles (2 PN)	38	3	82	38
Taux fécondation (%)	38 %	8.3 %	49.7 %	44.7
NS				
Nombre à 1 PN	1	0	4	2
Nombre à 3 PN	0	1	7	2
Embryons	37	4	93	42
Nombre d'embryons / P +	1.85 ± 1.90	0.5 ± 0.76	2.82 ± 2.44	2.8 ± 2.51
(b-c) p=0.04				
Taux de segmentation (%)	37 %	11 %	56 %	49 %
NS				
Nombre de transferts	14	3	29	12
Embryons transférés	31	4	61	28
Nombre d'embryons transférés / P +	1.55 ± 1.32	0.5 ± 0.76	1.85 ± 1.03	1.87 ± 1.19
(a-b) p=0.04				

Tableau 2 : Résultats des Fonctions des sujets ANO et AO

a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes

Cinquante deux cycles ont été réalisés en frais et 8 en congelé.

En frais, le taux de récupération des spermatozoïdes est de 38,5 % (20 tentatives sur 52, avec 14 cas sur 20 où aucune mobilité n'est observée). Lors de 32 tentatives, aucun spermatozoïde n'a été retrouvé à la biopsie. La moyenne d'âge de ces 32 patients (34,6 ans) n'est pas significativement différente de celle obtenue chez les 20 patients azospermiques non obstructifs pour lesquels des spermatozoïdes ont été retrouvés (32,2 ans). Trente-et-un pour cent de ces 32 patients présentaient des antécédents de cryptorchidie, 3 % d'orchite virale (oreillons à 11 ans pour 1 patient), 3 % d'infection génitale, 13 % de chimiothérapie et de radiothérapie, 6 % de maladie génétique et chez 44 % des patients aucun antécédent n'a été retrouvé. Dans notre étude, la cryptorchidie est un antécédent retrouvé dans environ un tiers des cas de patients azospermiques non obstructifs chez lesquels aucun spermatozoïde n'a été retrouvé.

En congelé, sur 8 cycles de décongélation, le taux de récupération des spermatozoïdes était de 100 %. Après décongélation, la numération et la mobilité moyennes sont difficilement évaluables. Pour chaque ovocyte, 12 minutes environ ont été nécessaires pour trouver un spermatozoïde et l'injecter, et 57 % des ovocytes (20 sur 35) ont été injectés avec des spermatozoïdes immobiles.

b) Analyse des femmes

En frais, l'âge moyen des femmes dont les conjoints ont présenté un recueil de spermatozoïdes positif est de 28,3 ans, avec comme extrêmes de 21 à 33 ans. En congelé, 8 tentatives ont été réalisées (7 femmes dont une à deux reprises) donnant un âge moyen de 29,5 ans, avec pour extrêmes de 21 à 34 ans. Les âges moyens des femmes en frais et en congelé ne sont pas significativement différents. Ce sont en effet les mêmes femmes, et les tentatives en congelé ne sont pas très éloignées dans le temps des tentatives en frais.

En frais, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 7,45, le nombre d'ovocytes matures par ponction est de 6,25 et le nombre moyen d'ovocytes microinjectés par ponction est de 5. En congelé, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 5, le nombre d'ovocytes matures par ponction est de 4,5 comme le nombre moyen d'ovocytes

Sur les 8 cycles réalisés en congelé, 5 n'ont pas donné d'embryons. Chez une patiente de 34 ans, 3 ovocytes matures ont été isolés et donc microinjectés. Deux tentatives ont été réalisées chez une femme de 30 ans, recueillant respectivement 2 ovocytes et 1 ovocyte lors des ponctions. Sept ovocytes matures ont été retrouvés chez une patiente de 29 ans injectés

insuffisant et dans 2 cas à l'injection de spermatozoïdes immobiles. Dans les cas d'azoospermie non obstructive en frais, les échecs de fécondation sont dus dans 2 cas à un nombre de spermatozoïdes insuffisant, dans 2 cas à un nombre d'ovocytes

pour la plupart immobiles chez des femmes âgées respectivement de 29 et 28 ans. Dans les cas d'azoospermie non obstructive en frais, les échecs de fécondation sont dus dans 2 cas à un nombre de spermatozoïdes insuffisant, dans 2 cas à un nombre d'ovocytes tentatives, 7 ovocytes matures dans chaque cas ont été microinjectés avec des spermatozoïdes non obstructifs pour lesquels des spermatozoïdes ont été retrouvés, 6 cycles n'ont pas donné d'embryons. Lors de 2 tentatives, 1 seul spermatozoïde a pu être retrouvé et injecté. Lors de 2 autres tentatives, 1 seul ovocyte a été obtenu après la ponction d'ovocytes. Dans 2 autres tentatives, 7 ovocytes matures dans chaque cas ont été microinjectés avec des spermatozoïdes

Sur les 20 cycles réalisés en frais (sur les 52 au total) chez les sujets azoospermiques sans atteindre le seuil de significativité en raison des faibles effectifs.

Les taux de segmentation en frais (37 %) et en congelé (11 %) sont différents, mais

e) Taux de segmentation et échecs de segmentation

En frais pour les azoospermies non obstructives, 1 ovocyte à 1 PN a été obtenu pour 100 ovocytes injectés (soit un pourcentage d'aneuploïdie de 1 %) En congelé, 1 ovocyte à 3 PN a été obtenu pour 36 ovocytes injectés (soit un pourcentage d'aneuploïdie de 2.8 %).

d) Aneuploïdie

Les taux de fécondation en frais (38 %) et en congelé (8.3 %) sont différents sans atteindre le seuil de significativité en raison du faible nombre de tentatives en sperme congelé.

c) Taux de fécondation

celles obtenues en congelé. Les moyennes obtenues en frais ne sont pas significativement différentes de

Trente huit cycles ont été réalisés en frais et 15 en congelé. Lors d'une tentative en frais, la biopsie avait retrouvé des spermatozoïdes, mais la ponction d'ovocytes était blanche : les spermatozoïdes ont été congelés pour de futures tentatives en congelé. En frais, le taux de récupération des spermatozoïdes est de 89,5 % (34 sur 38 tentatives). Un patient présentait un antécédent de cryptorchidie, deux patients avaient subi

a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes

4) TESE-ICSI pour Azospermies Obstrucives

Quatre grossesses ont été obtenues en frais, donnant un taux de grossesse clinique par recueil positif de spermatozoïde de 20 % et 5 enfants sont nés (1 grossesse gémellaire). Le taux d'accouchement d'enfant vivant par TESE (recueil positif ou non) en frais est de 7,7 %. Tous les enfants nés sont en bonne santé et ne présentent aucune malformation. En congelé, aucune grossesse n'a été obtenue.

g) Taux de grossesse et enfants

Entre les groupes frais et congelé, les nombres d'embryons obtenus par recueil positif de spermatozoïdes sont respectivement de 1,85 et 0,5 embryon, l'étude de la significativité étant impossible. Par contre, les nombres d'embryons transférés par recueil positif de spermatozoïdes respectivement de 1,55 et 0,5 embryon sont significativement différents ($p = 0,04$).

f) Nombres d'embryons

Dans les cas d'azospermie non obstructive en congelé, les échecs de fécondation sont dus dans 3 cas à un nombre d'ovocyte insuffisant, et dans 2 cas à l'injection de spermatozoïdes pour la plupart immobiles (6 sur 7 dans un cas, et 6 sur 8 dans l'autre cas). avec 6 spermatozoïdes immobiles sur 7 spermatozoïdes injectés, mais aucun embryon n'a été obtenu, comme dans une précédente tentative en frais. De même, malgré la présence de 8 ovocytes injectés avec 6 spermatozoïdes immobiles sur 8 lors d'une tentative chez une femme de 21 ans, aucun embryon n'a été obtenu.

une tentative d'anastomose epididymodéferentielle, et un dernier patient avait montré une spermatogénèse conservée en 1992 après biopsie testiculaire.

En congelé, le taux de récupération des spermatozoïdes après décongélation est de 100 %.

b) Analyse des femmes

Les 27 conjoints (dont 6 à deux reprises) des sujets azoospermiques obstructifs présentent un âge moyen est de 30,9 ans, avec comme extrêmes de 23 à 40 ans. Six patientes présentaient un âge supérieur ou égal à 35 ans en frais (18 %).

En congelé, 15 tentatives ont été réalisées (12 femmes, dont 3 à deux reprises). L'âge moyen est de 33,2 ans, avec comme extrêmes 27 à 41 ans. Cinq patientes présentaient un âge supérieur ou égal à 35 ans en congelé (33 %).

Les âges moyens des femmes en frais et en congelé ne sont pas significativement différents. En ne tenant pas compte des femmes d'un âge supérieur ou égal à 35 ans, les âges moyens des femmes en frais et en congelé ne sont pas significativement différents.

En frais, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 6,5, le nombre d'ovocytes matures par ponction est de 5 comme le nombre moyen d'ovocytes microinjectés.

En congelé, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 7, le nombre d'ovocytes matures par ponction est de 5,7 comme le nombre moyen d'ovocytes microinjectés.

Entre frais et congelé, ces nombres moyens d'ovocytes ne sont pas significativement différents.

c) Taux de fécondation

Les taux de fécondation en frais (49,7 %) et en congelé (44,7 %) ne sont pas significativement différents.

d) Aneuploïdie

En frais, 4 ovocytes à 1 PN et 7 ovocytes à 3 PN ont été obtenus après injection de 165 ovocytes, soit un taux d'aneuploïdie de 6,7 %

Six grossesses ont été obtenues en frais donnant un pourcentage de grossesse clinique de 17.6 % par recueil positif de spermatozoïde, dont 2 gémeaux : 8 enfants sont nés. Le

g) Taux de grossesse et enfants

En comparant le groupe frais au groupe congelé, les nombres d'embryons obtenus par ponction positive de spermatozoïdes (2.82 et 2.8 respectivement) ainsi que les nombres d'embryons transférés par ponction positive de spermatozoïdes (1.85 et 1.87 respectivement) ne sont pas significativement différents dans les cas d'azoospermie obstructive.

f) Nombres d'embryons

Sur les 15 cycles réalisés en congelé, 3 n'ont pas donné d'embryons. Lors de 2 tentatives, le nombre d'ovocytes obtenu était faible : 1 et 4 ovocytes recueillis chez des femmes âgées respectivement de 34 et 27 ans. Lors d'une tentative, 11 ovocytes matures ont été injectés avec des spermatozoïdes immobiles sans obtenir d'embryons par la suite.

Sur les 33 cycles réalisés en frais (sur 38 au total) chez les sujets azoospermiques obstructifs pour lesquels des spermatozoïdes avaient été retrouvés à la ponction et pour lesquels des ovocytes ont été retrouvés lors de la ponction chez la conjointe (1 patiente a présenté une ponction blanche), 4 cycles n'ont pas donné d'embryons. Le nombre d'ovocytes matures obtenu a été de 1, 2, 2 et 4 chez des femmes âgées respectivement de 37, 29, 31 et 29 ans. Les échecs de segmentation sont probablement dus dans les 4 cas à un nombre d'ovocytes insuffisant.

Les taux de segmentation (56 % en frais avec 93 embryons obtenus pour 165 ovocytes injectés et 51 % en congelé avec 42 embryons obtenus pour 83 ovocytes injectés) ne sont pas significativement différents.

e) Taux de segmentation et échecs de segmentation

Ces taux ne sont pas significativement différents.

En congelé, 2 ovocytes à 1 PN et 2 ovocytes à 3PN ont été obtenus après injection de 85 ovocytes, soit un taux d'aneuploïdie de 4.8 %.

Entre obstructifs et non obstructifs, les taux de fécondation en frais ne sont pas significativement différents. Par ailleurs, ce taux est catastrophique (8.3 % contre 44.7 %) chez les non obstructifs après décongélation. Cela pose le problème de l'injection de spermatozoïdes immobles et probablement non viables après décongélation (dans le groupe des azoospermiques non obstructifs, 57 % des spermatozoïdes injectés après décongélation étaient immobles contre 6 % seulement dans le groupe des obstructifs).

c) Taux de fécondation

Entre obstructifs et non obstructifs en frais, ces nombres moyens ne sont pas significativement différents.

b) Nombres moyens d'ovocytes recueillis, matures et injectés par ponction

Ce taux est de 38.5 % pour les non obstructifs ou sécrétoires contre 89.2 % pour les obstructifs ou excrétoires). La différence, qui s'avère significative, s'explique par le diagnostic ($p = 0.000001$). Dans le premier cas, il existe peu de spermatozoïdes intratesticulaires, dans le deuxième il s'agit d'un obstacle sur les voies séminales.

a) Taux de récupération des spermatozoïdes

3) Comparaison des résultats entre patients azoospermiques obstructifs et non obstructifs

Entre frais et congelé, ces pourcentages ne sont pas significativement différents. tentative de TESE-ICSI chez un sujet azoospermique obstructif en congelé est de 20 %. terme, donnant naissance à 3 enfants. Le pourcentage d'accouchement d'enfant vivant par pourcentage de grossesse clinique de 26.6 %. Trois grossesses se sont poursuivies jusqu'à leur En congelé, 4 grossesses cliniques ont été obtenues, ce qui permet d'obtenir un obstructif en frais est de 15.8 % pourcentage d'accouchement par TESE (recueil positif ou non) chez un sujet azoospermique

d) Nombres d'embryons

En comparant le groupe obstructif au groupe non obstructif en frais, il est possible de constater que les nombres moyens d'embryons par recueil positif de spermatozoïde (respectivement 1.85 et 2.82 embryons) ainsi que les nombres moyens d'embryons transférés (respectivement 1.55 et 1.85) ne sont pas significativement différents.

e) Taux d'accouchement d'enfant vivant

Le taux d'accouchement d'enfant vivant par biopsie testiculaire positive en frais est de 20 % pour les non obstructifs et de 17.6 % chez les obstructifs en frais. Le taux de grossesse évolutive par biopsie testiculaire est de 7.7 % environ pour les non obstructifs et de 15.8 % pour les obstructifs en frais. Cette différence s'explique par des taux de récupération en spermatozoïdes différents, mais n'est pas significative au niveau statistique.

En tenant compte de ces résultats, cela reviendrait à expliquer à un patient azoospermique non obstructif qu'à la suite d'une biopsie testiculaire, il aurait environ une chance sur 13 d'obtenir un enfant. De même, un patient azoospermique obstructif aurait environ une chance sur 6 d'obtenir un enfant après biopsie testiculaire.

	Défer + Epid (frais) e	Défer + Epid (congelé) f	<i>Tests statistiques</i>
Nombre de cycles réalisés	51	25	
Recueil positif de spermatozoïdes	51	25	
Récupération des spz (%)	100	100	(a-e) p<0.000001
Nombre grossesses bioch	0	0	
Nombre grossesses cliniques	19	4	
Grossesses cliniques /P+(%)	37.2%	16%	NS
F.C.S.	7	2	
% FCS / g cliniques	31.6 %	50 %	
Nombre grossesses évolutives	13	2	
Accouchement / P+(%)	25.49 %	8 %	NS
Accouchement / P (%)	25.49 %	8 %	NS
Enfants	14	2	

Tableau 3 : Taux de Grossesse des Ponctions Epididymo-Déférentielles

Tableau 4 : Résultats des Ponctions Epidymo-Déferentielles

	Défer + Epid (frais) e	Défer + Epid (congelé) f	Tests statistiques
Recueil + Spermatozoïdes	51	25	
Age moyen femmes	31.5 ± 4.55	33.8 ± 4.32	(a-e) p=0.006
Age moyen hommes			(e-f) p=0.04
Nombre d'ovocytes recueillis	473	150	
Nbre ov recueillis / P +	9.27 ± 6.18	6 ± 3.90	NS
Nbre ov / P+	9.08 ± 6.32	7.23 ± 3.81	NS
chez ♀ > 35 ans			
Nombre d'ovocytes matures	394	121	
Nbre ov matures / P +	7.72 ± 5.27	4.84 ± 2.95	NS
chez ♀ > 35 ans			
Nombre ovocytes injectés	394	121	
Nbre ov injectés / P +	7.72 ± 5.27	4.84 ± 2.95	NS
chez ♀ > 35 ans			
Nombre zygotés (2 PN)	185	58	
Taux fécondation (%)	46.25	47.9	NS
Nombre à 1 PN	7	4	
Nombre à 0 PN	10	2	
Nombre à 3 PN	20	5	
Embryons	218	66	
Nombre d'embryons / P +	4.27 ± 3.45	2.64 ± 1.82	NS
Taux de segmentation (%)	55.3	54.5	NS
Nombre de transferts	45	22	
Embryons transférés	118	49	
Nombre d'embryons transférés / P +	2.31 ± 1.16	1.96 ± 1.06	(a-e) p=0.02

Les taux de fécondation obtenus après ponction épидидymaire ou déférentielle ne sont pas significativement différents après utilisation de spermatozoïdes frais ou congelés (respectivement 46.25 % et 47.9 %).

c) Taux de fécondation

différents.
 nombres moyens d'ovocytes entre frais et congelé n'apparaissent pas significativement présentient 35 ans ou plus. En ne tenant compte que des femmes âgées de moins de 35 ans, les groupe frais, 16 femmes présentent 35 ans ou plus. Dans le groupe congelé, 12 femmes différents (il existe en effet une grande dispersion des valeurs dans les échantillons). Dans le Entre frais et congelé, ces nombres moyens d'ovocytes ne sont pas significativement matures par ponction est de 4.84 tout comme le nombre moyen d'ovocytes microinjectés .
 En congelé, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 6, le nombre d'ovocytes ponction.

matures par ponction est de 7.72 tout comme le nombre moyen d'ovocytes microinjectés par En frais, le nombre moyen d'ovocytes par ponction est de 9.27, le nombre d'ovocytes (ans) : $p = 0.04$.
 à une tentative ICSI avec un sperme congelé d'origine épидидymaire ou déférentielle (33.8 déférentielle en frais (31.5 ans) est significativement différent de l'âge des femmes participant L'âge moyen des femmes dont le conjoint subit une ponction épидидymaire ou

b) Analyse des femmes

moyenne de 4.9 %.
 moyenne de 13 %. En congelé, la numération moyenne est de 4.94 M/ml avec une mobilité en frais et en congelé. La numération moyenne est de 6.85 M/ml en frais avec une mobilité reprises et 1 couple à trois reprises). Le taux de récupération des spermatozoïdes est de 100 % reprises et 2 couples à trois reprises) et 25 en congelé (18 couples dont 5 couples à deux Cinquante et un cycles ont été réalisés en frais (41 couples dont 6 couples à deux

a) Nombre de cycles et taux de récupération des spermatozoïdes

Dix-neuf grossesses cliniques ont été obtenues en frais, et 4 en congelé, correspondant à des taux de grossesses cliniques de 37.2 et 16 % respectivement ($p = 0.06$). Un nombre important de fausses couches spontanées a été constaté en frais (6 cas correspondant à 31.6 % des grossesses cliniques) et en congelé (2 cas correspondant à 50 % des grossesses cliniques). Le pourcentage d'accouchement d'enfant vivant né par ponction est de 25.5 % en frais et de 8 % par tentative en congelé. Entre les groupes frais et congelés, ces taux de grossesses cliniques et évolutive ne sont pas significativement différents, en raison des faibles effectifs des échantillons.

g) Taux de grossesse et enfants

Le nombre d'embryon obtenu par ponction de spermatozoïdes n'est pas significativement différent entre frais et congelé (respectivement 4.23 et 2.64 embryon par ponction). De même, le nombre d'embryon transféré par ponction positive de spermatozoïdes n'est pas significativement différent entre frais et congelé (respectivement 2.31 et 1.96 embryon transféré par ponction).

f) Nombre d'embryons

Les taux de segmentation ne sont pas significativement différents (respectivement 55.3 et 54.5 % en frais et en congelé).

e) Taux de segmentation

Après ponction épидидymaire en frais, 7 ovocytes à 1 PN et 20 ovocytes à 3 PN ont été obtenus pour 394 ovocytes injectés (soit un pourcentage d'aneuploïdie de 6.8 %) En congelé, 4 ovocytes à 1 PN et 5 ovocytes à 3 PN ont été obtenus pour 121 ovocytes injectés (soit un pourcentage d'aneuploïdie de 7.4 %).

d) Aneuploïdie

5) Comparaison des résultats entre patients non obstructifs d'une part et ponctions déférentielles et épididymaires d'autre part

Le groupe TFSF pour azoospermie non obstructive en frais d'une part et le groupe rassemblant les ponctions épididymaires et déférentielles en frais d'autre part ont été comparés en utilisant les tests statistiques.

a) Nombre d'ovocytes

Les nombres moyens d'ovocytes recueillis, d'ovocytes matures et d'ovocytes injectés ne sont pas significativement différents entre les deux groupes.

b) Taux de fécondation

Les taux de fécondation (38 % en frais chez les non obstructifs et 47 % environ pour les ponctions déférentielles et épididymaires en frais) ne sont pas significativement différents.

c) Nombres d'embryons

Le nombre moyen d'embryons par recueil positif de spermatozoïde chez les sujets non obstructifs (1.85) est différent de celui obtenu pour le groupe des ponctions épididymaires ou déférentielles (4.27) ($p = 0.06$). Les nombres moyens d'embryons transférés par recueil positif de spermatozoïde apparaissent significativement différents (1.55 et 2.31 respectivement) ($p = 0.02$).

d) Taux de grossesse par ponction

Le taux de grossesse évolutive par ponction de spermatozoïdes positive des ponctions déférentielles et épididymaires en frais (25.5 %) n'est pas significativement différent du taux de grossesse évolutive par biopsie positive obtenu pour les sujets azoospermiques non obstructifs (20 %). De même, le taux d'accouchement d'enfant vivant par TFSF chez les sujets non obstructifs en frais (7.8 %) et le taux d'accouchement d'enfant vivant obtenu pour les tentatives de ponction épididymaires ou déférentielles en frais (25.5 %) sont différents, mais l'étude de la significativité est impossible, du fait des faibles effectifs.

	Nombre	2	3
	Spermatozoïde +	5	26
	Spermatozoïde -	42	3
Volume testiculaire normal			
Volume testiculaire diminué			

obstructifs
Volume testiculaire et présence de spermatozoïdes chez les sujets azoospermiques non

cliniques spécifiques.
 Un volume testiculaire diminué est apprécié par l'urologue en fonction de critères

1) Volume testiculaire

A) ETUDE D'UN SEUL FACTEUR PREDICTIF

Ce chapitre traite de l'utilisation du volume testiculaire, du taux de FSH et de l'histologie comme facteurs prédictifs de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires chez des sujets azoospermiques non obstructifs.

III) ETUDE DES FACTEURS PREDICTIFS DE LA PRESENCE DE SPERMATOZOÏDES INTRATESTICULAIRES

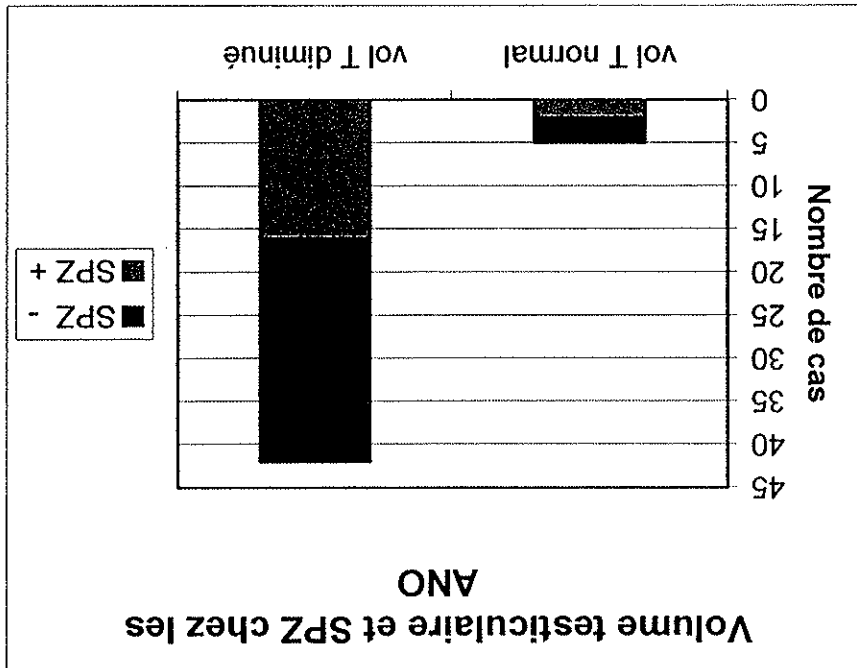
	Spz +	Spz -	
Taux de FSH normale	7	4	3
Taux de FSH augmenté	15	45	30

Un taux de FSH augmenté est défini en fonction des normes fournies par le laboratoire ayant réalisé les analyses.

2) Taux de FSH

Lorsque le volume testiculaire est normal, l'extraction de spermatozoïdes est positive dans 40 % des cas (2/5). Lorsque le volume testiculaire est diminué, l'extraction de spermatozoïdes est négative chez 61.9 % des patients (26/42). Un volume testiculaire diminué associé à la présence de spermatozoïdes lors de la TESE est retrouvé dans 38.1 % des cas.

Figure 8 : Extraction des spermatozoïdes en fonction du volume testiculaire chez les sujets azoospermiques non obstructifs



Nous avons comparé les examens histologiques des biopsies testiculaires et l'examen extemporané en terme d'obtention de spermatozoïdes chez les sujets azoospermiques.

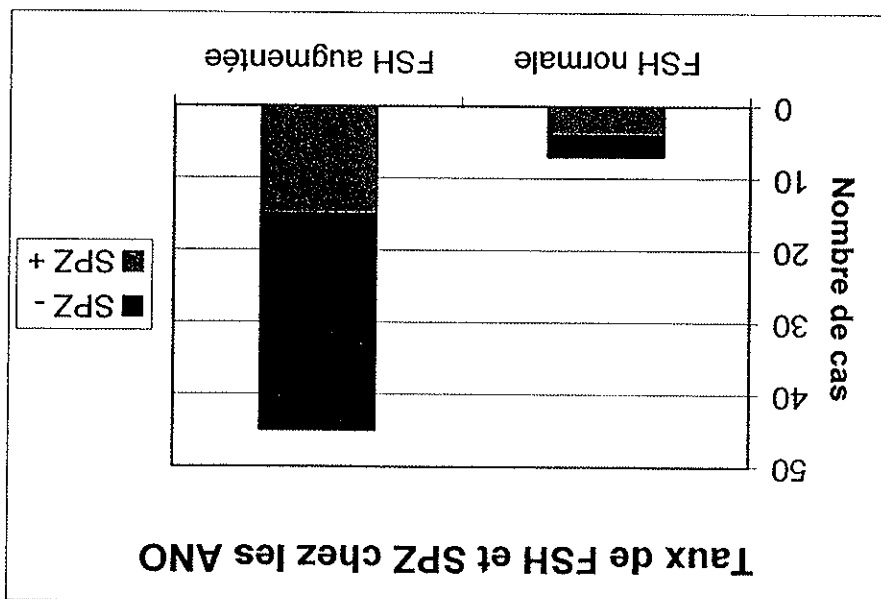
obstructifs

a) *Examen histologique et extraction de spermatozoïdes chez les patients non*

3) Histologie et extraction de spermatozoïdes

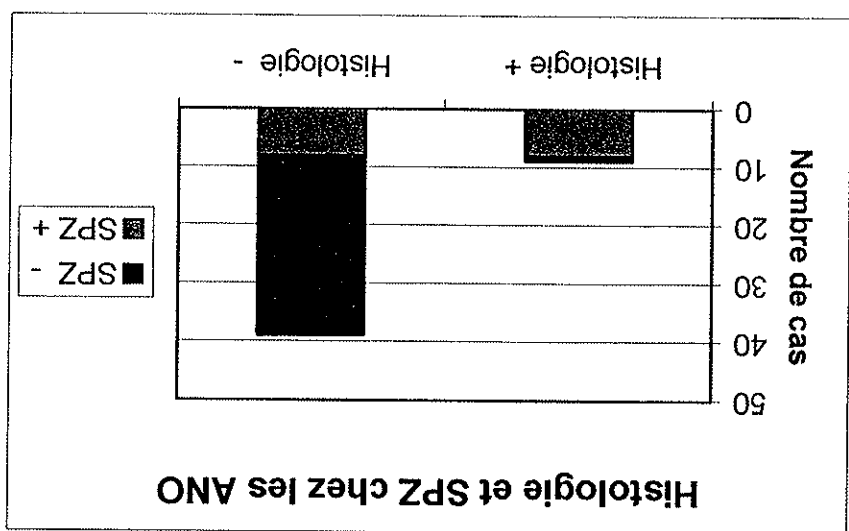
Lorsque le taux de FSH est normal, les spermatozoïdes sont retrouvés dans 57 % des cas (4/7). Lorsque le taux de FSH est augmenté, les spermatozoïdes ne sont pas retrouvés dans 67 % des cas (30/45). Dans notre étude, un taux de FSH augmenté associé à la présence de spermatozoïdes après TESE est retrouvé dans un cas sur trois .

Figure 9 : Extraction des spermatozoïdes en fonction du taux de FSH chez les sujets azoospermiques non obstructifs



Chez les sujets azoospermiques non obstructifs, lorsque l'histologie est positive, l'extraction de spermatozoïdes est positive dans 89 % (8/9). Lorsque l'histologie est négative, l'extraction de spermatozoïdes est négative dans 79,5 % (31/39). Selon notre étude, il existe donc des spermatozoïdes dans un cas sur cinq (20,5 %) lorsque l'histologie est négative chez les sujets azoospermiques non obstructifs.

Figure 10 : Extraction des spermatozoïdes en fonction de l'histologie chez les sujets azoospermiques non obstructifs

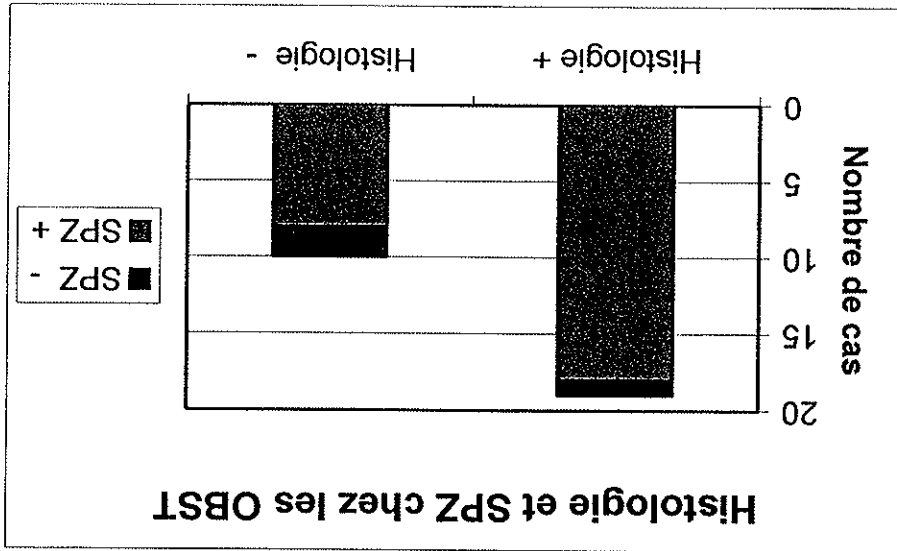


	SPZ +	SPZ -	N
Histologie +	8	9	17
Histologie -	8	31	39

Tableau 6 : Corrélation entre l'histologie et la récupération des spermatozoïdes pour les patients azoospermiques non obstructifs

De même chez les sujets azoospermiques obstructifs, lorsque l'histologie est positive, l'extraction de spermatozoïdes est positive dans 94,7 % des cas (18/19). Lorsque l'histologie est négative, l'extraction de spermatozoïdes est négative dans 20 % des cas (2/10). Selon notre étude, il existerait des spermatozoïdes dans 4 cas sur 5 après TESE lorsque l'histologie est négative chez les sujets azoospermiques obstructifs (résultats à interpréter avec précaution compte tenu du faible nombre de cas étudiés).

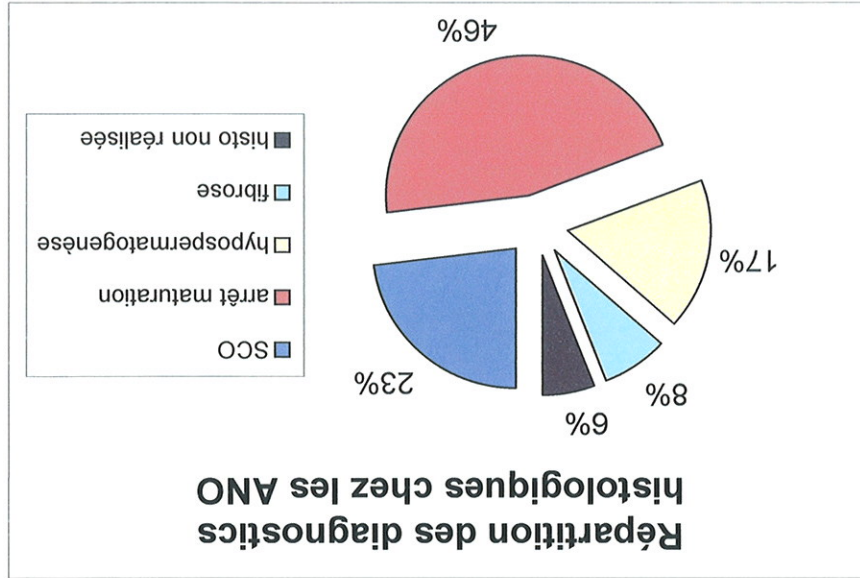
Figure 11 : Extraction des spermatozoïdes en fonction de l'histologie chez les sujets azoospermiques obstructifs



Nombre	SPZ +	SPZ -
Histo +	18	1
Histo -	8	2

b) Examen histologique et extraction de spermatozoïdes chez les patients obstructifs

Figure 12 : Répartition des diagnostics histologiques chez tous les sujets azoospermiques non obstructifs



Diagnosis	SPZ +	SPZ -
Non documentés	4	
fibrose	3	2
-genèse		
HypospERMato-	9	1
Arrêt maturation	24	20
SCO	12	9
Nombre de cas	SPZ +	SPZ -

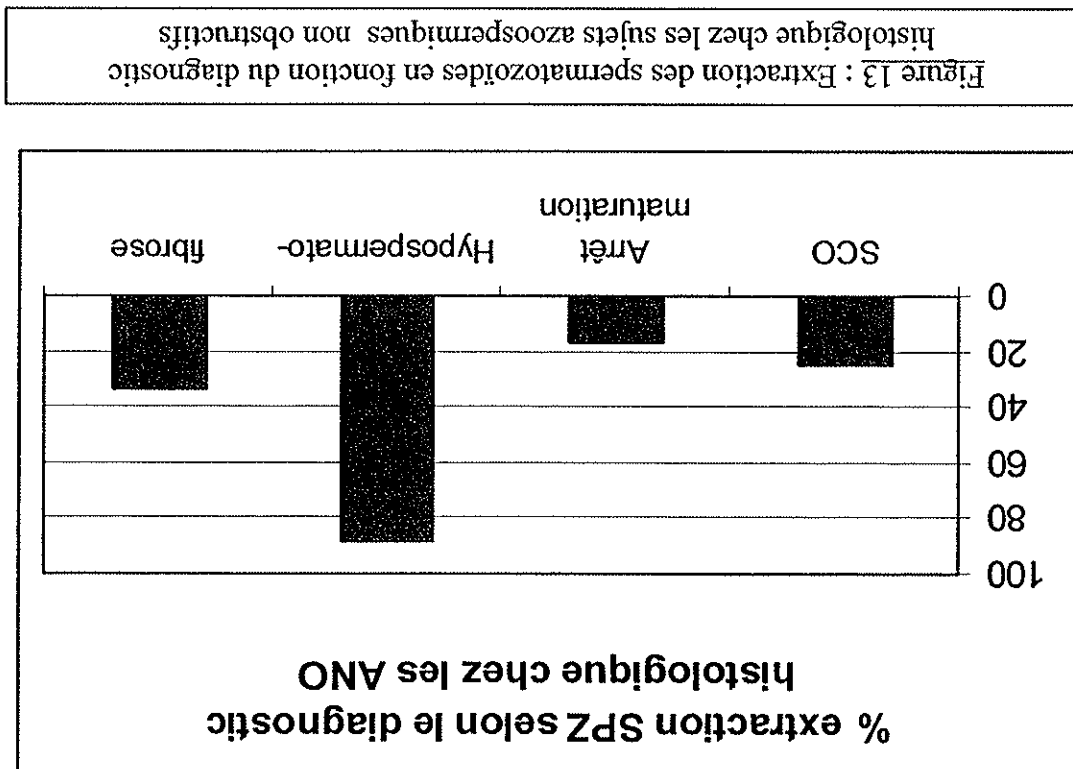
Il est possible de comparer le diagnostic histologique (Levin, 1979)⁸⁷ à la présence effective de spermatozoïdes après préparation de la biopsie testiculaire. Dans notre étude, le stade histologique le plus avancé de la lame est utilisé pour caractériser chaque patient (Li Ming Su et al., 1999)¹³³.

c) *Diagnostic histologique et présence de spermatozoïde*

Nous avons tenté de relier l'histologie testiculaire avec l'histoire du patient. Pour chaque type d'antécédent, nous avons comptabilisé d'une part le nombre et le type de diagnostic histologique, et d'autre part la présence ou l'absence de spermatozoïdes dans l'examen extemporané du tissu testiculaire.

d) Histologie et anamnèse

Il est possible de constater que les spermatozoïdes sont présents dans la majorité des cas où le diagnostic histologique s'est révélé être l'hypospERMATogénèse (89%). En revanche, dans les cas de SCO et d'arrêt de maturation, les spermatozoïdes sont présents respectivement chez seulement 25 % et 17 % des patients. Dans les cas de fibrose, des spermatozoïdes sont retrouvés chez un patient sur trois.



Chez les patients ayant présenté une cryptorchidie, il existe plus de cas de SCO et d'arrêts de maturation : les spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés chez 10 patients sur 14 (71 % des cas). De même pour les 5 patients ayant subi une chimiothérapie, il n'a été observé que des arrêts de maturation et un SCO : les spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés dans 4 cas sur 5 (80 % des cas). Ces deux types d'antécédents apparaissent donc influer fortement sur la spermatogénèse, mais nos échantillons étant de petite taille, il serait intéressant d'étudier cet événement au sein d'une population plus importante.

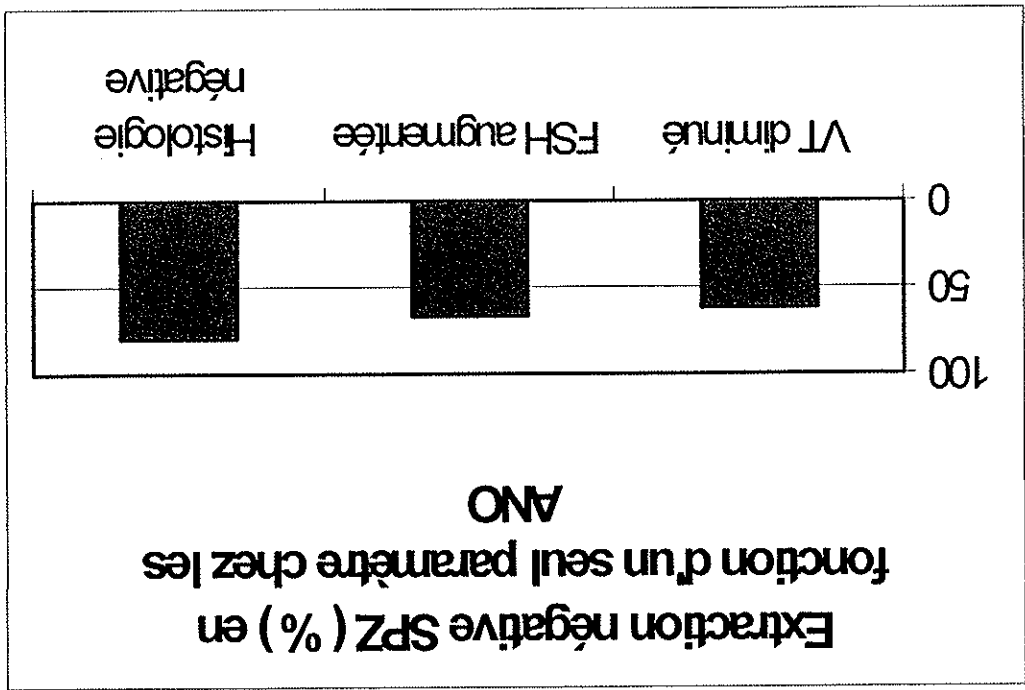
biopsie

Tableau 5 : Antécédents, diagnostics histologiques et présence de spermatozoïdes lors de la

antécédents	Nombre de cas	Δ histologique	SPZ +	SPZ -
Cryptorchidie	14	4 SCO, 5 arrêts, 4 (2 inconnus), 1 hypo, 2 fibroses, (2 inconnus)		10
Infection	1	1 SCO	0	1
Orchite	1	1 arrêt	0	1
Chimio radio	5	1 SCO, 4 arrêts	1	4
Maladie génétique	8	2 SCO, 3 arrêts, 2 hypo, (1 inconnu)	2	6
Idiopathique	23	4 SCO, 11 arrêts, 6 hypo, 1 fibrose, (1 inconnu)	9 (2 SCO, 5 inconnu)	14 (2 SCO, 11 hypo), 1 arrêts, 1 hypo)

L'étude d'un seul paramètre pour prédire l'extraction négative des spermatozoïdes intratesticulaires, tel un volume testiculaire diminué apparaît donc moins efficace qu'un taux de FSH augmenté ou surtout qu'une histologie testiculaire négative (respectivement 61,9, 67 et 79,5 % d'extraction négative des spermatozoïdes). Selon ces résultats, l'utilisation de l'histologie comme facteur prédictif écarterait la biopsie testiculaire chez 21 % des patients azoospermiques non obstructifs présentant réellement des spermatozoïdes intratesticulaires.

Figure 14 : Extraction négative des spermatozoïdes en fonction d'un seul paramètre chez les sujets azoospermiques non obstructifs



4) Conclusion sur l'étude d'un facteur prédictif

L'association d'un volume testiculaire et d'un taux de FSH normaux dans 3 cas a permis l'extraction de spermatozoïdes dans 1 cas.

L'association d'un volume testiculaire diminué et d'une FSH augmentée (considérés comme facteurs prédictifs de l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires) prédit efficacement l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires dans 65,8 % des cas. Lorsqu'il n'est pas procédé à une biopsie diagnostique pour l'extraction des spermatozoïdes et donc à l'histologie, le fait de faire confiance à ces deux facteurs prédictifs pour sélectionner les patients susceptibles de présenter des spermatozoïdes à la biopsie ne permettrait de déceler que les deux tiers des cas d'azoospermie non obstructive où des spermatozoïdes pourraient être présents lors de la biopsie testiculaire. Dans un tiers des cas en effet (34,2 %), la biopsie s'est révélée positive alors que le volume testiculaire et le taux de FSH étaient plutôt en faveur de l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires.

Tableau 6 : Volume testiculaire, taux de FSH et présence de spermatozoïdes à la biopsie

	N	Spz +	Spz -
Vol T normal	3	1	2
FSH normale			
Vol T normal	2	1	1
FSH augmentée			
Vol T diminué	4	3	1
FSH normale			
Vol T diminué	38	13	25
FSH augmentée			

1) Volume testiculaire et Taux de FSH (quand les 2 étaient disponibles)

II) ETUDE DE PLUSIEURS FACTEURS PREDICTIFS

Chez 1 patient, l'association d'un volume testiculaire normal et d'une histologie normale a permis de retrouver des spermatozoïdes. La présence d'un volume testiculaire diminué associé à une histologie négative ne retrouve pas de spermatozoïdes dans 78.1 % des cas. Par ailleurs, en cas de discordance entre les 2 paramètres, par exemple lorsque l'histologie est positive et le volume testiculaire diminué ou lorsque l'histologie est négative et le volume testiculaire normal, l'histologie semble constituer un meilleur facteur prédictif de la présence ou de l'absence de spermatozoïdes : lorsque l'histologie est positive, la biopsie a retrouvé des spermatozoïdes dans 86 % des cas (6/7) et lorsque l'histologie est négative, la biopsie n'a pas retrouvé de spermatozoïdes dans 100 % des cas (3/3).

Tableau 7: Volume testiculaire, histologie et présence de spermatozoïdes à la biopsie

	N	Spz +	Spz -
Vol T normal	1	1	0
Histologie +			
Vol T normal	3	0	3
Histologie -			
Vol T diminué	7	6	1
Histologie +			
Vol T diminué	32	7	25
Histologie -			

2) Volume testiculaire et Histologie (quand les 2 étaient disponibles)

Un taux de FSH normal associée à une histologie normale retrouve des spermatozoïdes à la biopsie dans les 2 cas étudiés. Un taux de FSH augmentée associée à une histologie négative ne retrouve pas de spermatozoïdes dans 80 % des cas, ce qui est plus élevé que la FSH seule (67 %, ou l'histologie seule (79,5 %)).

Par ailleurs, lorsque il y a discordance entre les deux paramètres, comme en cas de FSH augmentée et d'histologie positive, ou lorsque la FSH est normale et l'histologie négative, l'histologie semble être un meilleur facteur prédictif de la présence ou de l'absence de spermatozoïdes : lorsque l'histologie est positive et le taux de FSH normal, la biopsie testiculaire a retrouvé des spermatozoïdes dans 100 % des cas (2/2). Lorsque l'histologie est négative et le taux de FSH normal, la biopsie testiculaire n'a pas retrouvé de spermatozoïdes dans 75 % des cas (3/4).

Tableau 8: Taux de FSH, histologie et présence de spermatozoïdes à la biopsie

	Nombre	Spermatozoïde +	Spermatozoïde -
FSH normale	2	2	0
FSH normale Histologie +	4	1	3
FSH normale Histologie -	7	6	1
FSH augmentée	35	7	28
FSH augmentée Histologie +			
FSH augmentée Histologie -			

3) Taux de FSH et Histologie (quand les 2 étaient disponibles)

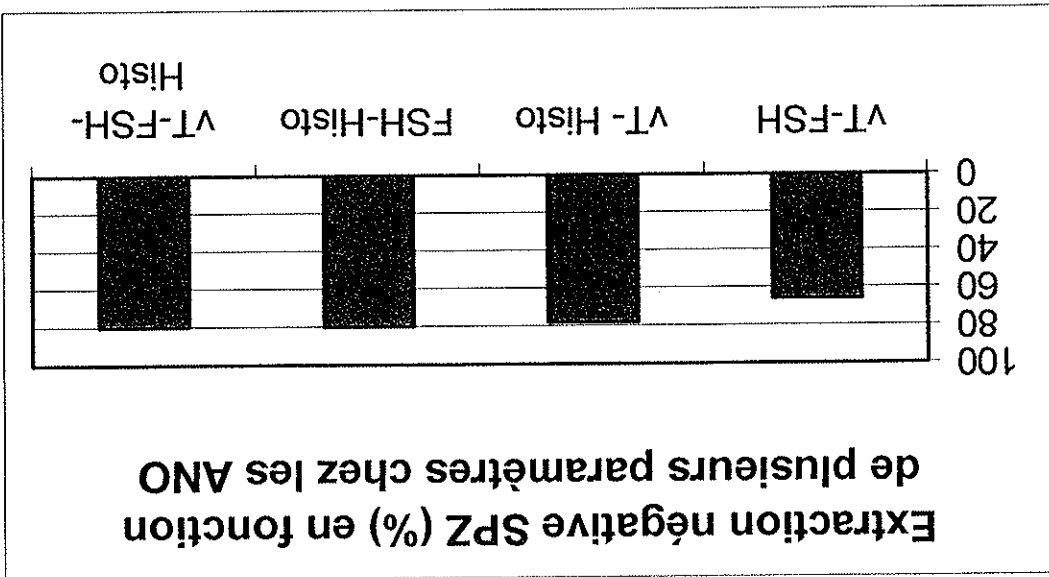
4) Association Volume testiculaire, taux de FSH et Histologie

	nombre	Spermatozoïde +	Spermatozoïde -
Vol T normale	1	1	
FSH normale			
Histologie +			
Vol T normale	2		2
FSH normale			
Histologie -			
Vol T normale	0		
FSH augmentée			
Histologie +			
Vol T normal	1		1
FSH augmentée			
Histologie -			
Vol T diminué	1	1	
FSH normale			
Histologie +			
Vol T diminué	6	5	1
FSH augmentée			
Histologie +			
Vol T diminué	30	6	24
FSH augmentée			
Histologie -			

Tableau 9: Volume testiculaire, taux de FSH, histologie et présence de spermatozoïdes à la biopsie

Chez 1 patient, l'association d'un volume testiculaire normal, d'un taux de FSH normal et d'une histologie normale a permis de retrouver des spermatozoïdes. L'association d'un volume testiculaire diminué, d'un taux de FSH augmenté et d'une histologie négative ne retrouve pas de spermatozoïdes dans 80 % des cas (24/30).

Figure 15 : Extraction négative des spermatozoïdes en fonction de plusieurs paramètres chez les sujets azoospermiques non obstructifs



4) Conclusion sur l'association de plusieurs facteurs prédictifs

Le premier tableau classe par années croissantes les différentes études donnant le nombre de ponctions / biopsies testiculaires positives sur le nombre de ponctions / biopsies testiculaire total chez les patients azoospermiques non obstructifs

1) Prélèvement

Une revue de la littérature a été réalisée, concernant les patients azoospermiques non obstructifs.

D) RESULTATS DE LA LITTÉRATURE POUR LES AZOOSPERMIQUES NON OBSTRUCTIVES

Notre travail a porté sur l'étude rétrospective des biopsies testiculaires réalisées dans le cadre d'AMP et en particulier sur les cas d'azoospermie non obstructive. En premier lieu, nous évaluerons les résultats après biopsie testiculaire / ICSI des sujets azoospermiques non obstructifs par rapport à ceux de la littérature, puis en second lieu nous ferons le point sur l'existence ou non de critères prédictifs fiables de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

Tableau 10 : pourcentage de ponctions positives chez les patients azoospermiques non obstructifs

ANNEES	AUTEURS	Nbre Patients	P	P+	%	Cong, Frais
1996	Devroey et al ³⁵	19	19	17	89,5	F
	Kahraman et al ⁷⁶	29	29	14	48,3	F
1997	Friedler et al ⁵¹	41	48	25	52,1	F,C
	Silber et al ¹²⁸	45	45	27	60	F
	Tournaye et al ¹⁴⁴	222	222	117	52,7	F
	Schlegel et al ¹²⁰	16	16	10	62,5	F
	Mansour et al ⁹²	103	103	60	58,2	F
1998	Ghazzawi et al ⁵⁸	30	43	30	69,8	F
	Ezeh et al ³⁷	35	35	22	62,9	F
1999	Schlegel et al ¹²¹	49	49	27	55,1	F
	Amer et al ⁴	55	316	130	41,1	F
	Ben-Yosef et al ⁵⁵	55	55	33	60	F,C
	Westlander et al ¹⁵⁶	70	70	27	38,6	F
	Su et al ¹³³	75	81	47	58,0	F
	Ezeh et al ³⁶	40	40	28	70	F
	Prins et al ¹⁰⁹	42	42	15	35,7	C
2000	Amer et al ⁵	116	116	62	53,4	F
	Mercan et al ⁹⁶	452	452	291	64,4	F
	Küpkör et al ⁸⁴	175	175	135	77,1	C
	De Croo et al ³¹	54	54	30	55,5	F
TOTAL	20 études		2010	1147	57	

Le deuxième tableau étudie les résultats des différentes études concernant les grossesses obtenues chez des patients azoospermiques non obstructifs, après utilisation des spermatozoïdes extraits directement de la biopsie testiculaire, en frais.

a) Frais

2) Résultats et azoospermies non obstructives

Au total, le pourcentage d'extraction des spermatozoïdes obtenu en cumulant les résultats des différentes études est de 57 % (1147/2010)

obtiennent un pourcentage d'extraction de 77 %, ce qui est impressionnant.

- Kùpker et al (2000)⁸⁴ avec 135 biopsies positives pour 175 biopsies donnant un pourcentage d'extraction de 64 %, ce qui est élevé
- Mercan et al (2000)⁹⁶ avec 291 biopsies positives pour 452 biopsies, un pourcentage d'extraction de 41 %.
- Arner et al (1999)⁴ avec 130 biopsies positives pour 316 biopsies, donnant

ponction dans les études présentant un nombre de patients important :

Il est intéressant de noter les pourcentages d'extraction positive de spermatozoïdes par

à relativiser, d'autant que le nombre de patients n'est pas très important.

Le pourcentage de ponction positive de l'étude de Devroey et al en 1996³⁵ est nettement supérieur aux autres (89,5 %). C'est aussi la première étude ! Les résultats sont donc

Tableau II : Résultats des biopsies chez les sujets azoospermiques non obstructifs, en frais

auteur	P	P+	%	N G	clin	clin/P+	FCS	FCS/G	év	N G	%	év/P+	%	G
1996 Devroey et al ³⁵	19	17	89,5	5	29,4	0	0,0	5	29,4	5	26,3			
Kahraman et al ⁷⁶	29	14	48,3	6	42,9	1	16,7	5	35,7	5	17,2			
1997 Friedler et al ⁵¹	48	25	52,1	6	24,0	1	16,7	5	20,0	5	10,4			
Schlegel et al ¹²⁰	16	10	62,5	5	50,0	1	20,0	4	40,0	4	25,0			
1998 Ghazzawi et al ⁵⁸	43	30	69,8	6	20,0	3	50,0	3	10,0	3	7,0			
Su et al ¹³³	81	47	58,0	26	55,3	6	23,1	20	42,6	20	24,7			
2000 Mercan et al ⁹⁶	45	29	64,4	95	32,6	22	23,2	73	25,1	73	16,2			
De Croo et al ³¹	54	30	55,5	11	36,7	2	18,2	9	30,0	9	16,7			
Total N=8 études complètes	74	46	62,5	160	34,5	33	20,6	105	22,6	105	14,2			

b) Congelé

Les spermatozoïdes extraits des biopsies testiculaires peuvent être congelés directement et utilisés après décongelation, lors d'un cycle de stimulation chez la femme. Les études suivantes donnent les résultats de la littérature pour les prélèvements congelés.

α) Fonction positives seulement disponibles

Dans la majorité des études concernant les spermatozoïdes congelés après biopsie testiculaire chez les sujets azoospermiques non obstructifs, les auteurs ne donnent pas le nombre total de biopsies testiculaires réalisés. Il tiennent seulement compte des prélèvements positifs. Il n'est donc pas possible dans ce cas d'évaluer le pourcentage de grossesses évolutives par biopsie testiculaire. Ce pourcentage aurait été intéressant car il permet de donner une idée du pourcentage de réussite de la tentative de biopsie testiculaire.

Tableau 12 : Résultats des biopsies testiculaires positives chez les sujets azoospermiques non obstructifs, en congelé

auteur	N	P+	Tx mob	injectés	fecond	clin	clin/P+	G	N FCS	%	FCS/G	N G év	% G év/P+
1997	Friedler et al ⁵¹	9	9	100	44	3	33,3	2	66,7	1	11,1		
	Oates et al ¹⁰⁴	10	10	95	48	2	20,0	0	0,0	2	20,0		
1999	Al Hasani ²	67	67	100	?	30	44,8	5	16,7	25	37,3		
	Ben Yosef et al ¹⁵	11	11	Mobiles	51	5	45,5	2	40,0	3	27,3		
	Ben Yosef et al ¹⁵	11	11	Id	61	4	36,4	0	0,0	4	36,4		
2000	Kupker et al ⁸⁴	135	135	100	45	40	29,6	11	27,5	29	21,5		
	TOTAL	243	243			84	34,6	20	23,8	64	26,3		
	6 études complètes												

Il existe des études où les spermatozoïdes extraits après biopsie testiculaire ont pu être utilisés d'abord directement en frais, puis après congélation et décongélation lors d'autres cycles de stimulation chez la femme. Le tableau suivant présente les résultats obtenus pour chaque étude après utilisation dans un premier temps des spermatozoïdes frais, et dans un deuxième temps des spermatozoïdes congelés. Le nombre des grossesses a été cumulé entre tentatives en frais et tentatives en congelé.

c) Frais et congelé

année	auteurs	N	P	P+	N G	% G	clin	clin/P+	FCS	N	%	FCS/év	N G	% G	év/P	% G	év/P	% G
2000	Küpker et al ⁸⁴	175	175	135	40	29,6				11	27,5		29	21,5	+	16,6		

Tableau 13 : Résultats des biopsies testiculaires totales chez les sujets azoospermiques non obstruifs, en congelé

Il existe une étude, celle de Küpker et al (2000)⁸⁴, où le nombre de tentatives total de biopsies testiculaires est notifié, comme celui des tentatives d'extraction positives (175 et 135 respectivement). Dans ce cas, le pourcentage d'obtention d'une grossesse évolutive par ponction est évalué à 16,6 %, ce qui correspond à environ une chance sur six d'obtenir un enfant en utilisant des spermatozoïdes testiculaires congelés chez des patients azoospermiques non obstruifs. Ce chiffre est à nuancer : en effet, le pourcentage d'extraction des spermatozoïdes était élevé dans cette étude par rapport aux autres (77 % par rapport à une moyenne à 57 %). Il est également possible de s'interroger si tous les patients étaient réellement azoospermiques non obstruifs.

β) Ponctions positives et nombre total de ponctions disponibles

Le taux de récupération des spermatozoïdes est de 38,5 % dans notre étude. Dans notre revue de la littérature, le taux moyen des différentes études est de 57 %. Ce taux est nettement supérieur au notre. Pour l'expliquer, il faut s'intéresser à différents problèmes posés par les publications traitant des biopsies réalisées sur les patients azoospermiques non obstructifs. Prins et al (1999)¹⁰⁹ ont obtenu le taux de récupération le plus faible (35,7 %). Le caractère non obstructif de l'azoospermie a été suspecté après examens cliniques et biologiques approfondis. L'extraction des spermatozoïdes a été réalisée par TSE après incision unique de 0,5 cm en exerçant une pression sur le testicule et en excisant le tissu exprimé. Arner et al (1999)⁴ obtiennent un taux de récupération sensiblement égal au notre (41 %) chez 316 patients avec 130 prélèvements positifs. Toutefois, dans leur étude, où les patients sont divisés en 2 groupes (216 subissent une biopsie unique bilatérale et 100 des biopsies bilatérales multiples avec au maximum 4 prélèvements par testicule), les taux de récupération sont respectivement de 37,5 et 49. Le taux de récupération est donc fortement tributaire du nombre de prélèvements réalisés par testicule. Ansi Tournaye et al (1996)¹⁴² rapportent jusqu'à 20 prélèvements par testicule : que devient la fonction leydigienne du testicule par la suite ?

a) *Patients azoospermiques non obstructifs*

I) Taux de récupération des spermatozoïdes

A) ETUDE

II) DISCUSSION DE NOS RESULTATS PAR RAPPORT A LA LITTÉRATURE

	N	P	P+	%	N	N	N	%	N	%	N	%	N	%
patients														
1997 Friedler et al ⁵¹	41	48	25	52,1	39	9	36,0	3	33,3	6	24,0	12,5		
1999 Ben-Yosef et al ¹⁵	14	24	14	58,3	39	9	64,3	3	33,3	6	42,9	25,0		
2 études	55	72	39	54,2	78	18	46,2	6	33,3	12	30,8	16,7		

azoospermiques non obstructifs

Tableau 14 : Résultats cumulés des biopsies testiculaires en frais et en congelé chez les sujets

déférentielle ou épидидymaire.

Le taux de récupération est de 100 % chez les sujets ayant subi une ponction

c) *Après ponction épидидymo-déférentielle*

Dans notre étude, chez les sujets classés en azoospermie obstructive, le pourcentage de récupération des spermatozoïdes est de 89,2 % (34 sur 38 patients), alors qu'en théorie il devrait être de 100 en cas d'obstacle sur les voies séminales. Deux des patients chez lesquels la biopsie a été infructueuse ont subi une tentative d'anastomose épидидymo-déférentielle, 1 patient présentait une spermatogénèse conservée, et 1 dernier patient présentait un gène CFTR muté, une cryptorchidie et un trouble de maturation à l'histologie. Chez ces patients, il a pu se produire un atrophie secondaire de la fonction testiculaire avec sûrement pour certains d'entre eux une origine mixte obstructive et non obstructive de l'azoospermie.

b) *Patients azoospermiques obstructifs*

Dans l'étude de Devroey et al (1996)³⁵, le taux de récupération avoisine les 90 % (17 prélèvements positifs sur 19). Il est possible de douter du caractère non obstructif de tous les patients prélevés (le caractère non obstructif de l'azoospermie a pourtant été posé après examen histologique chez 18 patients et chez un patient présentant une hypotrophie testiculaire bilatérale (< 1 cm de diamètre) et un taux de FSH > 40 UI/l). Par ailleurs, il s'agit d'une des premières études sur le sujet et le nombre de patients est faible. De même, Kùpker et al (2000)⁸⁴ présentent un taux de récupération des spermatozoïdes de 77% chez des patients azoospermiques non obstructifs. Toutefois, les patients ont été sélectionnés sur la base d'un simple examen clinique. Tous les patients étudiés sont-ils réellement azoospermiques non obstructifs ? Le mode de sélection des patients est donc également important pour évaluer le taux de récupération des spermatozoïdes chez les sujets azoospermiques non obstructifs.

Mercan et al (2000)⁹⁶ ont pratiqué des biopsies testiculaires sur une cohorte importante de patients non obstructifs. Leur taux de récupération est de 64,4 % (291/452). Ce taux élevé pourrait s'expliquer par la grande taille des échantillons prélevés (de 0,5x0,5x0,5 jusqu'à 1x1x1 cm) jusqu'à ce que des spermatozoïdes soient identifiés (i), ou par le fait de prélever 4 à 5 échantillons par testicule. Dans notre étude, l'andrologue réalise jusqu'à 2 prélèvements par testicule.

2) Facteurs féminins

a) Age des femmes

Templeton et al (1996)¹³⁴ au Royaume-Uni, après analyse de 36 961 FIV ont mis en évidence que le succès de la tentative était directement influencés par l'âge de la femme : les plus forts taux de naissance d'enfant vivant par cycle étaient atteints lorsque l'âge de la femme était compris entre 25 et 30 ans (respectivement 19,9 % et 16,9 %), puis déclinaient ensuite très rapidement à partir de 35 ans (13,9 %), 40 ans (8,2 %) et 45 ans (2,5 %).

Dans l'étude de Silber et al (1997b)¹²⁹ étudiant 63 cycles réalisés chez des hommes azoospermiques non obstructifs, les taux de grossesse étaient directement influencés par l'âge de la conjointe et par la réserve ovarienne (définie dans cette étude comme le nombre d'ovocytes recueillis et non comme le taux de FSH au troisième jour du cycle). Ainsi les taux de grossesse menées jusqu'à leur terme par cycle étaient de 21 % dans le groupe comprenant les femmes d'âge < 30 ans (4 sur 19), de 28 % pour les femmes de 30 à 36 (8 sur 29), puis chutaient à 11 % pour les femmes d'âge 37-39 (1 sur 9) et à 0 % pour les femmes d'âge > 40 ans (0 sur 6).

Dans notre étude, il est possible de donner les taux de grossesse par catégorie d'âge au sein des différents groupes : les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Taux de grossesse évolutive du 2^{ème} trimestre en fonction de l'âge de la conjointe dans les 3 groupes de patients suivants : azoospermiques non obstructifs, azoospermiques obstructifs et ayant subi une ponction épидидymaire ou déférentielle

Test stat	N	γ	N cycles	Taux de γ évolutive / P + (%)	Groupes étudiés et tranche d'âge
NS	3	12	25	25	ANO (≤ 29 ans)
	1	8	12,5	12,5	ANO (≥ 30)
NS	3	14	21,5	21,5	OBST (≤ 29 ans)
	3	19	16	16	OBST (≥ 30)
NS	5	17	29,5	29,5	EPIDEF (≤ 29 ans)
	8	34	23,5	23,5	EPIDEF (≥ 30)

Le taux de grossesse par tentative permet d'évaluer les pourcentages de réussite après biopsie testiculaire chez les patients azoospermiques non obstructifs. Il est possible de distinguer le taux de grossesse évolutive par biopsie positive et le taux de grossesse évolutive par biopsie (qui tient compte de toutes les biopsies réalisées, avec ou sans succès) en utilisant des spermatozoïdes frais ou congelés.

3) Grossesses évolutives par ponction

Dans notre étude, les cohortes d'ovocytes n'apparaissent donc pas significativement différentes dans les différents groupes.

La comparaison des nombres d'ovocytes dans le groupe des azoospermiques non obstructifs en frais d'une part, et le groupe des azoospermiques obstructifs en frais ou le groupe des ponctions épидидymo-déférentielles en frais d'autre part n'a pas montré de différence significative.

En analysant le groupe rassemblant les ponctions épидидymaires et déférentielles, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le frais et le congelé.

De même, la comparaison des nombres d'ovocytes des conjoints des patients azoospermiques obstructifs en frais et en congelé et après avoir éliminé les femmes d'âge supérieur ou égal à 35 ans, ne montre pas de différence significative.

Dans notre étude, il n'existe pas de différence significative entre les nombres des conjoints des patients azoospermiques non obstructifs en frais et en congelé, sans doute du fait du faible effectif de l'échantillon en congelé. Par ailleurs, dans les 2 groupes, toutes les femmes ayant subi la ponction présentaient un âge inférieur à 35 ans.

De même, la comparaison des nombres d'ovocytes des conjoints des patients azoospermiques obstructifs en frais et en congelé et après avoir éliminé les femmes d'âge supérieur ou égal à 35 ans, ne montre pas de différence significative.

b) Nombre d'ovocytes, d'ovocytes matures et d'ovocytes injectés recueillis par ponction

Au vu de ce tableau, les meilleurs pourcentages de grossesse évolutive sont obtenus chez des femmes d'âge inférieur ou égal à 29 ans dans les 3 groupes (non obstructifs, obstructifs et épидидymo-déférentiels), sans atteindre toutefois le seuil de significativité au niveau statistique. Donc dans les tentatives prenant en charge une infertilité sévère chez l'homme, l'âge de la conjointe apparaît comme un facteur de réussite important.

a) *Utilisation de spermatozoïdes frais*

α] taux de grossesse évolutive par biopsie positive

Dans notre étude, les taux de grossesse clinique et évolutive par ponction positive de spermatozoïdes sont évalués à 20% (aucune fausse couche spontanée ne s'est produite).

Dans l'étude de Ghazzawi et al (1998)⁵⁸, le taux de grossesse évolutive par ponction positive est de 10% seulement avec 3 grossesses évolutives. Il s'explique par un pourcentage élevé de fausses couches spontanées (50%). A l'origine, le taux de grossesse clinique était en effet de 20%.

Dans l'étude de Su et al (1999)¹³³ au contraire, le taux de grossesse évolutive par ponction positive est élevé (42.6%). Le taux moyen de grossesse évolutive par ponction positive de la littérature est similaire au notre (22.6% contre 20% dans notre étude).

β] taux de grossesses évolutives par biopsie

Le taux de grossesse évolutive par ponction est évalué dans notre étude à 7.7% chez les patients azoospermiques non obstructifs, ce qui correspond à environ une chance sur 13 d'avoir un enfant après la tentative de biopsie testiculaire / ICSI. Le taux moyen observé dans la littérature serait de 14.2%, soit une chance sur 7. Cette différence s'explique par des taux de récupération en spermatozoïdes différents après biopsie testiculaire.

γ] Etude des patients ayant participé avec réussite à la tentative d'AMIP

Dans le groupe des patients azoospermiques non obstructifs, quatre grossesses ont été menées jusqu'à leur terme. Il serait intéressant d'étudier chacun des 4 patients, pour évaluer le bien-fondé de leur classement dans le groupe des azoospermiques non obstructifs, et pas dans le groupe des azoospermiques obstructifs : c'est un diagnostic discuté par l'andrologue, et qui dépend de nombreux paramètres.

Un patient est étiqueté Klinefelter homogène, mais à spermatogénèse conservée au vu de l'histologie. Un second patient présentait une angiokératose, une maladie de Fabry et une azoospermie familiale. Chez un troisième patient, lors d'une précédente tentative deux ans auparavant, l'histologie avait montré une spermatogénèse avec faible maturation et

Dans nombre d'études considérant les tentatives réalisées à partir de spermatozoïdes congelés, le nombre de prélèvements testiculaires initiaux n'est pas mentionné, de sorte qu'il n'est pas possible de calculer le taux de grossesse évolutive par biopsie dans ces études.

β] taux de grossesse évolutive par biopsie

Le taux moyen de grossesse évolutive par cycle de décongélation chez des patients azoospermiques non obstructifs dans notre revue de la littérature est de 26.3 % , ce qui apparaît même plus élevé que le chiffre obtenu en frais de 22.6 %. D'après ces données, l'utilisation de spermatozoïdes congelés n'altérerait en rien les résultats chez les patients azoospermiques non obstructifs.

α] taux de grossesse évolutive par cycle de décongélation

Dans notre étude, sur 8 cycles de décongélation chez les azoospermiques non obstructifs, le taux de récupération des spermatozoïdes était de 100 %. Toutefois, la numération dans chaque cas était très faible (6 cas à 0.01 M/ml ou moins et 2 cas à 0.05 M/ml, soit une moyenne de 0.02 M/ml) et la mobilité après décongélation très faible également (4 cas présentant des spermatozoïdes immobiles et 4 cas présentant de rares spermatozoïdes mobiles). Aucune grossesse n'a été obtenue. L'injection de spermatozoïdes immobiles (57 % des spermatozoïdes injectés) est sans doute la cause du très faible taux de fécondation (3 sur 36 soit 8 %). Dans la littérature, aucune publication traitant de la mobilité des spermatozoïdes après décongélation chez des sujets azoospermiques non obstructifs n'a été retrouvée.

b) *Utilisation de spermatozoïdes congelés*

L'endocrinologue avait conclu à un déficit endocrine partiel du testicule. Le quatrième patient avait présenté des antécédents de cryptozoospermie. Il est intéressant de noter que l'histologie testiculaire de ces 4 patients avait dans chaque cas montré la présence de spermatozoïdes. Il est évidemment difficile de discuter en quelques lignes du diagnostic de ces patients, mais il faut noter que le fait de poser un diagnostic d'azoospermie non obstructive chez un sujet en fait azoospermique obstructif augmenterait artificiellement les pourcentages.

être évitées lorsqu'aucun spermatozoïde ne peut être retrouvé dans la biopsie. Dans un quatrième temps, la congélation des spermatozoïdes permettrait de diminuer la répétition des biopsies et donc les traumatismes chirurgicaux faisant risquer une

Dans un troisième temps, des cycles de stimulation inutiles chez la femme pourraient multidisciplinaire.

ponction d'ovocytes, diminuant ainsi les contraintes d'organisation au sein de l'équipe d'éviter la synchronisation des deux actes chirurgicaux, à savoir la biopsie testiculaire, et la Dans un deuxième temps, la congélation des spermatozoïdes testiculaires permettrait orchidectomie d'un testicule solitaire en raison de cancer.

permettrait de gagner du temps dans le cas de patients programmés par la suite pour une testiculaire ?). Dans le même ordre d'idée, la congélation des spermatozoïdes testiculaires quel droit en effet injecterait-on des cellules provenant d'un patient présentant un cancer histologique est fortement recommandée avant d'entreprendre toute tentative de FIV. (De % des 175 patients biopsiés présentaient une néoplasie testiculaire. Donc une évaluation histologique avant stimulation ovarienne. En effet, dans l'étude de Küpker et al (2000)⁸⁴, 2,9 Dans un premier temps, cette manière de procéder permettrait de poser un diagnostic

I'ICSI, en particulier pour les hommes azospermiques obstructifs et non obstructifs. L'utilisation de spermatozoïdes testiculaires congelés procure plusieurs avantages pour

a) Avantages

spermatozoïdes testiculaires présente en effet des avantages et des inconvénients. les spermatozoïdes dans l'attente de la tentative d'I'ICSI. La congélation préalable des biopsie testiculaire. D'autres équipes pratiquent d'abord la biopsie testiculaire, puis congèlent Certaines équipes ont choisi de procéder à la tentative I'ICSI le même jour que la

spermatozoïdes testiculaires congelés ?

4) Utilisation de spermatozoïdes testiculaires frais pour l'I'ICSI ou utilisation de

L'étude de Küpker et al (2000)⁸⁴ est la seule à fournir cette information. Le taux de grossesse évolutive par biopsie après utilisation de spermatozoïdes congelés est évalué à 16,6 %. Ce taux apparaît plus élevé que le taux moyen de la littérature obtenu en frais (14,2 %). Toutefois, dans cette étude, les patients ont été classés en non obstructifs en fonction seulement de l'examen clinique.

Selon Verheyen et al (1997)¹⁵⁴, les taux de récupération moyens de mobilité et de vitalité immédiatement après décongélation des spermatozoïdes testiculaires congelés sont de 26 % et de 32 % respectivement. Selon cette équipe, la décongélation des spermatozoïdes testiculaires a été suspectée d'augmenter l'incidence des « cassures » au niveau de la pièce intermédiaire, et d'entraîner une diminution des taux de fécondation probablement par altération du centrosome. De nouvelles études utilisant la microscopie électronique seraient nécessaires pour clarifier la question. Ben Yosef et al (1999)¹⁵ ont comparé les taux de fécondation après injection de spermatozoïdes décongelés mobiles ou immobiles dans 2 groupes de 11 patients azoospermiques non obstructifs. Lorsque les spermatozoïdes sont mobiles après décongélation, les taux de fécondation sont de 54.3 et 64.3 % (contre 51 et 61

b) Inconvénients

congélation n'a pas d'effet négatif sur le processus. d'augmentation des taux d'avortement spontané ou de malformations, ce qui montre que la grossesse) en utilisant des spermatozoïdes frais ou congelés. Cette étude n'a pas montré les résultats obtenus après TESE et ICSI (en terme de taux de fécondation, implantation, dire. Selon Habermann et al. (2000)⁶³, il n'a pas été trouvé de différence significative entre et efficace, mais des études à long terme et contrôlées sont nécessaires pour confirmer ces commencer l'induction de l'ovulation chez la partenaire pourrait constituer un choix pratique significativement différents. Donc congeler les spermatozoïdes testiculaires avant de obstructifs. Le test de Kruskal-Wallis montre que ces taux de grossesse ne sont pas frais (32 cycles) et 12.5 % (23 cycles) après congélation chez des sujets azoospermiques non De même, Farrag et al. (2000)⁴¹ obtiennent un taux de grossesse clinique égal à 15.6 % en chez des patients azoospermiques non obstructifs (46 et 22 % respectivement sur 238 cycles). respectivement sur 24 cycles) sont comparables à ceux obtenus avec des spermatozoïdes frais fécondation et de grossesses cliniques en ICSI avec des spermatozoïdes congelés (50 et 33 % évolutive par tentative en congelé à 26.3 %. Selon Kamal et al. (2000)⁷⁸, les taux de grossesse évolutive par ponction positive en frais est évalué à 22.6 % et le taux de grossesse évolutive ne sont pas significativement différents. Dans la littérature en effet, le taux de des spermatozoïdes frais ou congelés utilisés en ICSI^{51, 88}. De même, les taux de grossesse petits testicules. Nous savons que des taux de fécondation identiques ont été retrouvés avec dévascularisation partielle voire totale du testicule, notamment chez les patients présentant de

Dans notre étude, et dans la majeure partie des études tirées de la littérature, la technique de congélation des spermatozoïdes testiculaires utilise le protocole standard de congélation des spermatozoïdes éjaculés. Dans des cas où seulement quelques spermatozoïdes sont isolés, Cohen et al (1997)²¹ décrivent l'insertion individuelle des spermatozoïdes dans des ovocytes de hamster dépellucidés. Bien que cette technique permette la congélation individuelle de chaque spermatozoïde, peu de laboratoires d'AMP pourraient l'utiliser en raison du temps et des surcoûts nécessaires. En revanche, Romero et al (1996)¹¹³ ont mélangé chaque spermatozoïde avec du tissu testiculaire pour former des « pilules » congelées. Le tissu était homogénéisé à l'aide d'une lame en verre, et des gouttes de 100 microlitres furent

c) Technique de congélation

Le problème majeur de l'utilisation de spermatozoïdes congelés est en effet la recherche de spermatozoïdes mobiles après décongélation. Après décongélation, de nombreux spermatozoïdes sont immobiles, et posent le problème de leur aptitude à féconder l'ovocyte. Dans certains cas, il est difficile de rechercher des spermatozoïdes mobiles juste après la biopsie testiculaire chez des patients azoospermiques non obstructifs. Après congélation et décongélation de ces spermatozoïdes, les spermatozoïdes deviennent encore plus rares, et beaucoup moins mobiles. Ainsi, le temps nécessaire à la microinjection est considérablement augmenté afin de rechercher les éventuels spermatozoïdes mobiles après décongélation. Ceci peut poser des problèmes de personnel et d'organisation dans le laboratoire, et surtout diminuer le taux de fécondation des ovocytes par injection de spermatozoïdes non viables. Par ailleurs, certaines équipes situées sur différents sites pratiquent la TSE à distance de la tentative pour faciliter leur fonctionnement. Cela garantit-il aux couples les meilleures chances de réussite ? Il est d'ailleurs possible de s'interroger sur les bons résultats obtenus par certains auteurs dans les cas d'azoospermie non obstructive après utilisation de spermatozoïdes décongelés. Les grossesses pourraient être obtenues chez des patients étiqués azoospermiques non obstructifs, mais en fait azoospermiques obstructifs : les taux de grossesse des sujets azoospermiques non obstructifs seraient alors artificiellement augmentés.

% en injectant des spermatozoïdes mobiles et immobiles). Lorsque les spermatozoïdes sont immobiles après décongélation, les taux de fécondation tombent à 17.6 et 0 %.

Le fait de présenter un taux de FSH normal chez un patient ANO n'est pas forcément prédictif de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. Dans notre étude, sur 5 patients ANO présentant un taux de FSH normal, 2 patients ne retrouvaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie. Par ailleurs, sur 45 patients ANO présentant un taux de FSH élevé, 30 (67 %) soit les 2/3 environ ne présentaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie. quinze patients (33 %) retrouvaient tout de même des spermatozoïdes. Le taux de FSH est donc plus élevé en

2) Taux de FSH

Le fait de présenter un volume testiculaire normal chez un patient ANO n'est pas forcément prédictif de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. Dans notre étude, sur 5 patients ANO présentant un volume testiculaire normal, 3 patients ne retrouvaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie. Par ailleurs, sur 42 patients ANO présentant un volume testiculaire diminué, 26 (61,9 %) ne présentaient pas de spermatozoïdes lors de la biopsie. Le volume testiculaire est donc diminué en général chez les sujets ANO, mais il ne prédit pas de manière fiable la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. Ceci est en accord avec la littérature^{144, 38}.

1) Volume testiculaire

SPERMATOZOÏDES

B) FACTEURS PRÉDICTIFS DE LA PRÉSENCE INTRATESTICULAIRE DE

En pratique, dans notre étude, la première tentative est réalisée en frais. Puis les pillettes sont numérotées et identifiées en fonction du site du prélèvement sur le testicule après la première tentative d'ICSI et avant congélation. Ainsi, lors de la deuxième tentative, une pillette présentant une bonne numération et une bonne mobilité est décongelée. Si aucun spermatozoïde mobile ne peut être isolé, une autre pillette est décongelée.

placées sur de la glace pour créer des « pilules » congelées. Puis ces « pilules » furent plongées dans l'azote liquide. Cette dernière méthode semble intéressante.

Il existe des arguments en faveur d'une biopsie diagnostique préalable, mais aussi des inconvénients à cette pratique.

Dans le cas d'une **biopsie diagnostique**, l'objectif est de montrer la présence de spermatozoïdes avant de procéder à la biopsie thérapeutique : l'examen histologique apportera

Au vu des résultats de Bordeaux pour les ANO et en supposant qu'une biopsie diagnostique préalable soit réalisée (alors qu'en réalité le diagnostic histologique est concomitant de la TSE à Bordeaux), lorsque l'histologie est positive, il existe une forte probabilité de retrouver des spermatozoïdes lors de la ponction (pour les 9 cas où l'histologie s'est révélée positive, la biopsie a retrouvé des spermatozoïdes dans 8 cas). Par ailleurs, lorsque l'histologie est négative, les spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés dans 79,5 % des cas (sur 39 cas où l'histologie était négative, la biopsie n'a pas retrouvé de spermatozoïdes dans 31 cas), mais il existe un nombre non négligeable de cas où des spermatozoïdes pourront être retrouvés (8/39 = 20,5 %). Ceci est en accord avec la littérature : l'histologie testiculaire est un des meilleurs facteurs prédictifs de la présence de spermatozoïdes au niveau du testicule^{128, 142, 144}. Toutefois, une histologie négative ne permet pas d'affirmer l'absence de spermatozoïdes testiculaires et la biopsie ne doit pas être écartée. Le fait d'obtenir une histologie négative chez un patient où des spermatozoïdes ont pu être retrouvés lors de la biopsie thérapeutique s'explique du fait qu'un seul prélèvement de la biopsie en général est envoyé en anatomopathologie, alors que plusieurs prélèvements peuvent être réalisés lors de la biopsie thérapeutique (Tournaye et al (1996)¹⁴² rapportent jusqu'à 20 prélèvements par testicule). Par ailleurs, à Bordeaux, le prélèvement n'était pas adressé directement au laboratoire d'anatomopathologie. Ce n'est qu'après traitement partiel du tissu testiculaire (écrasement entre 2 lames de verre et passage à travers aiguille de 19 G) qu'une partie du prélèvement était envoyée au laboratoire d'anatomopathologie : ce traitement préalable doit altérer quelque peu l'architecture des tubules séminifères et diminuer la qualité de l'interprétation des frottis. Depuis l'année 2001, une partie du prélèvement testiculaire est envoyée directement au laboratoire d'anatomopathologie.

3) Histologie ou biopsie diagnostique préalable

général chez les sujets azoospermiques non obstructifs, mais il ne prédit pas de manière fiable la présence de spermatozoïdes intratesticulaires. Ceci est en accord avec la littérature^(20, 38, 80, 93, 144).

une réponse. Silber et al. (1997)¹²⁸ ont étudié 45 patients avec azoospermie d'origine testiculaire : l'objectif était de déterminer si le fait d'observer des spermatozoïdes lors de la biopsie diagnostique (similaire à la biopsie diagnostique avec anesthésie locale, incision de 0,5 cm au lieu de 2 cm) du testicule pouvait prédire le succès ou l'échec d'une TSE future. Chez 26 patients sur 45 (58 %), des spermatozoïdes étaient présentes lors de la biopsie-diagnostic et chez 22 de ces 26 patients (85 %), des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la TSE. Chez 19 patients sur 45 (42 %), des spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés lors de la biopsie-diagnostic et chez 1 patient sur 19 (5 %) des spermatozoïdes ont été retrouvés lors de la TSE. Donc selon Silber et al (1997)¹²⁸, une biopsie diagnostique préalable montrant la présence de spermatozoïdes donnerait 85 % de chances d'extraire des spermatozoïdes lors de la TSE, tandis qu'une biopsie diagnostique négative réduirait la probabilité de trouver des spermatozoïdes lors de la TSE à 5 % (et le fait qu'une seule biopsie diagnostique testiculaire soit relativement prédictive de l'extraction des spermatozoïdes à la TSE serait en faveur d'une distribution homogène de la spermatogénèse chez les patients azoospermiques non obstructifs).

Tournaye et al (1996)¹⁴² ont étudié les biopsies testiculaires de 124 patients infertiles (38 patients ayant déjà présenté des spermatozoïdes dans l'éjaculat mais pas le jour de la ponction d'ovocytes et ayant donc nécessité une biopsie testiculaire, et 86 patients azoospermiques). Lorsque l'histologie montrait une spermatogénèse normale (70 cas) ou une hypoplasie (11 cas), les spermatozoïdes ont toujours été extraits lors de l'examen extemporané de la biopsie. En cas d'aplasie des cellules germinales (25 cas) ou d'arrêt de maturation (18 cas), les spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés dans tous les cas (3 et 5 cas respectivement), et dans ces cas un nombre plus important de biopsies par patient ont été nécessaires pour extraire les spermatozoïdes. La distribution de la spermatogénèse, si elle existe, serait donc plutôt limitée à certains foyers bien précis. Donc, selon cette équipe, une biopsie-diagnostic serait prédictive seulement si une spermatogénèse normale ou une hypoplasie du tissu testiculaire est observée. Dans les cas où un arrêt de maturation ou une aplasie des cellules germinales a été observé après biopsie diagnostique, il existe encore des chances d'extraire des spermatozoïdes testiculaires lors de la tentative de TSE-ICSI, par exemple en retirant un échantillon de tissu testiculaire plus important, pouvant contenir un foyer actif de spermatogénèse.

En contrepartie, une biopsie diagnostique suivie de TSE pourrait soumettre le patient à de plus grands risques de blessure vasculaire. La spermatogénèse est en effet un processus délicat et interdépendant, facilement influencé par son environnement. Bien qu'un homme normal produise de 80 à 100 millions de spermatozoïdes par jour, un homme

Toutefois, l'association de ces facteurs prédictifs permettrait de mieux évaluer les cas où l'extraction de spermatozoïdes testiculaires est probable. Ainsi, dans notre étude, l'association d'un volume testiculaire faible et d'une FSH augmentée (facteurs corrélés négativement avec l'extraction des spermatozoïdes testiculaires) serait prédictive de façon

b) Association des facteurs prédictifs

Comme nous l'avons montré dans notre étude, l'étude d'un seul paramètre pour prédire l'extraction négative des spermatozoïdes intratesticulaires, tel un volume testiculaire diminué apparaît donc moins efficace qu'un taux de FSH augmenté ou surtout qu'une histologie testiculaire négative (respectivement 61,9, 67 et 79,5 % d'extraction négative des spermatozoïdes). Mais selon ces résultats, l'utilisation de l'histologie comme facteur prédictif de l'absence de spermatozoïdes testiculaires écarterait la biopsie testiculaire chez 21 % des patients azoospermiques non obstructifs présentant réellement des spermatozoïdes intratesticulaires. Par ailleurs, l'histologie testiculaire était le meilleur facteur prédictif de la présence de spermatozoïdes intratesticulaires (8 cas d'histologie positive pour 9 biopsies positives dans notre étude, soit 88,9 %).

a) Un seul facteur prédictif

4) Conclusion sur les facteurs prédictifs

En opposition, le fait de réaliser une **biopsie thérapeutique** d'emblée n'utilise pas l'histologie testiculaire comme facteur prédictif, mais plutôt comme un outil pour classer a posteriori le patient dans une catégorie histologique précise, et donc conforter le diagnostic premier : sujet azoospermique obstructif ou non obstructif.

L'avantage est de réaliser un seul geste chirurgical, a priori moins délétère pour les patients. Mais l'histologie du testicule ne peut alors constituer un facteur prédictif.

présentant une azoospermie fonctionnelle produit de rares spermatozoïdes. Donc un quelconque effet sur la fonction testiculaire d'un homme avec une azoospermie fonctionnelle sera susceptible de détruire le niveau marginal de production des spermatozoïdes¹¹⁹.

faible de l'absence de spermatozoïdes testiculaires dans 25 cas sur 38 (65.8 %). De même, l'association du volume testiculaire et de l'histologie serait prédictive de l'absence de spermatozoïdes testiculaires dans 25 cas sur 32 (78.1 %). En utilisant la FSH et l'histologie, cette association serait véritablement prédictive dans 28 cas sur 35 (80 %). Finalement, l'association d'un taux de FSH élevé, d'un volume testiculaire diminué et d'une histologie négative permettrait d'évaluer les cas où les spermatozoïdes sont absents dans 24 cas sur 30 (80 %). Il est intéressant de noter que ce pourcentage est légèrement supérieur à celui obtenu en tenant seulement compte de l'histologie (79.5 % d'extraction négative en cas d'histologie négative). L'association des facteurs prédictifs permet donc d'améliorer l'évaluation des patients candidats à une biopsie testiculaire pour extraction de spermatozoïdes. Toutefois, même en associant ces trois facteurs prédictifs de l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires, la biopsie testiculaire a montré la présence de spermatozoïdes dans 6 cas sur 30 (20 %). C'est un pourcentage conséquent, et qui montre que la biopsie chez des sujets ANO ne peut être écartée à la lumière de ces seuls facteurs prédictifs. Dans l'étude de Tournaye et al (1997)¹⁴⁴, 31 patients présentaient la triade classique : azoospermie, taux de FSH > 12 UI/l et volume testiculaire < 15 ml : les spermatozoïdes ont été extraits dans 15 cas, soit dans 48.4 % de ces patients. Ne pas procéder à la biopsie dans ces cas ne permettrait pas à environ la moitié des couples de procéder à une tentative d'AMP.

Selon certains auteurs¹³³, il n'est pas surprenant que la FSH et le volume testiculaire ne prédisent pas de façon fiable l'extraction de spermatozoïdes testiculaires chez des patients azoospermiques non obstructifs. En effet, les hommes présentant un arrêt de maturation complet à l'histologie testiculaire peuvent avoir des volumes testiculaires et des taux de FSH normaux sans que l'extraction de spermatozoïde soit possible à la TESE. Au contraire, un homme présentant un aspect prédominant du syndrome des cellules de Sertoli seules associé à des régions focales de spermatogénèse normale à l'histologie, est susceptible d'avoir un plus petit volume testiculaire et un taux de FSH élevé, avec extraction de nombreux spermatozoïdes lors de la TESE. Le taux de FSH en effet n'est pas corrélé au nombre de spermatozoïdes ou au nombre de spermatozoïdes matures ou immatures³² mais est plutôt corrélé de manière inverse au nombre de spermatozoïdes. Donc les patients avec arrêt de maturation pourraient avoir des taux de FSH normaux, tandis que les patients avec le syndrome des cellules de Sertoli pourraient présenter des taux de FSH élevés.

Un point important est à souligner : dans différentes études³⁶ ou chacun de ces facteurs prédictifs ont été étudiés en enregistrant la valeur numérique pour chaque cas (Taux de FSH (UI/l), volume testiculaire (ml) et score de Johnsen (1 à 10)), il existe de grands écarts de

Une autre possibilité est l'étude des spermatozoïdes dans l'éjaculat par fluorescence ou coloration MGG. Selon Ezech et al (1998)³⁶, la détection immunologique de spermatozoïdes dans l'éjaculat pourrait être utilisée comme facteur prédictif de la présence de spermatozoïdes

intratesticulaires avant de réaliser l'extraction des spermatozoïdes intratesticulaires. Doppler-couleur du testicule pourrait permettre d'évaluer la distribution des vaisseaux spermatogénétiques, y compris des spermatozoïdes matures dans 12 cas sur 16. L'analyse testicule où avait été découvert des vaisseaux a permis de récupérer des cellules vaisseaux dans 16 testicules (66.6%). Une nouvelle aspiration réalisée dans les régions du vaisseau testiculaire n'a été mise en évidence dans 8 testicules (33.3%) et moins de 3 atteints de déficit testiculaire primaire ont été étudiés, et pour chacun les 2 testicules. Aucun prédictif. Dans l'étude de Foresta et al (1998)⁴⁸, 12 sujets azoospermiques non obstructifs L'analyse Doppler-couleur du testicule pourrait également constituer un facteur biopsie testiculaire.

azoospermiques, en complément de la FSH et du volume testiculaire, avant de procéder à la intéressant pour évaluer la qualité de la spermatogénèse et notamment chez les sujets l'extraction des spermatozoïdes par TESE. L'inhibine B apparaît donc comme un paramètre combinaison avec la FSH montrent une sensibilité de 75% et une spécificité de 73% pour (1999)¹⁵⁵ étudiant 91 patients infertiles azoospermiques ou oligospermiques, l'inhibine B en présence de stades avancés de la spermatogénèse¹⁰⁷. Selon l'étude de Von Eckardstein et al. L'inhibine B est en effet un produit des tubes séminifères et sa sécrétion est stimulée par la l'inhibine B sérique^{12, 14} apparaît utile en complément des autres facteurs prédictifs. Comme nous l'avons vu dans le chapitre des facteurs prédictifs, le dosage de

5) Perspectives

testiculaire) apparaissent nécessaires. plus faibles de la présence de spermatozoïdes testiculaires et non invasifs (comme l'histologie n'est souvent réalisée que le jour de la TESE proprement dite. D'autres facteurs prédictifs Au total, l'histologie apparaît donc comme le facteur prédictif le plus fiable, mais elle

testiculaires. valeurs au sein des groupes ayant présente ou pas des spermatozoïdes lors de la biopsie prédictifs permettant de prédire de façon fiable la présence (ou l'absence) de spermatozoïdes

Feldberg et al. (2000)⁴² ont essayé de traiter 15 patients ANO étiquetés après histologie testiculaire en « arrêt de maturation » (présentant des mauvais résultats en terme d'extraction de spermatozoïdes testiculaires et un faible potentiel de fécondation) : une ampoule de Metrodin® (pFSH) par jour pendant 90 jours consécutifs leur a été administrée avant de renouveler le cycle TESE-ICSI avec une nouvelle évaluation de l'histologie testiculaire. Les résultats ont été comparés à un groupe contrôle constitué de 15 patients azoospermiques obstructifs. Une augmentation significative des taux de fécondation (46 % dans le groupe des 15 patients ANO traités avec pFSH contre 27 % dans le groupe des 15 patients ANO traités sans pFSH) a été retrouvée chez les patients traités par Metrodin® ainsi

1) Avant prélèvement : *Metrodin (pFSH)*

C) PERSPECTIVES

le plus juste possible, dans l'attente d'autres marqueurs plus précis.

s'agit donc à l'heure actuelle de croiser les paramètres disponibles afin d'obtenir le diagnostic En conclusion, ces paramètres sont intéressants, mais aucun n'est fiable à 100 %. Il des spermatozoïdes lors de la biopsie.

%). Donc, ce test simple et de faible coût pourrait prédire de façon plus efficace l'extraction positives (sensibilité de 83.7 %) et dans 22 % des cas de TESE négatives (spécificité de 78 de 50 %). Par ailleurs, les spermatozoïdes ronds ont été détectés dans 83.7 % des cas de TESE de TESE positives (sensibilité de 100 %), et dans 50 % des cas de TESE négatives (spécificité Selon leur travaux, les spermatozoïdes de 1^{er} ordre ont été mis en évidence dans 100 % des cas l'éjaculat de 100 patients azoospermiques non obstructifs par simple coloration au MGG. Amer et al (2001)⁶ ont proposé de mettre en évidence les cellules germinales dans l'éjaculat). La sensibilité était donc de 100 %, et la spécificité de 75 %.

spermatozoïdes extraits lors de la biopsie (25 % des cas sans spermatide détectable dans arrêt de maturation (4 patients). Toutefois, quatre patients présentant un SCO avaient des était absente (pas de spermatozoïdes). Ces patients présentaient soit un SCO (12 patients) soit un d'hypospématogénèse, sept cas de spermatogénèse focale). Chez 16 patients, la fluorescence deux spermatozoïdes présentes), des spermatozoïdes testiculaires ont été extraits (cinq cas s'effectue par fluorescence. Chez 12 patients présentant une fluorescence positive (une ou intratesticulaires. Un anticorps monoclonal spécifique de l'acrosome est utilisé et la détection

Les taux de fécondation sont assez variables d'une équipe à l'autre : de 10 % rapporté par Fischel et al (1995)⁴⁶ jusqu'à 71 % rapporté par Kahraman et al (1998)⁷⁷. Dans la majorité des cas, le taux de fécondation obtenu par microinjection de spermatozoïdes est inférieur à celui obtenu par microinjection de spermatozoïdes allongés. Les publications montrent de faibles taux d'implantation et un nombre de fausses couches élevées.

La première naissance par injection de spermatozoïdes allongés a été rapportée par Fischel et al (1995)⁴⁶. Une biopsie testiculaire diagnostiquée chez le patient avait montré la présence de spermatozoïdes. Mais le jour de la tentative, seuls 9 spermatozoïdes ont été retrouvés et l'injection a été faite avec des spermatozoïdes allongés de morphologie apparemment normale. Sur 10 ovocytes, un seul a été fécondé et a donné un embryon. Le transfert de cet embryon a abouti à une naissance. Al-Hasani et al (1999)² rapportent les 2 premières grossesses obtenues à partir de spermatozoïdes allongés congelés d'origine testiculaire.

Il s'agit de microinjecter un ovocyte avec une spermatozoïde ronde ou en début d'élongation, prélevée sur une biopsie testiculaire ou identifiée dans l'éjaculat des patients ayant une azoospermie. Dix-sept enfants sont nés dont 4 avec spermatozoïde ronde (ROSI) et 13 avec spermatozoïde allongés (ELSI).

Tesarik et al (1995)¹³⁵ ont été les premiers à microinjecter des spermatozoïdes ronds provenant de l'éjaculat d'hommes dont l'azoospermie complète était inattendue le jour de la tentative de fécondation in vitro. Sur les 7 transferts réalisés, 2 ont donné lieu à une grossesse puis une naissance à terme. La troisième naissance par ROSI a été publiée par Vanderzwalmen et al (1997)¹⁵⁰ deux ans plus tard. Les spermatozoïdes provenaient cette fois-ci de biopsies testiculaires. La congélation de spermatozoïdes ronds⁹ est possible avec des taux de survie satisfaisants (70 %), une fécondance identique aux spermatozoïdes non congelés et la possibilité d'initier un développement embryonnaire viable (un enfant né).

2) Après prélèvement : l'utilisation des spermatozoïdes

qu'une augmentation du nombre d'embryons par transfert (2.7 ± 0.4 vs 1.4 ± 0.2) entraînant des taux élevés de grossesse clinique par transfert (40 % vs 6 %) et d'implantation par embryon (14.6 % vs 4.5 %). La pFSH aurait donc un impact positif dans le traitement des hommes souffrant d'azoospermie non-obstructive, mais des cohortes de patients plus importantes pourraient être étudiées dans le cadre d'études multicentriques.

L'expérience des fécondations assistées avec spermatozoïdes matures demeure donc limitée dans l'espèce humaine. Dans le cas des spermatozoïdes allongés, c'est l'infertilité du procédé qui est en cause, dans le cas des spermatozoïdes allongés, c'est sa relative inutilité car, en général, lorsqu'on trouve des spermatozoïdes allongés dans un prélèvement testiculaire ou un éjaculat, on trouve également des spermatozoïdes matures qui seront préférentiellement micro-injectés.

L'une des plus grandes craintes lors de l'introduction d'une nouvelle technique de fécondation assistée est celle de faire naître des enfants anormaux. Sur ce point, les premières informations concernant les enfants conçus par microinjection de spermatozoïdes sont plutôt rassurantes^{47, 135}. Mais Zech et al (2000)¹⁶¹ ont rapporté 2 cas de malformations majeures sur 4 grossesses obtenues après injection de spermatozoïdes allongés. Dans le premier cas, un hydrocéphale a été diagnostiqué et la grossesse a été interrompue à la 20^{ème} semaine. A l'analyse anatomopathologique, il existait également une spina bifida et un diaphragmatocèle. Toutes les cellules amniotiques présentaient une trisomie 9. Dans le 2^{ème} cas, un garçon est né avec un myéloméningocèle (Arnold Chiari syndrome type II) qui n'avait pas été détecté durant la grossesse.

A l'heure actuelle, les patients susceptibles de bénéficier de cette technique sont peu nombreux ; le repérage des spermatozoïdes ronds est malaisé et il n'existe aucun critère fiable de la normalité d'une ROS alors que le spermatozoïde mature peut, au moins, être sélectionné sur sa morphologie. Toutefois, Aslam et al (1998)¹¹ ont pu isoler, purifier et établir la viabilité de spermatozoïdes testiculaires à partir d'une suspension de parenchyme testiculaire grâce à un séparateur de cellules spécial utilisant la fluorescence (FACS pour fluorescent activated cell sorter [FACS IV ; Becton-Dickinson, Cowley, Oxford, UK]). La séparation des cellules est rapide (1000/s). La dissipation d'énergie qui a lieu dans une cellule individuelle lors de son passage devant le faisceau laser est faible, et l'analyse fonctionnelle des autres types de cellules séparées dans les mêmes conditions a montré que cette technique n'était pas toxique.

La culture in-vitro d'échantillon entiers de testicule a été étudiée par Tesarik et al (1998)¹³⁷. Des spermatozoïdes ronds (Sa), allongés (Sd) ont été observées après 2 jours de culture en milieu IVF avec de la rFSH et de la testostérone. Silva et al. (2000)¹³⁰ ont montré que dans des cas purs d'arrêt de maturation et de SCO où un foyer de spermatogénèse jusqu'au stade de spermatozoïde I ou de spermatozoïde ronds a été trouvé, la culture in vitro permet d'obtenir des spermatozoïdes en voie d'élongation Sb chez la plupart des patients (< 90%), et des spermatozoïdes allongés Sd ou des spermatozoïdes chez environ 25% des SCO et 45% des arrêts de maturation. Avec le meilleur milieu de culture possible (milieu conditionné à

partir des cultures de cellules Vero avec du substitut de sérum synthétique, rFSH, Testostérone), environ 15 % de spermatozoïdes en voie d'élongation avec flagelle ou spermatozoïdes allongés précoces peuvent être obtenus en 2-3 jours. Bien que cela procure une aide substantielle pour les cas difficiles, le bas taux de fécondation des spermatozoïdes cultivés soulève un doute sur la constitution génétique des gamètes.

Il convient également de suivre le devenir des enfants nés après biopsie testiculaire : il subsiste en effet doute sur l'innocuité de cette technique. Une étude récente (Bajirova M and al [2001] Final report on the malformation risk after ICSI using epididymal or testicular spermatozooids, 0-100, Abstracts of the 17th annual meeting of the ESHRE) rapporte ainsi un

d'efficacité. meilleure prise en charge des patients, leur permettant d'éviter des traitements lourds de peu ANO. De nouveaux facteurs prédictifs plus fiables apparaissent nécessaires pour une 80 % des cas associant ces 3 critères) et donc d'écarter la biopsie testiculaire chez ces patients dans 67 % des cas de taux de FSH augmenté, dans 79 % des cas d'histologie négative, et dans intratesticulaires (spermatozoïdes absents dans 62 % des cas de volume testiculaire diminué, association ne permettent pas de mettre en évidence l'absence de spermatozoïdes comparé nos résultats à ceux de la littérature. Il apparaît que ces critères, seuls ou en principalement le volume testiculaire, le taux de FSH et l'histologie du testicule. Nous avons présence ou de l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires chez les sujets ANO, Parallèlement, nous avons étudié rétrospectivement les facteurs prédictifs de la nuancer car 8 tentatives seulement).

discordance des résultats pour les tentatives réalisées en congelé chez les sujets ANO (à la littérature. Cette étude montre une relative similitude des résultats en frais, et une important de fausses couches (50 %). Nous avons comparé nos résultats à ceux déjà paru dans injectés (57 % contre 6 % pour les obstructifs), et dans le groupe ED à un pourcentage groupe des sujets ANO étant dû au pourcentage important de spermatozoïdes immobiles d'accouchement par tentative sont respectivement de 0, 20 et 8 %, les faibles taux dans le au recueil des spermatozoïdes dans 38.5 % des tentatives. En congelé, les taux groupes d'ANO, d'AO et dans le groupe ED, le faible taux dans le groupe des ANO étant dû frais, les taux d'accouchement par biopsie sont respectivement de 8, 16 et 25 % dans les à ceux obtenus dans le groupe des sujets AO, et dans celui des ED, en frais et en congelé. En même période. Puis nous avons comparé les résultats obtenus dans le groupe des sujets ANO ponctions Epididymo-Déferentielles (51 cas) réalisées au CHU de Bordeaux pendant cette Obstructive (52 cas) des cas d'Azoospermie Obstructive (38 cas), et les tentatives de Bordeaux de 1995 à fin 2000 (90 tentatives), en séparant les cas d'Azoospermie Non Nous avons analysé rétrospectivement les tentatives de TSE réalisées au CHU de

CONCLUSION

taux d'anomalie malformative d'origine chromosomique significativement plus important chez les enfants ou foetus issus de tentative FIV-ICSI avec des spermatozoïdes testiculaires prélevés chirurgicalement par rapport au taux observé dans la population générale (6.48 % contre 2.06 %).

BIBLIOGRAPHIE

1. Ahmadi et Ng SC (1997) The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 68, 346-350.
2. Al-Hasani S, Demirel LC, Schöpfer B, Bals-Pratsch M, Nikolettos N, Kuppker W, Uğur M, Sturm R and Diedrich K (1999) Pregnancies achieved after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 14, 2031-2035.
3. Allen JA, Cotman AS. (1997) A new method for freezing testicular biopsy sperm : three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. *Fertil. Steril.*, 68, 741-744.
4. Amer M., El Haggag S., Taymour M., Abd El-Naser T., Zohdy W. (1999) Testicular sperm extraction : impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum. Reprod.*, 14, 3030-3034.
5. Amer M., Aleyah A., Hany R., Zohdy W. (2000) Prospective comparative study between microsurgical and conventional TESE in non-obstructive azoospermia : follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum. Reprod.*, 15, 653-656.
6. Amer M, Abd Elmasser T, El Haggag S, Mostafa T, Abdel-Malak G, Zohdy W (2001) May-Grunwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate : a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. *Hum. Reprod.*, 16, 1427-1432.
7. Anderson R.A., Irvine C.B., Groome N.P., Riley S.C. (1998) Inhibin B in seminal plasma : testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 4, 920-926.
8. Angelopoulos T, Krey L, Mc Cullough A (1997) A simple and objective approach to identifying human round spermatids. *Hum. Reprod.*, 12, 2208-2216.
9. Antinori S, Versaci C, Dani G. (1997b) Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatids into human oocytes. *Hum. Reprod.*, 12, 554-556.
10. Aran B, Blanco J, Vidal F (1999) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an *in vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil. Steril.*, 72, 696-701.
11. Aslam J, Fishel S (1998) Short term *in vitro* culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human *in vitro* conception. *Hum. Reprod.*, 13, 634-638.

12. Bailly M., Bergère M., Nizard J., Wainer B., Cavelot P., Lombroso R., Selva J. and Vile Y. (2000) Inhibin B plasmatic concentrations predictive of negative surgical testicular sampling in azoospermic patients. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, P-006.
13. Balaban B., Urman B., Sertac A., Alatas C., Aksoy S., Mercan R. and Nuhoglu A. (1999) In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 14, 2808-2811.
14. Ballesca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, Martinez de Osaba MJ, Ascaso Cand Vanrell JA. (2000) Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 15, 1734-1738.
15. Ben-Yosef D, Yogev L, Hausser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, Lessing JB and Amit A (1999) Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 7, 1794-1801.
16. Berkow R. and Fletcher A.J. (1992) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. Merck Sharp & Dohne research Laboratories, Rahway, NJ, USA.
17. Brandell R.A., Mielnik A., Liotta D., Ye Z., Veck L.L., Palermo G.D., Schlegel P.N. (1998) AZFB deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction : preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum. Reprod.*, 10, 2812-2815.
18. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML (1996) The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil. Steril.*, 65, 972-976.
19. Chemes P, Cigorraga S, Bergada C. (1992) Isolation of human Leydig cell mesenchymal precursors from patients with the androgen insensitivity syndrome : testosterone production and response to human chorionic gonadotropin stimulation in culture. *Biol. Reprod.*, 46, 793-803.
20. Chen C.S, Chu S.H, Lai Y.M, Wang M.L, and Chan P.R. (1996b) Reconsideration of testicular biopsy and follicle-stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 11, 2176-2179.
21. Cohen J, Garrisi GJ, Conjedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT (1997) Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12, 994-1001.

22. Cozzi J, Chevret S, Rousseaux R et al (1994) Achievement of meiosis in XXY germ cells : study of 543 Karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum. Genet.*, 93, 32-34.
23. Crabbe E., Verheyen G., Tournaye H. and Van Steirteghem A. (1997) The use of enzymatic procedures to recover testicular germ cells. *Hum. Reprod.*, 12, 1682-1687.
24. Crabbe E., Verheyen G., Silber S., Tournaye H., Van de Velde H., Goossens A. and Van Steirteghem A. (1998) Enzymatic digestion of testicular tissue may rescue the intracytoplasmic sperm injection cycle in some patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 13, 2791-2796.
25. Craft I. and Tsigotis M. (1995) Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10, 1623-1627.
26. Craft I., Tsigotis M., Bennett V. et al. (1995) Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 63, 1038-1042.
27. Craft I., Tsigotis M., Courtaud E. et al. (1997) Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 12, 1483-1487.
28. Czyba JC, Montella A (1993) Biologie de la Reproduction Humaine. Sauramps medical.
29. Dadoune JP (1997) La spermatide, cette méconnue. *Andrologie*, 7, 22-33.
30. Dardasht K., Russel. H, Williams and Goldstein M. (2000) Microsurgical testis biopsy : a novel technique for retrieval of testicular tissue. *J. Urol.*, 163, 1206-1207.
31. De Croo I., Van der Elst J., Everaert K., De Sutter P. et Dhont M. (2000) Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 15, 1383-1388.
32. De Kreuser D, Burger HG, Hudson B (1974) The relationship between germinal cells and serum FSH levels in males with infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38, 787-793.
33. Del Vento V.R., Amann R.P., Trotter G.W. et al. (1992) Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 2094-2101.
34. Devroey P., Liu J., Nagy Z. (1995) Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 10, 1457-1460.

35. Devroey P, Nagy P, Tournaye H, Liu J, Silber S and Van Steirteghem A (1996) Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 11, 1015-1018.
36. Ezeh U.I.O., Moore H.D.M. et Cooke I.D. (1998a) Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum. Reprod.*, 13, 3066-3074.
37. Ezeh U.I.O., Moore H.D.M. et Cooke I.D. (1998b) A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 11, 3075-3080.
38. Ezeh U.I.O., Taub NA, Moore H.D.M. et Cooke I.D. (1999a) Establishment of predictive variables associated in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 14, 1005-1012.
39. Ezeh U.I.O., Shepherd S, Moore H.D.M. et Cooke I.D. (1999b) Morbidity and cost-effectiveness analysis of outpatient analgesia versus general anaesthesia for testicular sperm extraction in men with azoospermia due to defects in spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 14, 321-328.
40. Ezeh U.I.O. (2000) Beyond the clinical classification of azoospermia. *Hum. Reprod.*, 15, 2356-2359.
41. Farrag A., Ezzedin F., Agamia A., Eid A., Sallam A.N. and Sallam H.N. (2000) Freezing testicular spermatozoa prior to ovulation induction in patients with non-obstructive azoospermia treated by ICSI. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, P-008.
42. Feldberg D., Bar-Hava I., Ashkenazi J., Vohovitch I., Shelef M., Shwartz A. and Ben-Rafael Z. (2000) The role of pFSH therapy for the male partner in cases of non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, P-007.
43. Fenichel P., (1999) A la recherche de facteurs prédictifs de la spermatogénèse dans l'azoospermie sécrétoire. *Bulletin de la Société de Médecine de la Reproduction*, 3, 14-18.
44. Fenichel P., Pointis G (2000) Nouveaux marqueurs séminaux. *Reproduction Humaine et Hormones*, 13, 511-515.
45. Ferguson-Smith MA, Lennox B, Mack WS and Stewart JSS (1957) Klinefelter's syndrome : frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet*, ii, 167.
46. Fishel S, Green S, Bishop M et al (1995) Pregnancy after intracytoplasmic injection of sperm. *Lancet*, 245, 1641-1642.

47. Fishel S., Green S., Hunter A. (1997) Human fertilization with round and elongated sperm. *Hum. Reprod.* 12, 336-340.
48. Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M and Candiani F (1998) Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum. Reprod.* 13, 3090-3093.
49. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A (1998) High incidence of sperm sex chromosome aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 203-205.
50. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A (1999) Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3807-3810.
51. Friedler S., Raziel A., Strassburger D., Soffer Y., Komarowsky D., Ron-El R., (1997a) Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non obstructive azoospermia – a comparative study. *Fertil. Steril.* 68, 892-897.
52. Friedler S., Raziel A., Strassburger D., Soffer Y., Komarowsky D., Ron-El R., (1997b) Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* 12, 1488-1493.
53. Futterweit W (1967) Spermatozoa in seminal fluid of a patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil. Steril.* 18, 492-496.
54. Gil-Salom M., Remohi J, Minguez Y., Rubio C and Pellicer A. (1995) Pregnancy in an azoospermic patient with markedly elevated serum follicle-stimulating hormone levels. *Fertil. Steril.* 64, 1218-1220.
55. Gil-Salom M., Romero J., Minguez Y., Rubio C., Delosantos MJ, Remohi J., Pellicer A. (1996) Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11, 1309-1313.
56. Gil-Salom M., Romero J., Minguez Y. (1998) Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection : a chance of fertility in nonobstructive azoospermia. *J. Urol.* 160, 2063-2067.
57. Girardi S.K., Meinhik A. and Schlegel P.N. (1997) Submicroscopic deletions in the Y-chromosome of infertile men. *Hum. Reprod.* 12, 1635-1641.
58. Ghazzawi IM, Sarrat MG, Taher MR and Khalifah FA (1998) Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic injection. *Hum. Reprod.* 13, 348-352.

59. Gottlieb B, Leivasstaiho H, Beitel LK (1998) The androgen receptor gene mutation database. *Nucleic Acids Res.*, 26, 234-238.
60. Groomer NP, Illingworth P, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather J (1996) Measurements of dimeric inhibin-B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1401-5.
61. Guichaoua MR, Delafontaine D, Noé JB and Luciani JM (1993) L'influence de l'origine chromosomique. *Contracept. Fertil. Sex.*, 21, 113-121.
62. Guttenbach M, Michelmann HW, Hinney B (1997) Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47 XXY Klinefelter's karyotype : a FISH analysis. *Hum. Genet.*, 99, 474-477.
63. Habermann H, Seo R, Cieslak J, et al. (2000) In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.* 5, 955-960.
64. Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, Lessing JB, Yogev L and Yavetz H (1998) Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia - is it necessary? *Hum. Reprod.*, 13, 3081-3085.
65. Heckert L and Griswold MD (1993) Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Prog Horm Res.*, 48, 61-77.
66. Hinev A.L., Andonov M.D., Kozovski I.T. and Markova V.N. (2000) The effects of pentoxifylline on testicular spermatozoa extraction (TESE) cases with totally immotile testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, P-051.
67. Hiert O, Sinnecker GHG, Holterhus PM (1996) The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity. *Am. J. Med. Genet.*, 63, 218-222.
68. Holstein AF (1976) Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia*, 8, 157-165.
69. Hovatta O, Foudila T, Sieberg R (1996) Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozen-thawed testicular biopsy specimen. *Hum. Reprod.*, 11, 2472-2476.
70. Illingworth PJ, Groomer NP, Byrd W, Rainey WE, McNeill AS, Mather JP (1996) Inhibin-B : a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1321-5.

71. Jacobs PA and Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature*, 183, 303-303
72. Jarow J.P. (1991) Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *J. Urol.*, 145, 777-779.
73. Jezek D., Knuth U.A. and Schulze W. (1998) Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum. Reprod.*, 13, 1230-1234.
74. Johnsen S.G. (1970) Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1, 2-25.
75. Jow W.W., Steckel J., Schlegel P. et al. (1993) Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J. Androl.*, 14, 194-198.
76. Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Aksoy S, Tasdemir M, Nuhoglu A, Tasdemir I, Balaban B, Biberoglu K, schoysman R, Nijis M et Vanderzwalmen P (1996) Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 11, 756-760.
77. Kahraman S, Polat G, Samli M (1998) Multiple pregnancies obtained by testicular spermataid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13, 104-110.
78. Kamal A., Fahmy I., Mansour R., Aboulghar M. and Serour G. (2000) Fertilization and pregnancy rates after ICSI using frozen-thawed ejaculated and surgically retrieved spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, O-150.
79. Kessaris DN, Wasserman P., Mellinger BC. (1995) Histopathological and cytological correlation of percutaneous testis biopsy and open testis biopsy in infertile men. *J. Urol.*, 153, 1151-1155.
80. Kim ED, Gilbaugh JH, Patel VR, Turek PJ and Lipschultz (1997) Testis biopsies frequently demonstrate sperm in men with azoospermia and significantly elevated follicle-stimulating hormone levels. *The Journal of Urology*, 157, 144-146.
81. Klinefelter HF, Reifenstein EC and Albright F (1942) Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without a-Leydigism, and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol.*, 2, 615-627.
82. Kolb BA, Stanczyk FZ, Sokol RZ (2000) Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertil. Steril.*, 74, 234-238.

83. Kupker W., Schwinger E., Hiort O., Ludwig M., Nikolettos N., Schlegel P.N. and Dietrich K (1999) Genetics of male fertility : consequences for the clinical work-up. *Hum. Reprod.*, 14 (Suppl. 1), 24-37.
84. Kupker W., Schlegel PN, Al-Hasani S, Fornara P, Johannisson R, Sandmann J, Schill T, Bals-Pratsch M, Ludwig M, Dietrich K (2000) Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 73, 453-458.
85. Lahn B.T. and Page D.C. (1997) Functional coherence of the human Y-chromosome. *Science*, 278, 675-680.
86. Lee JH, Lee DR, Yoon SJ, Chai YG, Roh SI, Yoon HS (1998) Expression of DAZ, DAZL1, and protamine-2 in the testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 827-34.
87. Levin H.S. (1979) Testicular biopsy in the study of male infertility. Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum. Pathol.*, 10, 569-584.
88. Liu J., Tsai Y-L, Katz E., Compton G., Garcia J. E. and Baramki T.A. (1997) Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen-thawed human testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12, 1667-1672.
89. Mc Carrey JR, Kumari M, Alvalhois MJ, Wang A, Zhang P, Marshall F (1996) Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGR-2 gene. *Dev. Genet.*, 19, 321-32.
90. Mallidis C., Baker HW. (1994) Fine needle tissue aspiration biopsy of the testis. *Fertil. Steril.* 61, 367-375.
91. Manning M, Junemann KP and Aiken P (1998) Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet*, 352, 37.
92. Mansour RT, Kamal A, Fahmy I, Tawab N, Serour GI and Aboulghar MA (1997) Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 12, 1974-1979.
93. Martin-du-Pan and Bishop P (1995) Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum. Reprod.*, 10, 1940-1945.
94. Martini E., Geraedts J.P.M., Liebares I. et al. (1996) Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in-situ hybridisation. *Hum. Reprod.*, 11, 1638.
95. Mendoza C. and Tesarik J. (1996) The occurrence and identification of round spermatids in the ejaculate of men with non-obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 66, 826-829.

96. Mercan R, Urman B, Atlas C, Aksoy S, Nuhoglu A, Isiklar A and Balalan B (2000) Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia : percutaneous aspiration versus open biopsy. *Hum. Reprod.* 7, 1548-1551.
97. Miura H, Tsujimura A, Nishimura K. (1998) Susceptibility to idiopathic azoospermia in Japanese men is linked to HLA class I antigen. *J. Urol.* 159, 1939-1941.
98. Mollat-Fabrice M (1997) Spermatozoïdes testiculaires et Fécondation In Vitro (ICSI). *Thèse d'exercice de Médecine, Aix Marseille 2.*
99. Muilhall J.P., Burgess C.M., Cunningham D. et al (1997) The presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non obstructive azoospermia : prevalence and predictive factors. *Urology*, 49, 91-95.
100. Nagy Z. P., Verheyen G., Tournaye H et al. (1997) An improved treatment procedure for testicular biopsy specimens offers more efficient recovery : case series. *Fertil. Steril.*, 68, 376-379.
101. Najmabadi H., Huang V., Yen P. et al. (1996) Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1347.
102. Nielsen J and Wohlet M (1991) Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children : results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum. Genet.*, 70, 81-83.
103. Novero V., Carnus M., Tournaye H., Smitz J., Verheyen G., Joris H., Derde M.P., Van Steirteghem and Devroey P. (1997) Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 12, 59-63.
104. Oates RD, Muilhall J, Burgess C, Cunningham D and Carson R (1997) Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* 12, 734-739.
105. Palermo G, Joris H, Devroey P (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340, 17-18.
106. Paulsen CA, Gordon DL, Carpenter RW (1968) Klinefelter's syndrome and it's variants : a hormonal and chromosomal study. *Recent Prog. Horm. Res.*, 24, 321-363.

119. Schlegel P.N. and Li-Ming Su (1997a) Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.*, 12, 1688-1692.
118. Salzburn A., Benson D.M., Holstein A.F. et al. (1996) A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum. Reprod.*, 11, 752-755.
117. Safran A., Reubimoff B. E., Porat-Katz A. (1998) Assisted reproduction for the treatment of azoospermia. *Hum. Reprod.*, 13 (Suppl. 4), 47-60.
116. Rosenlund B., Westlander G., Wood M., Lundin K., Reisman E., Hillensjo T (1998) Sperm retrieval and fertilization in repeated percutaneous epididymal sperm aspiration. *Hum. Reprod.*, 13, 2805-2807.
115. Ron-El R., Strassburger D., Gelman-Kohan S., Friedler S., Raziel A and Appelman Z (2000) A 47 XXY fetus conceived after ICSI of spermatozoa from a patient with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 15, 1804-1806.
114. Ron-El R., Friedler S., Strassburger D., Komarovsky D., Schachter M and Raziel A. (1999) Birth of a healthy neonate following the intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod.*, 14, 368-370.
113. Romero J., Remohi J., Minguez Y., Rubio C., Pellicer A., Gil-salom M. (1996) Fertilization after intracytoplasmic injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 65, 877-879.
112. Reijo R., Alagappan R.K., Patrizio P. and Page D.C. (1996) Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y-chromosome. *Lancet*, 347, 1290-1293.
111. Reijo R., Lee T.Y., Salo P. et al. (1995) Diverse spermatogenic defects in human caused by Y-chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.*, 10, 383-393.
110. Pryor J.L., Kent-First M., Muallem A. et al. (1997) Microdeletions in the Y-chromosome of infertile men. *N. Engl. J. Med.*, 336, 534-539.
109. Prins G. S., Dolgma R., Studney P. (1999) Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J. Urol.*, 161, 1504-1508.
108. Posiady BT, Woolcott RJ, Stanger JD, Stevenson K (1996) Case report: pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Hum. Reprod.*, 11, 1306-1308.
107. Pierik FH, Vreeburg JTM, Sijnen T (1998) Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 3110-3114.

120. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaminovic N, Veck LL and Rosenwaks Z (1997b) Testicular sperm extraction with intracytoplasmic injection for nonobstructive azoospermia. *Urology*, 49, 435-440.
121. Schlegel P.N. (1999) Testicular sperm extraction : microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum. Reprod.*, 14, 131-135.
122. Schoysman R., Vanderswalmen P., Nijis M. et al. (1993a) Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342, 1237.
123. Schoysman R., Vanderswalmen P., Nijis M. et al. (1993b) Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in vitro fertilization program. *Hum. Reprod.*, 8, 1339-1340.
124. Sharif K., (2000) Reclassification of azoospermia : the time has come ? *Hum. Reprod.*, 15, 237-238.
125. Silber S.J., Van Steirteghem A.C., Nagy Z. et al. (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum.Reprod.*, 10, 148-152.
126. Silber SJ (1996a) Sertoli cell only syndrome. *Hum.Reprod.*, 11, 229.
127. Silber SJ, Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P (1996b) Normal pregnancies resulting from testicular sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.*, 66, 110-117.
128. Silber S.J., Nagy Z., Devroey P., Tournaye H. and Van Steirteghem A.C. (1997a) Distribution of spermatogenesis in the testicle of azoospermic men : the presence or absence of spermatis in the testes of men with germinal failure. *Hum.Reprod.*, 12, 2422-2428.
129. Silber S.J., Nagy Z., Devroey P., Camus M. and Van Steirteghem A.C. (1997b) The effect of female age and ovarian reserve on pregnancy rate in male infertility : treatment of azoospermia with sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.*, 12, 2693-2700.
130. Silva J., Barros A., Oliveira C., Almeida V., Viana P., Ferraz L and Souza M. (2000) Comparative efficacy of different media for in-vitro culture of the male germinal epithelium from secretory azoospermic patients. *Hum. Reprod.*, 15, Abstract Book 1, P-160.
131. Sofakitis NV, Yamamoto Y, Miyagawa I, Mekras G, Moi Y, Toda T (1998) Ooplasmic injection of elongating spermatis for treatment of nonobstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 13, 709-714.

132. Song GJ, Lee H-S, Park Y-S, Lee HJ, Lee HS, Seo JT and Kang IS (2000) Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with nonobstructive azoospermia : usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. *Fertil. Steril.*, 73, 1104-1108.
133. Su L-M, Palermo GD, Goldstein M, Veck LL, Rosenwaks Z and Schlegel PN (1999) Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia : testicular histology can predict success of sperm retrieval. *Journal of Urology*, 161, 112-116.
134. Templeton A, Morris JK, Parslow W (1996) Factors that affect outcome of in-vitro fertilization treatment. *Lancet*, 348, 1402-1406.
135. Tesarik J, Mendoza C, Testart J (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med*, 333, 525.
136. Tesarik J, Rolet F, Brami C. (1996) Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum.Reprod.*, 11, 780-783.
137. Tesarik J, Greco E, Mendoza C (1998a) ROSI, instructions for use : 1997 update. *Hum.Reprod.*, 13, 519-523.
138. Tesarik J, Guido M, Mendoza C and Greco E (1998b) Human spermatogenesis in vitro : respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and sertoli cell apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 4467-4473.
139. Thonneau P, Marchand S, Taliec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988-1989) *Hum.Reprod.*, 6, 811-816.
140. Tiepolo L and Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm., *Hum Genet*, 34, 119-124.
141. Tournaye H, Carnus M, Goossens A. (1995) Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum.Reprod.*, 10, 115-119.
142. Tournaye H.J., Liu J., Nagy Z et al. (1996a) Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular sperm. *Hum. Reprod.*, 11, 127-132.
143. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M and Van Steirteghem A (1996b) Testicular sperm recovery in nine 47 XXY Klinefelter patients. *Hum. Reprod.*, 11, 1644-1649.

144. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem A and Devroey P (1997) Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum. Reprod.*, 12, 80-86.
145. Tres LL and Kierszenbaum AL (1983) Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 3377-3381.
146. Tsai YL, Liu J, Garcia JE, Katz E, Compton G, Baramki TA (1997) Establishment of an optimal hypotonic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypo-osmotic solutions. *Hum. Reprod.*, 12, 1111-1113.
147. Tsigotis M, et Craft I. (1995) Sperm retrieval methods and ICSI for obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 10, 758-760.
148. Turk PJ, Ljung BM, Cha I, Conaghan J (2000) Diagnostic findings from testis fine needle aspiration mapping in obstructed and nonobstructed azoospermic men. *J Urol*, 163, 1709-1716.
149. Van der ven K., Fimmers R., Engels G. (2000) Evidence for major histocompatibility complex-mediated effects on spermatogenesis in humans. *Hum. Reprod.*, 15, 189-196.
150. Vanderzwalmen P, Zech H., Birkenfeld A (1997) Intracytoplasmic injection of spermatozoa retrieved from testicular tissue : influence of testicular pathology, type of selected spermatozoa and oocyte activation. *Hum. Reprod.*, 12, 1203-1213.
151. Vanderzwalmen P, Nijis M, schoysman R, Bertin G, Lejeune B, Vandamme B, Kahraman S, Zech H. (1998) The problems of spermatozoa microinjection in the human : the need for an accurate morphological approach and selective methods for viable and normal cells. *Hum. Reprod.*, 13, 515-519.
152. Vendrely E, Dadoune JP (1984) La biopsie testiculaire. France, SIMEP, 19-22.
153. Verheyen G., De Croo I., Tournaye H., Pleinckx I., Devroey P, Van Steirteghem A. (1995) Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. *Hum. Reprod.*, 10, 2956-2959.
154. Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H and Van Steirteghem AC (1997) Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil. Steril.*, 67, 74-80

155. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M (1999) Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 2496-2501.
156. Westlander G, Hamberger L, Hanson C, et al. (1999) Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 14, 118-122.
157. Wu FC, Edmond P, Raab G, Hunter WM (1981) Endocrine assessment of the subfertile male. *Clin. Endocrinol (Oxf)*, 14, 493-507.
158. Yanagimachi R (1994) Fertility of mammalian spermatozoa : its development and relativity. *Zygote*, 2, 371-372.
159. Yogev L, Gamzu R, Kleiman S, Botchan A, Hauser R and Yavetz H (2000) Evaluation of meiotic impairment of azoospermic men by fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.*, 74, 228-233.
160. Yoshida A, Nakahori Y, Kuroki Y, et al. (1997) Dicentric Y-chromosome in an azoospermic male. *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 709-712.
161. Zech H, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Lejeune B, Duba E. and Schoysman R. (2000) Congenital malformations after intracytoplasmic injection of spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, 969-971.
162. Zöpflgen A, Priem F, Sudhoff F, Jung K, Lenk S, Loening SA, Sinha P (2000) Relationship between semen quality and the seminal plasma components : carnitine, alpha glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum. Reprod.*, 15, 840-845.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

AD et PERMIS D'IMPRIMER

Vo, le Doyen de la Faculté

LE PRÉSIDENT DE LA TURQUE

BON A IMPRIMER N° 307

Pierre CASASNOVAS

Titre de la thèse :

Evaluation des biopsies testiculaires réalisées chez des patients présentant une azoospermie non obstructive

Résumé :

Cette étude rétrospective porte sur les tentatives de FIV-ICSI avec TESE réalisées au CHU de Bordeaux de 1995 à fin 2000 (soit 90 tentatives), dont 52 cas d'azoospermie non obstructive (ANO) et 38 cas d'azoospermie obstructive (AO), et sur les 51 tentatives de FIV-ICSI avec ponction épидидymo-déférentielle (ED) réalisées pendant cette même période. Puis nous avons comparé les résultats obtenus dans le groupe des sujets ANO à ceux obtenus dans le groupe des sujets AO et dans celui des ED, en frais et en congelé. En frais, les taux d'accouchement par biopsie sont respectivement de 8, 16 et 25 % dans les groupes d'ANO, d'AO et ED, le faible taux dans le groupe des ANO étant dû au recueil des spermatozoïdes dans 38.5 % des tentatives. En congelé, les taux d'accouchement par tentative sont respectivement de 0, 20 et 8 %, les faibles taux dans le groupe des sujets ANO étant dû au pourcentage important de spermatozoïdes immobiles injectés (57 % des spermatozoïdes injectés contre 6 % pour les obstructifs), et dans le groupe ED à un pourcentage important de fausses couches (50 %). Nous avons comparé nos résultats à ceux déjà paru dans la littérature. Cette étude montre une relative similitude des résultats en frais, et une discordance des résultats pour les tentatives réalisées en congelé chez les sujets ANO (à nuancer car 8 tentatives seulement).

Parallèlement, nous avons étudié rétrospectivement les facteurs prédictifs de la présence ou de l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires chez les sujets ANO, principalement le volume testiculaire, le taux de FSH et l'histologie du testicule. Nous avons comparé nos résultats à ceux de la littérature. Il apparaît que ces critères, seuls ou en association ne permettent pas de mettre en évidence l'absence de spermatozoïdes intratesticulaires (spermatozoïdes absents dans 62 % des cas de volume testiculaire diminué, dans 67 % des cas de taux de FSH augmenté, dans 79 % des cas d'histologie négative, et dans 80 % des cas associant ces 3 critères) et que d'autres facteurs prédictifs doivent être développés pour permettre une meilleure prise en charge des patients.

Discipline : Biologie médicale, Fécondation In Vitro