

# Restauration de la fertilité masculine par la spermatogénèse *in vitro*

J. TESARIK

Laboratoire d'Eylau, 55 rue Saint-Didier, 75116 Paris

## RÉSUMÉ

Une technique de culture *in vitro*, préalablement testée sur les cellules germinales provenant d'hommes avec spermatogénèse complète, a été appliquée, à des fins thérapeutiques, aux cas d'arrêt de maturation méiotique et post méiotique. Un petit nombre de spermatoocytes primaires provenant d'hommes avec arrêt au stade de pachytène de la première division méiotique, s'est développé jusqu'aux spermatides ; ces spermatides ont été capables de féconder les ovocytes et d'être à l'origine d'embryons qui ont évolué ensuite jusqu'au terme. Dans d'autres cas, des spermatides bloquées avant le processus de spermiogénèse ont pu se développer jusqu'aux spermatides allongées fécondes, et les premières naissances dans des cas d'arrêt complet de spermiogénèse ont pu ainsi être obtenues.

**Mots clés:** *Spermatogénèse in vitro, azoospermie sécrétoire, arrêt de maturation, spermatoocyte, spermatide, procréation médicalement assistée*

## I. INTRODUCTION

La stérilité masculine due à l'arrêt complet de maturation des cellules germinales peut être traitée par l'injection intra ovocytaire de spermatides rondes (round spermatid injection, ROSI) ou allongées (elongated spermatid injection, ELSI), lorsqu'il s'agit d'un arrêt de maturation aux stades post méiotiques de la spermatogénèse [2, 3, 5-7]. Or, l'efficacité de la ROSI est relativement faible à cause d'un taux très élevé d'apoptose parmi les cellules germinales chez les patients avec l'arrêt complet de spermiogénèse [8], et aucun traitement n'était jusqu'à présent disponible pour les cas d'arrêt méiotique, situés le plus souvent au stade de spermatoocyte primaire. A la recherche d'une solution thérapeutique pour ces pathologies, une technique de culture *in vitro*, développée avec les cellules prélevées sur les testicules d'hommes avec une spermatogénèse complète [9, 10], a été appliquée [11, 12]. Cet article résume les principales approches méthodologiques, les résultats et les possibles mécanismes d'action de ces traitements.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Patients

Les patients concernés étaient des hommes azoospermiques avec l'arrêt de spermatogénèse au stade de spermatoocyte primaire ou de spermatide ronde. Le diagnostic était établi à partir de résultats anatomopathologiques et confirmée par l'analyse microscopique du tissu testiculaire fraîchement prélevé, en utilisant

des méthodes d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie avec des marqueurs de la lignée germinale [10].

## 2. Prélèvement et préparation du tissu testiculaire

Le tissu était prélevé par biopsie ouverte sur plusieurs endroits des deux testicules. Le tissu était désintégré mécaniquement à l'aide de lames de microscope stériles, homogénéisé et distribué en plusieurs échantillons pour différents traitements et analyses [10].

## 3. Culture *in vitro*

Des segments des tubules séminifères et des agglomérations cellulaires, conservant en grande partie les associations originales entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli, étaient incubés à 30°C dans le milieu Gamete (Scandinavian IVF Science) enrichi par l'addition de FSH et testostérone [10].

## 4. Détermination de l'apoptose

La présence de la fragmentation de l'ADN résultant de l'apoptose était évaluée à l'aide d'un kit (Promega) utilisant la deoxynucleotidyltransférase terminale et du dUTP marqué à la fluoresceine [8].

## 5. Procréation assistée

La procréation assistée par ROSI et ELSI avec des spermatozoïdes issues de la culture *in vitro* a été réalisée en utilisant les méthodes standard, décrites auparavant [5].

## III. RESULTATS

Dans un groupe de 5 malades avec arrêt de spermatogenèse au stade de spermatocyte primaire, la méiose a été reprise pendant la culture *in vitro* chez 2 malades. Dans un de ces deux cas, le développement s'est ensuite arrêté au stade de spermatozoïde rond (Sa), alors que la différenciation post-méiotique jusqu'aux spermatozoïdes allongés (Sd) était observée dans l'autre cas [11]. L'injection des spermatozoïdes allongés issues de la culture *in vitro* a permis la fécondation de 6 ovocytes à partir de 12 injectés ; tous les ovocytes fécondés se sont ensuite divisés et une grossesse gemellaire a été obtenue après le transfert de ces 6

embryons dans l'utérus [11]. L'application de la même technique de culture *in vitro* aux hommes avec arrêt de spermatogenèse au stade de spermatozoïde rond a permis l'obtention de spermatozoïdes allongés dans plusieurs cas ; en utilisant ces spermatozoïdes issues de la culture *in vitro* deux autres naissances ont été obtenues [11, 12]. Tous les 4 enfants nés après l'application de ces techniques ne présentaient aucune anomalie à la naissance et leur caryotype était normal [12]. Aucune anomalie n'a été détectée chez ces enfants à l'âge de 1 an et de 2 ans.

## IV. DISCUSSION

Les résultats de ces travaux montrent que l'arrêt de spermatogenèse *in vivo* peut être surmonté, dans certains cas, par un nombre limité de cellules germinales en culture *in vitro*. Ces cellules réactivées peuvent ensuite se développer jusqu'aux stades avancés de la spermatogenèse. Le mécanisme de cette action n'est pas connu. Il peut être lié aux effets des concentrations pharmacologiques de FSH et testostérone, à la dilution ou inactivation de substances inhibitrices qui auraient besoin du contexte *in vivo* pour leur action, ou à l'élimination de mécanismes de contrôle (check-points) qui ne laisseraient pas se développer une cellule dont le pouvoir fécondant serait entièrement dépendant d'une micromanipulation [12]. Au moins certaines spermatozoïdes issues de la culture *in vitro* de spermatocytes primaires peuvent féconder et être à l'origine d'embryons normaux [11]. Il est à noter que seuls les spermatocytes primaires prélevés chez des hommes dont la première division méiotique était bloquée au stade pachytène ont été capables de la reprise *in vitro*, contrairement aux cas de blocage aux stades leptotène ou zygotène [12]. La possibilité de recruter certains spermatocytes au stade pachytène pour une division méiotique accélérée comporte une analogie avec la transition accélérée de spermatocytes de souris [1] et de rat [4] entre le stade pachytène et l'anaphase de la première division méiotique, induite *in vitro* par un inhibiteur de phosphatase, l'acide oocadaïque. Les deux exemples montrent que la longue durée du processus méiotique *in vitro* est due à l'ac-

tion de nombreux systèmes de contrôle plutôt qu'au besoin de la mécanique du processus lui-même. De même, le processus de différenciation post-méiotique (spermiogenèse) a été accéléré d'une façon importante dans les conditions *in vitro*. En revanche, ce processus a abouti le plus souvent à la formation de spermatides allongées morphologiquement atypiques [10-12]. Ces anomalies morphologiques semblent cependant relativement peu importantes lorsque la fécondation utilisant ces cellules est assistée par micromanipulation. Aucune anomalie n'a été détectée chez les enfants nés après l'application de cette technique pour la procréation assistée. Néanmoins, un nombre plus important de cas est nécessaire pour déterminer l'importance des risques potentiels.

## REFERENCES

1. COBB J., CARGILE B., HANDEL M.A. : Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 1999, 205 : 49-64.
2. FISHEL S., GREEN S., BISHOP M. et al. : Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 1995, 345 : 1641-1642.
3. FISHEL S., ASLAM I., TESARIK J. : Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1371-1375.
4. TARSOUNAS M., PEARLMAN R.E. MOENS P.B. : Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3. *J. Cell Sci.*, 1999, 112 : 423-434.
5. TESARIK J., MENDOZA C. : Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 772-779.
6. TESARIK J., MENDOZA C., TESTART J. : Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333 : 525.
7. TESARIK J., ROLET F., BRAMI C., et al. : Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 780-783.
8. TESARIK J., GRECO E., COHEN-BACRIE P., MENDOZA C. : Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 757-762.
9. TESARIK J., GRECO E., RIENZI L., : Differentiation of spermatogenic cells during *in-vitro* culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 2772-2781.

10. TESARIK J., GUIDO M., MENDOZA C., GRECO E. : Human spermatogenesis *in vitro*: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83 : 4467-4473.
11. TESARIK J., BAHCECI M., ÖZCAN C., GRECO E., MENDOZA C. : Restoration of fertility by *in-vitro* spermatogenesis. *Lancet*, 1999, 353 : 555-556.
12. TESARIK J., BAHCECI M., ÖZCAN C., GRECO E., MENDOZA C. : *In-vitro* spermatogenesis. *Lancet*, 1999, 353 : 1708.

## ABSTRACT

### Restoration of male fertility by *in vitro* maturation of germ cells

J. TESARIK

**An *in-vitro* culture technique, previously tested with germ cells from men with complete spermatogenesis, was applied in assisted reproduction treatment for cases of meiotic and postmeiotic maturation arrest. Some primary spermatocytes from men with maturation arrest at the pachytene stage developed up to the late elongated spermatid stages and were capable of fertilizing the spouse's oocytes and of giving rise to embryos that were transferred into the spouse's uterus and subsequently developed to term. In other cases, round spermatids blocked *in vivo* before the process of spermiogenesis developed to elongated spermatids *in vitro*; with the use of such *in-vitro* formed spermatids, the first term pregnancies in cases of complete spermiogenesis arrest were achieved. These findings show that certain *in-vivo* developmental blocks in male germ cells from patients with severe testiculopathies can be overcome by *in-vitro* culture, probably by modifying control mechanisms acting at developmental checkpoints.**

**Key words :** *In vitro* spermatogenesis, non obstructive azoospermia, maturation arrest, spermatocyte, spermatid, assisted reproductive technology.