

# INTERET DE LA MICROINJECTION DE SPERMATOZOÏDES SOUS LA ZONE PELLUCIDE POUR LE TRAITEMENT DE CERTAINES STÉRILITÉS MASCULINES

Jean-Philippe Wolf, Jean-Marie Kunzmann, Danielle Feneux, André Hazout\*, Medhat Amer, René Frydman\*, Pierre Jouannet.

Laboratoire de Biologie de la Reproduction et du Développement, Histologie, Embryologie, Cytogénétique.

Hôpital Bicêtre, 78, rue du Général Leclerc 94275 Le Kremlin Bicêtre.

\* Hôpital A. Bécclère, 157, rue de la Porte de Trivaux, Clamart 92141.

## SUB-ZONAL SPERM MICROINJECTION AS A TREATMENT FOR CERTAIN TYPES OF MALE FACTOR INFERTILITY.

Subzonal insemination (SUZI) was evaluated, in a randomized prospective study, as a treatment for certain specific types of male factor infertility. Patients were classified according to the results of an extensive semen analysis as being either IVF failure with either normal or subnormal semen quality, specific (e.g. absent outer dynein arms) or non-specific flagellar dyskinesia, or oligoasthenoteratozoospermia. SUZI was found to be an efficient technique for achieving fertilization and pregnancy for all these indications, while there was a total failure of fertilization in the control, in-vitro inseminated oocytes. A total of 395 oocytes were microinjected and 133 fertilized, among which 75 (19 % overall) were diploid. More than 81 % of these zygotes cleaved normally, and 31 embryo transfers resulted in seven pregnancies. However, results varied widely between the various indications, suggesting that the underlying pathology responsible for the sterility may influence gamete interaction and early embryonic development independently of the SUZI technique. **Key words** : Male infertility, subzonal insemination, IVF failure, absent dynein arms, oligoasthenoteratozoospermia failed fertilization ? **Andrologie**, 1992, 2, 16-18.

Les techniques de microfécondation ouvrent de nouvelles possibilités dans le traitement des stérilités masculines (1, 8, 10, 12). Elles sont destinées aux hommes dont les qualités spermatozoïdiques ne leur permettent pas d'accéder à la paternité, ni naturellement, ni par les techniques habituelles de PMA lorsque celles-ci ont pu être indiquées. Les anomalies spermatozoïdiques sont regroupées sous le terme de "facteurs masculins de la stérilité" mais recouvrent en fait une multitude de pathologies qui doivent être analysées séparément. Elles relèvent de physiopathologies différentes et nécessitent des traitements particuliers.

Notre abord des techniques de microfécondation répond au double souci :

- de s'assurer de l'intérêt de la méthode pour le traitement des stérilités en la comparant aux techniques existantes (FIV) au cours d'une étude prospective randomisée, et pour chaque pathologie considérée,

- et surtout d'étudier les résultats par indication après qu'un diagnostic aussi précis que possible de l'anomalie spermatozoïdique probablement responsable de la stérilité ait été fait.

## PATIENTS ET METHODES

### Bilan spermatozoïdique

Les patients qui sont adressés pour échecs de FIV ont dans un premier temps un bilan spermatozoïdique. Il comprend un spermogramme avec spermocytogramme, un test de migration dans la glaire soit in-vitro, soit par le test post-coital, une recherche d'anticorps antispermatozoïdes ainsi qu'une analyse du mouvement réalisée sur HTM 2030 (Hamilton Thorn). Ce bilan est complété par un test de migration sur Percoll qui permet de préciser la quantité de spermatozoïdes mobiles susceptibles d'être recueillie par ce procédé. Si cette quantité est suffisante ( $2,5 \times 10^6$  spermatozoïdes mobiles après une incubation de 24 heures), le bilan pourra être complété par un test de la fonction fusiogène par l'étude de la pénétration des spermatozoïdes dans des ovocytes dépelucidés de hamster. Une étude en microscopie électronique est effectuée si une dyskinesie d'origine structurale est suspectée ou si la morphologie de la tête spermatozoïdique est particulièrement perturbée.

Pour les patients présentant une stérilité pour laquelle une FIV n'est même pas envisageable, le bilan est moins systématisé. Il tend à préciser la

pathologie responsable et à évaluer les possibilités de traitement. Il comprend au moins un test de migration sur Percoll et une évaluation de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés.

### Indications des méthodes de microfécondation

Parmi les échecs de FIV, le bilan permet de dégager deux indications de microinjection. Les patients pour qui tous les paramètres sont normaux. Ils constituent le groupe des microinjections pour échecs de FIV à sperme normal (MIN). Le second groupe est constitué par des patients qui ont un ou plusieurs paramètres du spermogramme modérément altéré(s), c'est à dire avec moins de  $40 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml et/ou moins de 40 % de formes mobiles et/ou moins de 40 % de formes typiques (MISA). La distinction de ces deux groupes est importante car les taux de fécondation y sont très différents.

À côté de ces indications d'échecs de FIV nous avons étudié l'intérêt des microfécondations pour les dyskinesies flagellaires. Ces dyskinesies sont caractérisées par le fait que le spermogramme est normal ou subnormal, que le pourcentage de formes mobiles est satisfaisant mais que le sperme ne pénètre pas ou peu la glaire cervicale en l'absence de toute immunisation antispermatozoïde. L'analyse du mouvement spermatozoïdique sur Hamilton permet alors de confirmer l'anomalie. On retrouve soit des anomalies non spécifiques avec des valeurs de la vitesse de progression linéaire et du débattement latéral de la tête en dehors des valeurs normales, soit des anomalies spécifiques (tableau 1). L'analyse de la structure en microscopie électronique permet alors de préciser certains diagnostics. Nous avons ainsi individualisé les absences de bras externe de dynéine (MIBE) et les dyskinesies périaxonémales (MIDF) dans un premier temps (3, 4, 9). Il

Tableau 1 : Caractérisation structurale des dyskinesies flagellaires.

Dyskinesie	Test de pénétration dans la glaire	Anomalie structurale	Hamster test	Mouvement spermatozoïdique
Aucune	Pénétration et mobilité	Aucune	<80 %	
Absence de bras externes de dynéine	retardée	Absence de bras externes de dynéine	40 %	Vp diminuée
Glissant spermatozoa	pas de pénétration	Unique colonne longitudinale	<10 %	Ah diminuée courbure anormale
Non-structurale	pénétration et immobilisation	Aucune	20 %	Ah diminuée Augmentation de la fréquence des battements

est évident que le nombre des anomalies que nous serons amenés à traiter risque d'augmenter et de se préciser. Les spermatozoïdes glissants et les flagelles courts en sont deux exemples (4).

Dans tous ces cas et pour ce qui concerne la première partie de l'étude randomisée, nous avons sélectionné des patients dont les résultats du test de hamster était soit supérieur à 40 % pour les MIN et MISA et au moins positif pour les MIBE et MIDF.

Enfin nous venons de commencer l'étude de la microinjection chez les patients présentant une oligoasthénospermie sévère. Nous désignons ainsi les patients qui ont moins de  $3 \times 10^6$  spermatozoïdes mobiles par ml dans l'éjaculat. Les techniques d'insémination en microgoutte permettent de traiter en FIV simple ces patients. Ne seront donc pris dans le cadre d'une microinjection que les patients pour lesquels le test de migration sur Percoll n'aura permis de recueillir que moins de 500 spermatozoïdes mobiles par  $\mu$ l. Entreront également dans ce programme les patients ayant eu des échecs au cours de tentatives de FIV indiquées pour OAT. La tératospermie est peu considérée par ces critères d'inclusions. Les anomalies flagellaires responsables d'une baisse de la mobilité spermatique sont seulement indirectement prises en compte. C'est pourquoi pour des anomalies de l'acrosome supérieures à 60 % sur le sperme migré, nous souhaitons avoir en plus un test de fécondance positif. Bien sûr il est par définition difficile d'obtenir un test de hamster pour ces patients très oligospermes et c'est pourquoi nous travaillons à la réalisation d'un test de fécondance à partir de microquantité de spermatozoïdes.

### Réalisation de la microinjection

Parmi les techniques de microfécondation existantes (7), nous avons choisi d'étudier la microinjection de spermatozoïdes sous la zone pellucide appelée SUZI, pour subzonal insemination. Cette technique consiste à percer la zone pellucide avec une micropipette de 8  $\mu$ m de diamètre externe contenant des spermatozoïdes mobiles qui auront été prélevés sous microscope parmi les spermatozoïdes sélectionnés. Le nombre de spermatozoïdes désirés est alors injecté dans l'espace périvitellin. Une solution de sucrose 0.1M est employée pour contracter l'ovocyte ce qui rend la technique très peu traumatisante. L'orifice laissé dans la zone pellucide par la pipette est très petit et s'il ne se cicatrise pas vraiment, du moins est-il facilement collabé. Cette technique permet d'éviter les éventuels effets secondaires liés à la persistance d'une large solution de continuité comme c'est le cas après dissection de la zone pellucide (2).

Tableau 2 : Paramètres spermatiques des spermés normaux et subnormaux

Indication	N (10 <sup>6</sup> /ml)	Mobilité (%)	Formes Typiques (%)	Acrosome malformé (%)	Test du* hamster (%)
MIN	91.4 ± 35.7	47.7 ± 8.0	50.5 ± 6.9	24.7 ± 8.9	73.1 ± 30.7
MISA	36.4 ± 25.7a	39.3 ± 12.3b	30.7 ± 11.9	47.5 ± 18.8a	47.7 ± 20.0c

MIN : patients à sperme normal. MISA : patients à sperme subnormal. Ces résultats représentent les moyennes ± SEM d'au moins trois examens sauf pour le test de fécondance du hamster.

\* Pourcentage d'ovocytes de hamster présentant des têtes décondensées.

(a) p = 0.001 ; (b) p = 0.26 ; (c) p = 0.051.

Les spermatozoïdes sont recueillis la veille de la microinjection et sélectionnés sur un gradient de Percoll présentant deux niveaux de densité (95 et 47,5 %). Ils sont ensuite incubés dans du B2 à la température de la pièce pendant 18 heures environ.

Les ovocytes sont recueillis par ponction transvaginale après qu'une stimulation semblable à celles effectuées pour les cycles de FIV ait été menée (6). Les protocoles de stimulation associent les agonistes du GnRH ainsi que des gonadotrophines en protocoles longs, le plus souvent. Les stimulations ont été effectuées dans le service du Pr R. Frydman à l'hôpital A. Béclère. Les ovocytes sont transportés à l'hôpital du Kremlin Bicêtre dans une enceinte thermostatée à 37° C. Dès leur réception au laboratoire ils sont individualisés dans des gouttes de B2 puis décoronés dans de la hyaluronidase 0.1%.

La microinjection elle-même se fait sous une hotte à flux laminaire à l'aide d'un microscope inversé et de deux micromanipulateurs Narishige qui permettent de déplacer dans le champ optique des micropipettes reliées à des microinjecteurs. Une des pipettes sert à la contention de l'ovocyte, l'autre à la microinjection proprement dit. La manipulation totale pour un expérimentateur entraîné prend moins de 5 minutes par ovocyte. Les ovocytes microinjectés ou inséminés sont réexaminés après 16 à 18 heures. Sont considérés comme normalement fécondés ceux qui présentent deux pronucléi dans cette fourchette horaire (11). Ces zygotes sont conservés en culture pendant 24 heures supplémentaires. Ne sont alors transférés ou congelés que ceux qui ont clivé.

Tableau 3 : Résultats de la micro-injection selon l'indication.

Indication	Patients	Tentatives	ovocytes $\mu$ injectés	ovocytes fécondés	zygotes diploïdes	zygotes clivés	transfert n =	grossesses n =	fausses couches n =
Total	34	50	395	133 (33,7)	75 (19,0)	(81,4 %)	31	7	2
MIN	9	16	129	54 (43,5)	26 (21,0)	(69,2)	9	1	1
MISA	11	15	104	20 (19,8)	13 (12,5)	(92,3)	8	2	
MIBE	6	9	88	36 (41,0)	21 (25,0)	(87,5)	7	2	1
MIDF	3	4	19	15 (78,9)	9 (47,4)	(77,8)	3	1	
MIOAT	5	6	55	8 (14,5)	6 (10,9)	(100)	4	1	

MIN : microinjection pour échec de FIV à sperme normal

MIBE : microinjection pour dyskinésie flagellaire :

absence de bras externes de dynéine

MISA : microinjection pour échec de FIV à sperme subnormal

MIDF : microinjection pour dyskinésie flagellaire périaxonéale

MIOAT : microinjection pour oligoasthénotéraspermie

## RESULTATS

### MIN et MISA

Les paramètres spermatiques de ces deux indications ont été comparés. C'est le taux d'anomalies de l'acrosome (Tableau 2) qui passe de 27,4 ± 8,9 % à 47,5 ± 18,8 % (p < 0.001, qui les distingue le plus. Les cinq premiers patients du groupe MIN ont eu 40 ovocytes répartis en deux groupes de 20 pour la microinjection et l'insémination contrôlée. Dix parmi les ovocytes microinjectés ont été fécondés dont 4 étaient polyspermiques. Il n'y a pas eu de fécondation dans le groupe des ovocytes inséminés. En ce qui concerne le groupe MISA, sur les 30 ovocytes micro-injectés, 4 ont été fécondés sans polyspermie. Parmi les 28 inséminés, il n'y a, là non plus, pas eu de fécondation. Les micro-injections avaient été faites avec le même nombre de spermatozoïdes. Deux remarques s'imposent: alors que 50 % des ovocytes micro-injectés avec des spermatozoïdes provenant d'un sperme normal ont été fécondés, ce pourcentage est tombé à 13,3 % quand le sperme était sub-normal. Alors que la polyspermie était présente pour 40 % des ovocytes fécondés dans le groupe dont les patients avaient un sperme normal. Il n'y avait pas de polyspermie dans le groupe des spermés sub-normaux. Les résultats globaux de ces indications sont détaillés dans le tableau 3.

### MIBE

Une première série randomisée a concerné 5 patients présentant une absence de bras externes de dynéine. 54 ovocytes ont été recueillis dont 31 ont été micro-injectés et 23 inséminés. Parmi les ovocytes micro-injectés, 5 ont été fécondés avec une fécondation normale diploïde. Aucune fécondation n'a eu lieu parmi les ovocytes inséminés.

Au cours d'une deuxième série dans laquelle 4 patients sont venus pour des tentatives itératives, nous avons pu adapter le nombre des spermatozoïdes micro-injectés en fonction des données de la première tentative. Parmi les 57 ovocytes micro-injectés, 31 ont fécondé dont 15 étaient polyspermiqes. Le taux de fécondation diploïde était donc de 28,1 %.

#### MIDF

Cette indication regroupe seulement 3 patients pour lesquels 4 tentatives ont été effectuées. Sur les 19 ovocytes micro-injectés, le taux de fécondation était de 78,9 %. 40 % de ces ovocytes étaient polyspermiqes.

#### MIOAT

Parmi les cas de microinjection pour OAT, il n'y a eu que 5 patients et 6 tentatives. Sur les 55 ovocytes, 8 seulement ont été fécondés dont 6 étaient diploïdes, soit 10,9 % des ovocytes micro-injectés.

Au total, pour ces indications, 34 patients ont eu 50 cycles de micro-injection dont 18 ont eu les ovocytes divisés en deux groupes pour une insémination contrôlée qui n'a, elle, jamais donné de fécondation. 395 ovocytes ont été micro-injectés. 133 ont été fécondés soit un pourcentage de 33,7 % et 75 ont présenté une fécondation normale, soit 19,0 % des ovocytes micro-injectés. Ces pourcentages globaux de fécondation recourent des disparités importantes puisque les taux de fécondation pour les différentes indications étaient de 43,5 % pour les MIN, de 19,8 % pour les MISA, de 41,0 % pour les MIBE, de 78,9 % pour les MIDF et de 14,5 % pour les MIOAT.

Il y avait cependant moins d'écart pour les pourcentages de fécondation diploïde. Respectivement, les pourcentages étaient de 21,0 %, 12,9 %, 25,2 %, 47,4 % et 10,9 %. Le taux de clivage de ces ovocytes était de 81,4 % et ne présentait pas de différence significative en fonction des indications. Tout au plus, peut-on noter qu'il était plus bas pour les micro-injections à sperme normal (69,2 %).

#### DISCUSSION

Nous avons donc rapporté 7 grossesses au cours de 50 cycles de FIV avec microfécondation des ovocytes. Cela représente un taux de 14,0 % de grossesse par cycle et de 20,6 % par couple. Il est intéressant de constater les disparités obtenues dans les résultats en fonction des pathologies spermatiques initiales. De tels résultats montrent qu'il est impératif d'établir un diagnostic spermatique avant de proposer une thérapeutique. Le taux de fécondation moyen toutes indications confondues est de 32,9 %. Mais il est plus du double pour les échecs de FIV à sperme normal que pour les échecs de FIV à sperme subnormal. Ce qui différencie le plus les populations

spermatiques de ces deux groupes, c'est la morphologie de l'acrosome établie sur le spermocytogramme. Il existe même une corrélation négative entre le taux d'anomalie de l'acrosome et le taux de fécondation obtenu. C'est dire l'importance de ce critère.

En ce qui concerne les absences de bras externes de dynéine, le taux de fécondation dans la première série est nettement plus bas que celui obtenu avec le sperme normal. Ces données suggèrent que le mouvement des spermatozoïdes est un élément important de l'interaction gamétique même quand ils se trouvent placés sous la zone pellucide. Le taux de clivage des zygotes diploïdes est légèrement plus faible que celui que nous obtenons dans le laboratoire pour les FIV avec sperme de donneur qui constituent notre référence (96,7%). Le passage de la micro-pipette à travers la zone pellucide peut être à l'origine de ces échecs de clivage. Toutefois des facteurs ovocytaires ne sont certainement pas absents, car c'est pour les patients avec échec de FIV à sperme normal que le taux de clivage est le plus faible (69,2 %) comme si dans cette indication se trouvaient regroupés les moins bons ovocytes.

#### CONCLUSIONS

Au total, les techniques de microfécondation et notamment la technique "SUZI" font partie maintenant de l'arsenal thérapeutique que nous pouvons proposer aux stérilités masculines (5). Nous nous attachons à améliorer les résultats par une meilleure sélection des patients susceptibles de bénéficier de telles méthodes de fécondation ainsi que par l'amélioration des techniques de préparation du sperme. Notamment les méthodes d'induction de la réaction acrosomique sont susceptibles de diminuer le nombre de spermatozoïdes à microinjecter pour obtenir une fécondation. Ces techniques seront surtout utiles pour les situations où le nombre de spermatozoïdes disponibles est particulièrement bas comme les OAT extrêmes. La maturation in vitro des ovocytes en métaphase I avant leur microinjection devrait par ailleurs faire augmenter le taux de fécondation globale par patient. Pour quelque uns d'entre eux déjà des congélations d'oeuf microinjectés ont eu lieu mais la série est encore bien trop faible pour que des conclusions puissent en être tirées.

#### RÉFÉRENCES

- 1- Cohen J, Malter H, Wright G, Kort H, Massey J, Mitchell D. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Human Reproduction*, 1989, 4: 435-442.
- 2- Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer MP. Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil. Steril.*, 1990, 53: 662-665.

- 3- Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: Axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 1984, 50: 37-52.
- 4- Feneux D, Jouannet D, Marmor D: Les asthénozoospermies. In: Extrait des XXXIIIème assises françaises de gynécologie. Paris, Masson, 1987: 159-167.
- 5- Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). *Human Reproduction*, 1991, 6: 124-130.
- 6- Frydman R, Forman RG, Belaisch Allart J, et al. : Improvements in ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 1988, 541: 30-36.
- 7- Garrisi GJ, Talansky BE, Grunfeld L, Sapira V, Navot D, Gordon JW. Clinical evaluation of three approaches to micromanipulation-assisted fertilization. *Fertil Steril* 1990, 54: 671-7.
- 8- Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richard C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil. Steril.*, 1988, 50: 68-73.
- 9- Jouannet P, Escalier D, Serres C. David G. Motility of human sperm without outer dynein arms. *J Submicrosc Cytol*, 1983, 15: 67-71.
- 10- Ng C, Bongso A, Chang SI, Sathanathan H, Ratman S. Transfer of the human sperm into the perivitelline space of human oocytes after zona drilling or zona puncture. *Fertil. Steril.*, 1989, 52: 73-78.
- 11- Veek L. Human oocytes at the time of follicular harvest. In "Atlas of the human oocyte and early conceptus", Jones HW ed., Baltimore, Williams and Wilkins, 1986, p 5-13 1.
- 12- Wolf JP, Jouannet P. Intérêts des méthodes de microfécondation dans l'infertilité masculine. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1991, 19: 880-888.

**RESUME :** Parmi les méthodes de microfécondation, la microinjection de spermatozoïdes sous la zone pellucide (SUZI) a été testée au cours d'une étude prospective et randomisée pour différentes pathologies responsables de stérilités d'origine masculine. Les résultats de ces études ainsi que des premières séries de patients inclus dans ce programme sont présentés. Nous distinguons, les échecs de FIV à sperme normal ou subnormal, les dyskinésies flagellaires d'origine structurale comme les absence de bras externes de dynéine ou non spécifiques. Enfin une petite série concerne les oligoasthénospermies. Dix neuf pour cent des ovocytes ont été fécondés normalement, et sept grossesses ont été obtenues à partir de 31 transferts d'embryons. Les résultats sont cependant très variables d'une indication à l'autre. **Mots clés :** Microinjection, Echec de FIV, Absence de bras externes de dynéine, Oligoasthénospermie, Stérilité masculine. **Andrologie, 1992, 2 : 16-18.**