

# LA FECONDATION IN VITRO AVEC DES SPERMATOZOÏDES PRÉLEVÉS DANS L'ÉPIDIDYME

J.F. Guérin

Département de Gynécologie, Oncologie gynécologie, Sénologie, Médecine de la Reproduction

Pavillon L - Hôpital Edouard Herriot - 69437 LYON CEDEX 03

## IN VITRO FERTILIZATION USING EPIDIDYMAL SPERMATOZOA.

In-vitro fertilization (IVF) using spermatozoa aspirated from the epididymis can be considered in cases of congenital or acquired epididymal obstruction. In these particular conditions sperm maturation seems to occur earlier than in the normal physiological situation. In this way we have obtained two twin, term pregnancies using spermatozoa from the caput epididymis in cases with congenital absence of the vasa deferentia. Sperm preparation on mini-Percoll gradients gave the best results, although post-treatment sperm motility was of no predictive value for the clinical outcome.

**Key words :** Epididymal spermatozoa, sperm maturation, IVF, obstructive azoospermia, congenital absence of the vas. **Andrologie, 1992, 2 : 14-15.**

La première grossesse obtenue par FIV à partir de spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme a été rapportée en 1985 par TEMPLE-SMITH (10). Il s'agissait d'un patient vasectomisé, les spermatozoïdes ayant été ponctionnés au niveau du corps, et mobiles à 75 %. Ce succès avait suscité beaucoup d'espoirs chez les hommes présentant une azoospermie d'origine excrétoire, puisqu'ils pouvaient en théorie devenir pères même si une anastomose ne pouvait être réalisée, ou avait été tentée sans succès. Ce n'est pourtant que deux ans plus tard (en 1987) que 2 nouvelles grossesses ont été publiées par Silber et coll (8) à partir de spermatozoïdes originaires de la partie la plus proximale de la tête épididymaire, chez deux patients porteurs d'une agénésie déférentielle. Ces résultats ont été confirmés en 1990 sur une plus grande série de 20 tentatives (9). L'agénésie épididymo-déférentielle constituerait-elle donc une situation particulière, dans laquelle la maturation des spermatozoïdes s'effectue plus précocement que dans des situations physiologiques, ou d'obstruction acquise des voies excrétrices ? Il semble qu'on puisse répondre par la négative, puisque les réalisations d'anastomoses entre les cones efférents et le canal déférent ont permis à Silber d'obtenir des grossesses chez deux patients vasectomisés. D'autre part, les résultats d'une enquête effectuée auprès des biologistes appartenant à 18 centres de FIV (BLEFCO) et concernant près de 200 tentatives, ont montré qu'il n'y avait pas de différence

significative, concernant à la fois le taux d'obtention d'embryons et le taux de grossesse, selon que l'obstruction était d'origine congénitale ou acquise.

## PROBLEME DU NIVEAU DE L'ÉPIDIDYME A PARTIR DUQUEL ON PEUT OBTENIR DES SPERMATOZOÏDES FECONDANTS

Deux questions se posent :

1 - Dans l'espèce humaine, la maturation des spermatozoïdes a-t-elle lieu beaucoup plus précocement que dans toutes les autres espèces ?

2 - Même si l'épididyme est embryologiquement normal et complet sur le plan anatomique, est-il préférable de prélever et utiliser des spermatozoïdes dans la tête plutôt que dans des régions situées plus en aval ? Nous allons tenter de préciser ces questions à partir d'une étude personnelle effectuée en collaboration avec M. Cognat (2), et portant sur 14 cas d'agénésie déférentielle. Nos résultats montrent à l'évidence que c'est avec des spermatozoïdes ponctionnés dans la tête de l'épididyme, que nous avons obtenu les meilleurs résultats en termes de fécondation et de transferts réalisables (Tableau 1), ainsi que nos deux grossesses ayant abouti à deux naissances de 2 jumeaux.

**Tableau 1 :** Relations entre le pouvoir fécondant des spermatozoïdes et leur niveau de ponction dans l'épididyme.

Origine des spermatozoïdes	Succès de fécondation/tentative	Embryons /ovocytes
Tête isolée	3/4*	15/38
Ensemble de l'organe	4/10	10/120
TOTAL	7/14	25/158

\* 2 accouchements de jumeaux

**Tableau 2 :** Relation entre la capacité fécondante et la mobilité des spermatozoïdes (spz) épididymaires.

	N	Mobilité initiale	Mobilité après traitement des spz	Nbre de spz mobiles inséminés
Echec de fécondation	7	10 % (5-30 %)	20 % (5-30 %)	115000 (30-250 x 10 <sup>6</sup> )
Fécondation sans grossesse	5	20 % (5-30 %)	30 % (10-60 %)	110000 (100-120 x 10 <sup>6</sup> )
Grossesse (Accouch.)	2	15 % (5 et 20 %)	20 % (10 % et 30 %)	85000 (80 et 90 x 10 <sup>6</sup> )

## LA MOBILITE DES SPERMATOZOÏDES PONCTIONNÉS DANS L'ÉPIDIDYME PERMET-ELLE DE PREDIRE CORRECTEMENT LE SUCCES DE LA FIV ?

Les données du tableau 2 permettent de répondre par la négative, au moins pour ce qui concerne notre échantillon. Comme on peut le constater, il n'y avait pas de différence entre les groupes constitués respectivement par les échecs

et les succès de fécondation, concernant aussi bien la mobilité initiale que le nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés.

## COMMENT TRAITER LES SPERMATOZOÏDES PONCTIONNÉS DANS L'ÉPIDIDYME ?

### Position du problème

Le traitement des spermatozoïdes ponctionnés dans le canal épididymaire est délicat à bien des égards :

- D'une part, le nombre de spermatozoïdes recueillis est en général très faible, et ces cellules ont une mobilité médiocre et peu progressive, surtout initialement. Il apparaît donc illusoire d'appliquer certaines techniques de sélection comme la migration ascendante (contre la pesanteur), qui aboutirait certainement à un recueil insuffisant de gamètes mobiles. D'autre part la contamination par des cellules sanguines des prélèvements constitue la règle générale, au moins pour ce qui concerne les hématies. Les leucocytes et macrophages peuvent être absents en cas d'agénésie déférentielle, mais ils sont généralement présents en quantité importante lorsqu'il s'agit d'une obstruction acquise, conséquence d'une pathologie inflammatoire. Cette dernière situation apparaît donc immédiatement encore plus délicate et de moins bon pronostic théorique que la précédente.

- Le fait de recueillir, en réunissant les différents prélèvements, souvent moins de spermatozoïdes que de cellules sanguines, augmente considérablement la difficulté du traitement. Il apparaît licite de proposer une centrifugation sur gradient de Percoll discontinu, technique qui a prouvé son efficacité, dans les fécondations in vitro (FIV) avec indication masculine (4), ou pour éliminer les leucocytes et les germes contenus dans le plasma séminal. Toutefois, l'utilisation d'un gradient "classique" à 6 couches s'étalant de 40 % à 100 % a été souvent décevante, les spermatozoïdes étant arrêtés, dans leur migration passive due à la centrifugation, par un tapis d'hématies qui se positionne vers le fond du gradient.

- Enfin, une dernière difficulté apparaît, de nature non plus technique mais physiologique: il est admis pour tous les mammifères - l'homme ne devant pas faire exception - que c'est au cours du transit épididymaire que les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant, c'est à dire qu'ils subissent une maturation, qui s'effectuerait généralement dans la région du corps (1,3). Aussi peut-on logiquement penser que des spermato-

zoïdes prélevés en amont dans cette région (dans la tête et le corps proximal) seront incapables de féconder des ovocytes à moins de subir une maturation in vitro. Cependant celle-ci n'est pas évidente à réaliser, les mécanismes responsables de la maturation intra épидидymaire étant extrêmement complexes.

### Choix des techniques

(1) *Méthodes physiques de séparation* : Nous avons d'emblée éliminé la technique de migration ascendante car toutes nos tentatives se sont soldées par un échec. Antérieurement au développement de la technique "Percoll" dans notre laboratoire, nous avons effectué les 2 premières tentatives en laissant sédimenter les cellules sanguines au fond du tube, et secondairement les spermatozoïdes immobiles. Nous avons ensuite utilisé la technique sur gradient discontinu de Percoll décrite antérieurement (4). Les 6 dernières tentatives ont été effectuées en simplifiant la technique dans le sens d'une réduction du nombre de couches (de 6 à 2) du gradient (5). Il s'agit d'un gradient simplifié à 40 %-70 % de Percoll. Après centrifugation à 300 g pendant 20 minutes, la fraction 70 % (correspondant à 1 ml au fond du tube) est récupérée, diluée avec du Ham's F 10 (1v/4v), puis centrifugée à 400 g pendant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans 0,5 ml de milieu B2-Menezo. A l'évidence c'est cette dernière technique qui nous a donné les meilleurs résultats, et que nous utilisons maintenant systématiquement. Nous avons récemment commencé à utiliser un gradient à 3 couches (40 % - 60 % - 80 %), dont nous sommes également satisfaits. Nos 2 grossesses ont été obtenues chacune avec 80000 spermatozoïdes mobiles inséminés, sans qu'un traitement particulier ait été mis en oeuvre pour tenter de mûrir in vitro ces spermatozoïdes. Or, c'est dans la tête de l'épididyme que les spermatozoïdes avaient été à chaque fois ponctionnés, car l'agénésie concernait non seulement le canal déférent, mais aussi la portion distale (queue) de l'épididyme.

(2) *Adjonction d'agents pharmacologiques* : Des substances élevant le taux d'AMP cyclique intra cellulaire paraissent bien indiquées dans ce contexte, puisque cette élévation constitue un des premiers signes de la maturation des spermatozoïdes épидидymaires chez de nombreux mammifères. Parmi toutes les substances essayées, c'est la pentoxyfilline qui paraît donner les résultats les plus prometteurs, mais ceux-ci doivent être confirmés sur des séries plus importantes. Ainsi, une étude récente (7) a montré qu'une pré-incubation des spermatozoïdes avec de la pentoxyfilline (3 mM, 30 min) puis de la 2 desoxyadénosine (2 mM, 30 min) ne permettait pas de réduire le taux d'échec de fécondation, c'est à dire d'augmenter le nombre de femmes bénéficiant d'un transfert. En revanche, pour les cas où un transfert a été possible, le taux de fécondation s'élevait de 25 % à 61 % !

## LES TECHNIQUES DE "FÉCONDATION ASSISTÉE", COMME L'INSEMINATION SOUS LA ZONA (SUZI), PRÉSENTENT-ELLES UN INTERET DANS CE CONTEXTE ?

Elles présentent un intérêt théorique compte tenu du faible pourcentage de spermatozoïdes mobiles recueillis. Cependant, elles ne permettront pas de "récupérer" un défaut de maturation (en relation avec la fonction fusiogène). On ne peut encore se faire une idée précise de leur intérêt réel, dans la mesure où on ne dispose encore actuellement dans la littérature d'aucun travail comparatif sérieux.

### CONCLUSIONS

Nos résultats montrent qu'on peut obtenir des grossesses en réalisant une FIV avec des spermatozoïdes prélevés dans la tête de l'épididyme, en cas d'agénésie déférentielle, sans qu'il soit nécessaire de tenter une maturation in vitro. Ce résultat confirme des travaux récents (8,9), mais apparaît en contradiction avec les données concernant la physiologie de l'épididyme chez les mammifères (1,3). Nous avons vérifié que dans un épидидyme humain sain, les spermatozoïdes sont pratiquement tous immobiles dans la région de la tête (6). L'agénésie déférentielle constitue donc une situation clinique intéressante, où les spermatozoïdes paraissent avoir subi une maturation "raccourcie", puisqu'ils sont mobiles dans la tête épидидymaire.

Le traitement de ces gamètes reste néanmoins délicat, et notre étude démontre clairement la supériorité de la technique de centrifugation sur gradient de Percoll simplifié, par rapport à toutes les autres méthodes essayées dans notre laboratoire. L'adjonction d'agents pharmacologiques, comme la pentoxyfilline, paraît logique et prometteuse, mais des études comparatives rigoureuses doivent être poursuivies pour permettre d'affirmer leur intérêt. Il en est de même pour les techniques récentes de fécondation assistée. Les données préliminaires d'une enquête multicentrique montrent que les résultats sont sensiblement identiques, que l'origine de l'obstruction soit congénitale ou acquise. Ces données nous amènent néanmoins à tempérer l'optimisme qui avait succédé aux premières publications américaines: un transfert n'a été possible que dans 1 cas sur 4 en moyenne, et les taux de grossesse par ponction sont autour de 5 %. Dans notre expérience, il apparaît clairement que dans certains cas, les spermatozoïdes sont immatures et donc inféconds en dépit d'une mobilité acceptable. Dans ces situations, il nous apparaît encore illusoire de pouvoir rendre ces gamètes matures par un artifice quelconque.

### REFERENCES

- 1 - Bedford JM, Calvin H, Cooper GW : The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertil, 1973, Suppl 18 : 199-213.
- 2 - Cognat M, Czyba JC, Guérin JF, Mathieu C, Pinatel MC. : Grossesses obtenues par féconda-

tion in vitro avec sperme épидидymaire. Andrologie, 1991, 1 : 20-21.

- 3 - Cooper TG. : In defense of a function for the human epididymis. Fertil Steril, 1990, 54: 965-75.
- 4 - Guérin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. : Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection or discontinuous Percoll gradients. Hum Reprod, 1989, 4: 798-804.
- 5 - Mathieu C, Mein M, Lornage J, Li JG, Guérin JF. : Effect of spermatozoa selection on a simplified percoll gradient in case of asthenozoospermia. Andrologia, 1990, 22: 467-471.
- 6 - Mathieu C, Guérin JF, Cognat M, Lejeune H, Pinatel MC, Lornage J. : Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. Fertil. Steril, 1992, sous presse.
- 7 - Ord T, Patrizio P, Sibley SJ, Jones G, Marelllo E, Asch RH. : A new technique for sperm preparation in cases of epididymal aspiration. Fertil Steril, Abstracts of the 47 th annual meeting of the American Fertility Society, 1991, O-067, 29-30.
- 8 - Silber SJ, Ord T, Borrero C, Balmaceda J, Asch R. : New treatment for infertility due to congenital absence of vas deferens. Lancet, 1987, 2 : 850-851.
- 9 - Silber S, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Asch R. Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. N Engl J Med, 1990, 323 : 1788-1792.
- 10 - Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM : Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. J In Vitro Embryo Transfer 1985, 2: 119-122.

**RESUME** : Des FIV avec des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme peuvent être proposées dans des situations d'obstruction congénitale ou acquise de l'épididyme. Dans ce contexte particulier, la maturation des spermatozoïdes paraît s'effectuer plus précocement que dans une situation physiologique. Ainsi, nous avons pu obtenir 2 grossesses gémellaires menées à terme avec des spermatozoïdes prélevés dans la tête de l'épididyme, dans des cas d'agénésie du déférent. Le traitement des spermatozoïdes sur mini gradient de Percoll nous a donné les meilleurs résultats. Néanmoins, la mobilité des spermatozoïdes après traitement, ne constituerait pas une bonne valeur prédictive de l'issue de la tentative. **Mots clés** : spermatozoïdes épидидymaires, maturation, FIV, azoospermie excrétoire, agénésie du déférent. **Andrologie, 1992, 2 : 14-15.**