

La procréation médicalement assistée avec spermatozoïdes immatures : Impératifs cliniques et techniques chirurgicales

R. SCHOYSMAN, B. LEJEUNE, E. VAN ROSENDAAL, L. SEGAL, P. VANDERZWALMEN, M. NIJS,
B. VANDAMME, G. BERTIN

*Hôpital Van Helmont, Schoysman Infertility Management Foundation (S.I.M.A.F.),
Vilvoorde, Belgique*

RESUME

Les auteurs rapportent les tentatives de micro-insémination de spermatozoïdes dans des programmes TESE au cours desquels il n'était pas possible de recueillir des spermatozoïdes matures. Des spermatozoïdes de divers types ont été utilisés.

La technicité de la micro-insémination est détaillée, de même que les indications du recours à des spermatozoïdes. Les résultats concernent tant des cas d'azoospermie sécrétoire qu'excrétoire.

Mots-Clés : Spermatozoïdes - Tese - Micro-Insémination Ovocytaire.

INTRODUCTION

La fonction épидидymaire a très longtemps été considérée comme indispensable à l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes qui transitent au travers de cet organe.

En un premier temps, la présence indispensable des sécrétions épидидymaires a été mise en doute par les résultats des anastomoses épидидymo-déférentielles qui court-circuitent une partie plus ou moins étendue du transit épидидymaire. Parfois d'ailleurs

le court-circuitage est réalisé si proche du rete testis que pratiquement le canal épидидymaire est entièrement exclu [32]. Par la suite, un nouveau pas a été franchi par Pryor [30] et Temple-Smith [31] lorsqu'ils ont obtenu des fécondations d'ovocytes, dans des programmes de fécondation in vitro, avec des spermatozoïdes épидидymaires collectés dans les épидidymes oblitérés, soit par des séquelles inflammatoires soit par des agénésies congénitales de l'anse épидидymo-déférentielle et du déférent lui-même. Les succès par cette approche étaient en un premier temps fort rares, mais l'introduction des micro-inséminations a bien entendu été appliquée aux spermatozoïdes épидидymaires et ce avec un bénéfice immédiat puisque les taux de fécondations et, dès lors, de grossesses ont triplé.

Cette procédure a été dénommée MESA (Microscopic Epididymal Sperm Aspiration).

Un nouveau progrès fut réalisé par notre équipe lorsque pour la première fois des spermatozoïdes testiculaires furent utilisés pour solutionner des cas dans lesquels l'exploration n'avait pas permis de récolter des spermatozoïdes dans l'épididyme [1, 2]. Cette procédure a rapidement été dénommée TESE (Testicular Sperm Extraction) et a été suivie d'un intérêt immédiat, puisque le nombre d'indications était si important

[3-5]. Elle ne s'est pas seulement limitée à des situations d'azoospermie excrétoire, mais rapidement des cas d'azoospermie sécrétoire ont également pu bénéficier de cette approche.

Etant donné que les cellules qui composent le cycle complet de la spermatogénèse et de la spermiogénèse deviennent haploïdes après la division méiotique [22], il est évident que des spermatides contiennent également 23 chromosomes et que, du moins théoriquement, il devait être possible de réaliser des fertilisations ovocytaires par micro-insémination de spermatides lorsque la spermatogénèse n'était pas complète et n'atteignait pas le stade ultime de spermatozoïde. En 1994, les premiers succès par micro-insémination de spermatozoïdes furent publiés par Vanderzwalmen, Fischel et Tesarik [12-16, 18]. A l'heure actuelle, le nombre de grossesses enregistré par cette approche est encore très faible et dépasse à peine une douzaine de cas. Il n'est pas certain que l'usage de spermatides dans des programmes de fécondation in vitro couplés à ICSI aura un grand avenir. En effet, certains auteurs pensent que lorsqu'on trouve des spermatides dans une biopsie testiculaire, il suffit de faire d'autres prélèvements dans la glande pour trouver des spermatozoïdes mais nous n'avons pas retrouvé cette situation de façon systématique. Il est évident qu'outre les efforts cliniques chez l'humain des travaux de laboratoire sont également fréquemment cités dans littérature [7-10, 19, 20, 24, 26].

SELECTION CLINIQUE DES PATIENTS

D'un point de vue clinique il n'y a pas de situations bien définies dans lesquelles on peut prévoir le degré de développement de la spermatogénèse ni de la spermiogénèse. Si les testicules sont de consistance et de volume normaux, on peut dans l'ensemble s'attendre à une spermatogénèse favorable.

Si l'examen clinique est complété par des examens endocriniens, les taux de FSH se sont avérés très importants, mais ils ne sont plus à ce jour aussi décisifs pour l'évaluation d'une situation andrologique, qu'ils ne l'étaient il y a une dizaine d'années. En effet, la collaboration entre les andrologues et les pathologistes a montré qu'il existe une phagocytose évidente des spermatozoïdes, débutant dans le testicule et continuant dans l'épididyme. Il n'y a actuellement pas de chiffres mathématiques précis, mais - comme nous le verrons plus loin - on peut accepter l'idée que 5 % de la production testiculaire totale est réabsorbé dans le tractus et n'arrive pas dans l'éjaculat. Si la dysfonction testiculaire s'aggrave, au point que la production globale testiculaire est nettement diminuée, la réabsorption est complète et le patient devient azoospermique. Ceci explique la situation de prime abord surprenante qu'il y a toujours un certain degré de spermatogénèse alors que les patients présentent une azoospermie sécrétoire.

En conclusion, d'un point de vue clinique l'examen du contenu scrotal, même combiné avec une investigation hormonale, ne peut offrir une idée précise de la situation andrologique de l'homme azoospermique.

LA BIOPSIE TESTICULAIRE ET LA TECHNIQUE TESE/ICSI

Avant l'introduction des techniques RIA permettant des déterminations précises des hormones gonadotropes, la biopsie testiculaire était un geste inévitable pour la compréhension d'un problème andrologique sévère. Dans les années '60 elle fût progressivement abandonnée et la plupart des andrologues ne la retenaient plus dans la mise au point de leurs cas. Mais, dans les années '80, un nouvel intérêt surgit pour la biopsie testiculaire et ce venant des microchirurgiens andrologiques. En effet, ils désiraient avoir une idée précise sur la

spermatogénèse avant d'entreprendre une reperméabilisation chirurgicale. Divers auteurs ont tenté d'établir une bonne corrélation entre la lecture d'une biopsie testiculaire et le nombre de spermatozoïdes retrouvés dans les éjaculats. L'approche la plus intéressante était celle décrite par Silber et Rodriguez-Rigo qui ont établi une corrélation entre la spermatogénèse et la numération spermatique dans les éjaculats.

Lorsque les approches MESA & TESE ont été introduites dans des programmes de PMA, elles concernaient d'abord des situations excrétoires mais, comme nous l'avons cité précédemment, des situations d'azoospermie sécrétoire ont rapidement été au centre de l'intérêt de cette approche.

Notre groupe a continué à étudier des biopsies testiculaires pendant de très nombreuses années même si les taux de FSH étaient modérément, voire parfois sévèrement, augmentés.

Cinq groupes de situations testiculaires ont été reconnus [21-22]. Ils sont détaillés dans le Tableau 1. Les deux premiers groupes concernent des cas d'azoospermie excrétoire, soit d'emblée évidente et à solutionner par microchirurgie épидидymaire, soit découverte au cours d'explorations scrotales.

Les trois autres groupes appartiennent aux azoospermies sécrétoires et, selon le volume testiculaire et le taux de FSH, les déficiences de la spermatogénèse sont de plus en plus sévères.

Il y a un intérêt pratique lié à cette subdivision des situations testiculaires et cliniques. Etant donné que dans la majorité des cas d'azoospermie excrétoire la spermatogénèse est complète, le prélèvement des spermatozoïdes peut se faire par aspiration à l'aiguille. L'intérêt pour cette approche a débuté il y a à peine quelques années et la prélèvement à l'aiguille a été considéré comme une bonne technique, non seulement pour assurer la présence de spermato-

zoïdes, mais d'aucuns estiment qu'ils peuvent également donner une impression quantitative sur la spermatogénèse.

En ce qui concerne l'azoospermie sécrétoire, le prélèvement à l'aiguille, du moins dans notre expérience, n'a pas été si favorable et nous préférons la biopsie ouverte.

Ceci entraîne immédiatement une autre question : doit-on prélever la biopsie testiculaire avant que le couple entre dans un programme de PMA ou doit on la reporter jusqu'au moment du prélèvement ovocytaire ? Les deux attitudes ont leurs défenseurs. Etant donné le coût d'une tentative de FIVETE, tant les patients que les équipes FIVETE désirent savoir si la tentative peut être tentée. La réponse est pratiquement toujours positive lorsqu'il s'agit d'azoospermie excrétoire. Elle est plus douteuse pour les problèmes sécrétoires. Dans ce dernier groupe, l'hétérogénéité du tissu testiculaire est rapidement apparue évidente. Il est arrivé que des biopsies répétées dans une même exploration montraient l'absence de spermatozoïdes et qu'il fallait jusqu'à cinq-six ou davantage de prélèvements avant que des tubules avec spermatogénèse complète furent localisés. Même lorsqu'il y a une dysfonction testiculaire sévère, où la majorité des tubes ne contiennent que des cellules de Sertoli, il arrive quand-même que certains tubules contiennent des spermatozoïdes qui peuvent être récoltés et utilisés avec succès puisque menant à des fécondations et même à des grossesses.

Notre politique personnelle est dès lors de pratiquer la biopsie au moment du prélèvement ovocytaire chez la partenaire et de la répéter éventuellement sur les deux testicules jusqu'au moment où des spermatozoïdes ou des spermatozoïdes sont collectés. Il s'est cependant avéré plus utile de pratiquer le prélèvement testiculaire la veille du prélèvement ovocytaire, la qualité des spermatozoïdes récoltés étant plus favorable pour la microinsémination.

Nos couples sont cependant informés de ce que dans certains cas il n'est pas possible de trouver des spermatozoïdes ou des spermatides et il leur est laissé le temps nécessaire pour réfléchir à l'éventuelle utilisation de sperme de donneur. Cependant, cette dernière décision est devenue une grande rareté dans notre programme.

LA MANIPULATION DE LA BIOPSIE ET L'IDENTIFICATION DE SPERMATIDES

Une biopsie testiculaire d'environ 4 x 4 mm. est remise au biologiste dans du milieu Hepes. Cette biopsie est dilacérée mécaniquement sous microscope binoculaire jusqu'à l'obtention de tubules isolés. Ceux-ci sont rincés à trois reprises dans du milieu Earle's et placés dans un disque Petri. Leur contenu est obtenu par écrasement entre deux lames de verre et agité pendant 5" avec un vortex [12].

Après nouveau lavage, la suspension cellulaire est centrifugée à 1800 g. pendant 5'. Les cellules récoltées sont placées dans 2 gouttes de 200 µl de solution de Earle's avec 7.5 % de sérum de cordon avant la recherche microscopique de spermatozoïdes. La concentration en spermatozoïdes ou en spermatides peut être si basse que parfois plusieurs heures sont nécessaires pour collecter les cellules nécessaires. Celles-ci sont alors aspirées parmi les globules rouges et les débris, utilisant une pipette de 15 µl et placées dans une goutte de milieu de culture de 5 µl avant de procéder à l'ICSI. Il y a une difficulté pour reconnaître les spermatides des lymphocytes puisque ces deux cellules ont le même diamètre de 8 µm. Dans la spermatide cependant le rapport diamètre de la cellule/diamètre du noyau est tel qu'il reste toujours un espace bien visible entre la membrane extérieure de la cellule et le noyau. Le lymphocyte a un noyau à ce point important qu'il semble constituer pratiquement l'ensemble de la cellule.

En observant la spermatide sous divers angles en contraste de phase, il est assez fréquemment possible d'observer l'appareil de Golgi comme un point plus contrasté, mais n'apparaissant que sous certaines incidences d'observation de la cellule.

Dans certains cas, il n'est guère possible d'avoir la certitude absolue d'aspirer une spermatide, mais avec l'expérience croissante des biologistes les doutes s'amenuisent progressivement dans les programmes traitant ce type de situation.

LA MICROINSEMINATION INTRACYTOPLASMIQUE

Les détails des préparations des micro-instruments pour ICSI ont été décrits par Palermo [28] et van Steirthegeem [29]. Avant l'ICSI, une gouttelette de 5 µl de PVP est placée au centre d'une disquette Petri et entourée par 10 µl de milieu de Earle's avec 7.5 % de sérum du cordon. Avec une pipette d'injection de 7.5 µl les spermatozoïdes ou les spermatides sont transférés l'un après l'autre du milieu Earle's dans la gouttelette PVP. Après immobilisation de l'ovocyte par la pipette de maintien, le globule polaire étant placé à 12 ou 6 heures, la pipette d'injection est poussée au travers de la zone pellucide et l'oolème au niveau équatorial et ce jusqu'à l'autre extrémité du cytoplasme. Une légère aspiration du cytoplasme est réalisée et après injection de la spermatide dans la cellule, la pipette est retirée et l'ovocyte relâché.

Les ovocytes relâchés sont alors lavés quatre fois dans du milieu de Earle's frais toujours avec 7.5 % de sérum de cordon et placés dans quatre puits séparés de disques Nunc recouvert par huile minérale (sigma) et incubé à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ dans de l'air. Ce procédé est donc similaire à celui utilisé pour la microinsemination de spermatozoïdes. Il faut noter qu'étant donné le faible diamètre de la pipette d'injection, l'aspiration de la sper-

matide doit se faire d'une façon très lente. La cellule est comprimée, déformée et prend une forme allongée dans la pipette. Après injection dans le cytoplasme il est difficile de voir si la membrane de la spermatide reste intacte puisque immédiatement après l'injection elle disparaît dans l'ooplasm. Probablement, lors de l'expulsion de la pipette la cellule regonfle pour retrouver sa forme initiale et la membrane est rompue.

Chez l'humain, Vanderzwalmen [12] a obtenu les premières fécondations d'ovocytes par une spermatide allongée. Peu après,

Fischel [13] de son côté a publié une grossesse avec la naissance d'un enfant sain. Tesarik [14] a publié la naissance de deux enfants sains après microinsémination de spermatides, récoltés dans l'éjaculat. Depuis lors, notre groupe a obtenu trois grossesses dont une a avorté et les deux autres ont donné lieu à des enfants sains. Hannay [16] a signalé quatre grossesses qui ont toutes avorté. Antinori rapporte quatre grossesses.

Les trois tableaux suivants résument les détails de nos résultats.

Tableau 1 : Fécondation, clivage et taux de grossesses après injection de spermatides chez des patients azoospermiques présentant une azoospermie sécrétoire ou excrétoire.

AZOOSPERMIE EXCRETOIRE							
	Nombre de cas	Ovocytes	2 PN	1PN	deg	Embryons	Grossesses
	3	25	7(28)	2	0	7	0
AZOOSPERMIE SECRETOIRE							
% Tubules montrant des spermatozoïdes	Nombre de cas	Ovocytes	2 PN	1 PN	deg	Embryons	Grossesses
20 à 50%	7	51	19(37)	8	4	17	2**
< 20%	13	98	29(30)	16	15	24	1*
0%	9***	46	5(11)	10	3	5	0

* Une biochimique ; ** Une née + 1 Grossesse à sept mois ; *** Dans 7 cas sur 9 des cellules rondes étaient présentes ; () pourcentages.

Tableau 2 : Fécondation, clivage et taux de grossesses selon le type de spermatides injectées.

Spermatides	Nombre de cas	Ovocytes	2 PN	1 PN	deg	Embryons	Grossesses
Allongées	2	3	3(100)	0	0	3(100)	0
En voie d'élong.	2	10	6(60)	0	3	6(60)	2
Cell. Rondes	27	207	51(25)	36	19	44(21)	1
Allongées (Sd1,Sd2)			En vois d'élong. (Sc)		Cellules rondes (Sa,Sb1,Sb2)		

Tableau 3 : Taux de fécondation après injection de cellules rondes dans des ovocytes préalablement traités ou non au ionophore calcique.

Ionophore calcique	Nombre de cas	Ovocytes	2 PN	1 PN	deg	Embryons	Grossesses
OUI	6	42	20(50)	10	4	17(85)	1*
NON	21	165	31(19)	26	15	27(87)	0

* Une grossesse en cours.

DISCUSSION

A l'heure actuelle le nombre de succès obtenus avec des spermatozoïdes dans des programmes FIVET/TESE/ICSI est trop faible pour permettre des conclusions valables concernant les nombreuses questions que cette approche soulève. Même l'incidence des fausses-couches n'est pas significative sur des séries aussi courtes. Cependant, quelques problèmes doivent être discutés et surtout le problème du taux de fertilisation bas. Il n'est pas certain que les spermatozoïdes récoltés dans des cas d'azoospermie excrétoire ou sécrétoire donnent les mêmes résultats. Il n'est pas clarifié si le DNA encore instable peut être responsable des fausses-couches apparemment plus nombreuses observées dans les grossesses obtenues.

Le second problème est celui du type cellulaire utilisé pour la microinsémination. La spermiogénèse est un processus biologique de longue durée et qui comprend la succession de spermatozoïdes ronds, suivis par des cellules en voie d'allongement ou bien des cellules allongées. Les dernières modifications morphologiques atteignent le stade de spermatozoïde mûr. Certains auteurs continuent à donner à cette dernière cellule le nom de spermatozoïde. Ce problème de sémantique est important. Il n'est pas justifié d'appeler spermatozoïde des cellules qui sont de toute évidence des spermatozoïdes complets avec un flagelle bien formé, et même un certain degré de motilité, sous prétexte qu'ils sont récoltés dans le testicule et de ne réserver le vocable spermatozoïde qu'aux

cellules qui ont quitté le rete testis et qui se trouvent dans l'épididyme.

A l'heure actuelle, il n'est pas évident que des spermatozoïdes puissent activer les ovocytes puisque, à l'opposé des spermatozoïdes mûrs, elles ne sont pas porteuses du facteur cytosolique d'activation ovocytaire appelé oscilline [23]. Certains auteurs, tels que Sofikidis, ont éliminé cette difficulté en stimulant les ovocytes par pulsions électriques et Tesarik [25] utilise l'ionophore A 23.187. Nous avons repris cette idée pour l'utiliser dans notre travail et, de toute évidence, les fécondations après traitement avec ionophore calcique sont plus favorables (voir Tableau 4).

Enfin, le problème de l'innocuité d'utiliser des spermatozoïdes dans des programmes de PMA reste un sujet de préoccupation. Il faudra plus de travail pour confirmer si l'empreinte génomique est déjà établie dans les spermatozoïdes voire même encore plus tôt au cours de la spermatogénèse. Le travail expérimental sur animaux de laboratoire ne peut nous offrir une sécurité à ce sujet.

Malgré le fait qu'un nombre limité de grossesses a été obtenu dans quelques centres dans le monde, l'approche semble valable dans des situations pathologiques particulières. Un suivi très attentif des grossesses obtenues et des enfants nés est indispensable afin qu'à l'avenir toute inquiétude soit dissipée quant à l'utilisation de ces cellules spermatiques immatures. A ce jour cependant les résultats déjà obtenus montrent que l'usage de spermatozoïdes peut être consi-

déré comme une aide valable pour solutionner les problèmes qui ne peuvent trouver une solution par PMA avec des cellules matures. Si des inquiétudes sont légitimes, elles rejoignent cependant les nombreuses inquiétudes déjà exprimées par le passé dans tous les efforts de traitement d'infertilité de cause andrologique. De la congélation du sperme en banque jusqu'à la fécondation in vitro, les techniques de PMA de plus en plus performantes ont créé des doutes.

Il ne faut cependant pas que le doute mène à l'inaction, tout en restant conscients de ce que la plus grande prudence s'impose pour ceux qui s'engagent dans de nouvelles voies de la PMA.

BIBLIOGRAPHIE

1. SCHOYSMAN R., VANDERZWALMEN P., NIJS M., SEGAL-BERTIN G., GEERTS L., VAN DE CASSEYE M. : Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in vitro fertilization programme (letter). *Hum. Reprod.*, 1993a, 8 : 1339-1340.
2. SCHOYSMAN R., VANDERZWALMEN P., NIJS M., SEGAL L., SEGAL-BERTIN G., GEERTS L., VAN ROOSEDAAL E. : Pregnancy after fertilization with human testicular sperm (letter). *Lancet*, 1993b, 342 : 1237.
3. YEMINI M., SCHOENGOLD S., VANDERZWALMEN P., BIRKENFELD A., MUKAIDA T. : Intracytoplasmic sperm injection, fertilization and embryo transfer after retrieval of spermatozoa by testicular biopsy from an azoospermic male with testicular tubular atrophy. *Fertil. Steril.*, 1999, 63 : 5 : 1118-1120.
4. TOURNAYE H., LIU J., NAGY P.Z., CAMUS M., GOOSSENS A., SILBER S.J., VAN STEIRTEGHEM A., DEVROEY P. : Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1 : 127-132.
5. DEVROEY P., LIU J., NAGY Z., GOOSSENS A., TOURNAYE H., CAMUS M., VAN STEIRTEGHEM A., SILBER S.J. : Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 6 : 1457-1460.
6. EDWARDS R.G., TARIN J.J., DEAN N., HIRSCH A., TAN S.L. : Are spermatid injections into human oocytes now mandatory ? *Hum. Reprod.*, 1994, 9 : 12 : 2217-2219.
7. OGURA A., YANAGIMACHI R., USUI N. : Behaviour of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote*, 1993, 1 : 1-8.
8. OGURA A., YANAGIMACHI R. : Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.*, 1993, 48 : 219-225.
9. OGURA A., MATSUDA J., YANAGIMACHI R. : Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 : 7460-7462.
10. OGURA A., YANAGIMACHI R. : Spermatids as male gametes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, 7 : 165-9.
11. SOFITIKIS N.V., ZAVOS P.M., TODA T., PASYIANOS P., MIYAGAWA I., MASTELOU E. : Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil. Steril.*, 1996, 65 : 1 : 176-185.
12. VANDERZWALMEN P., LEJEUNE B., NIJS M., SEGAL-BERTIN G., VANDAMNE B., SCHOYSMAN R. : Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an in vitro fertilization programme. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 3 : 502-503.
13. FISCHER S. : Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 1995, 245 : 1641-1642.
14. TESARIK J., ROLET F., BRAMI C., SEDBON E., THOREL J., TIBI C., THEBAULT A. : Spermatid injection into human oocytes. II Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 780-783.
15. TESARIK J., MENDOZA C. : Spermatid injection into human oocytes. I Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 4 : 772-779.
16. HANNAY T. : New Japanese IVF method finally made available in Japan. *Nature Med.*, 1995, 1 : 289-290.
17. SILBER S.J., LIU J., VAN STEIRTEGHEM A., TOURNAYE H., NAGY Z., DEVROEY P. : Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.*, 1996, 66 : 1 : 110.
18. SOFITIKIS N., MIYAGAWA I., AGAPITOS E., PASYIANOS P., TODA T., HELLSTROM W.J.G., KAWAMURA H. : Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1994, 11 : 7 : 335-341.

19. GOTO K., KINOSHITA A., NAKANISHI Y., OGAWA K. : Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in vitro derived spermatids into bovine oocytes. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 4 : 824-829.
20. ARIEL M., CEDAR H., MC CARREY J. : Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nature Genetics*, 1994, 7 : 59-63.
21. HOLSTEIN A.F. : Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia*, 1976, 8 (2) : 157-165.
22. CLERMONT Y. : The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Amer. J. Anat.*, 1963, 112 : 35-51.
23. PARRINGTON J., SWANN K., SCHEVCHENKO V. et al. : Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 1996, 379 : 364-368.
24. KIMURA Y., YANAGIMACHI R. : Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 1995, 121 : 2397-2405.
25. TESARIK J., SOUZA M. : More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil. Steril.*, 1995, 63 : 343-349.
26. HEUWIERSER W., YANG X., JIANG S., FOOTE R.H. : Fertilization of bovine oocytes after microsurgical injection of spermatozoa. *Theriogenology*, 1992b, 38 : 1-9.
27. TESARIK J., MENDOZA C. : Genomic imprinting abnormalities : a new potential risk of assisted reproduction. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2 : 5 : 295-298.
28. PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A. : Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340, 17.
29. VAN STEIRTEGHEM A., LIU J., JORIS H., NAGY Z., JANSSENSWILLEN C., TOURNAYE H. et al. : High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1993, 8 : 1061-1066.
30. PRYOR J. : Surgical retrieval of epididymal spermatozoa. *Lancet*, 1987, 2 : 1341.
31. TEMPLE-SMITH P.D. et al. : Human pregnancy by in vitro fertilization using sperm aspirated from the epididymis. *J. In Vitro Fert. and Embryo Transfer*, 1985, 2 : 119.
32. SCHOYSMAN R. : Microsurgery of male infertility. *Fondazione per gli studi sulla riproduzione umana*, Palermo, 1994.

ABSTRACT

Immature sperm conception : Clinical imperatives and surgical practices

R. SCHOYSMAN, B. LEJEUNE, E. VAN ROOSENDAAL ET AL.

The authors report their experience with the use of spermatids in TESE programs where mature spermatozoa could not be isolated from testicular biopsies. The details of the indications for spermatid insemination, the technique of the procedure and the results are exposed.

Key Words : *Spermatids - Tese - Ovocyte Micro-Insemination.*