

Azoospermie et microinjection

D. LE LANNOU¹, J.F. GRIVEAU¹, M.C. LAURENT², B. LOBEL³

¹Unité de Biologie de la Reproduction- CECOS,

²Service de Gynécologie, CHR Hopital-Sud,

³Service d'Urologie, CHR Pontchaillou, Rennes

RÉSUMÉ

Dans les azoospermies, le prélèvement chirurgical de spermatozoïdes testiculaires, associé à la congélation, permet la mise en œuvre de l'ICSI dans de bonnes conditions. Les auteurs présentent leur expérience dans ces azoospermies en insistant sur trois aspects :

- Prélèvement chirurgical ou à l'aiguille : dans les azoospermies obstructives, 40 patients ont eu un prélèvement chirurgical épидидymaire ou testiculaire et 37 patients une biopsie testiculaire percutanée à l'aiguille : tous les prélèvements sont positifs. Dans les azoospermies non obstructives, 133 patients ont eu une biopsie testiculaire percutanée et 50 prélèvements ont montré la présence de spermatozoïdes mobiles (38%)

- La congélation est réalisée avec un milieu sans jaune d'œuf, après dilacération des biopsies testiculaires à l'aide de lames de verre. Les résultats des ICSI avec ou sans congélation préalable sont rapportés et ne montrent pas de différence significative : Dans les azoospermies obstructives, sans congélation 41 cycles ont permis l'obtention de 13 grossesses (31%) et avec congélation préalable 115 cycles ont permis l'obtention de 24 grossesses (20%). Dans les azoospermies non obstructives, 31 cycles avec spermatozoïdes frais ont permis d'obtenir 6 grossesses (19%) et 33 cycles avec spermatozoïdes congelés 12 grossesses (36%)

- Après décongélation, le pourcentage de spermatozoïdes testiculaires dits mobiles est très faible, de l'ordre de 4%, et de plus cette mobilité est très diminuée (spermatozoïdes

frémissants) ce qui rend la recherche de ces spermatozoïdes difficile et longue. L'adjonction de pentoxifyline (3mM) augmente en 15 mn la mobilité qui passe à 30%, dont plus d'1/3 de progressifs, la recherche de spermatozoïdes mobiles devient plus aisée et rapide, les taux de fécondations et de grossesses étant par ailleurs équivalents.

Aucune malformation n'a été observée sur les 51 enfants nés vivants.

Mots Clés : Azoospermie, testicule, épидидyme, congélation de sperme, ICSI

I. INTRODUCTION

Depuis quelques années l'apparition des techniques de microinjection intra cytoplasmique de spermatozoïdes a complètement bouleversé la prise en charge des azoospermies. D'abord proposées dans les azoospermies obstructives [26], il a rapidement été montré que ces techniques pouvaient également permettre l'obtention de grossesses dans les azoospermies non obstructives [20]. Cependant de nombreuses questions demeurent. Dans cette étude nous présentons nos résultats de la prise en charge des azoospermies.

Correspondance : D. Le Lannou, Unité de Biologie de la Reproduction, 1 bis rue de la Cochardière, 35000 Rennes

Communication orale au XVIIème Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française, 7-8 Décembre 2000, Bordeaux

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Population étudiée

D'octobre 1995 à décembre 2000, 210 patients ont eu un prélèvement chirurgical pour azoospermie. Pour 77 patients il s'agissait d'azoospermies obstructives : 15 CAVD, 1 obstruction post infectieuse, 3 vasectomies, 8 paraplé-giques et 50 obstructions congénitales. 133 patients présentaient une azoospermie non obstructive.

Tous ces patients ont eu un bilan andrologique complet avec examen clinique, spermiologique et hormonal. Le caryotype est réalisé systématiquement et seules les anomalies 47XXY n'ont pas été retenues dans cette étude. En cas d'agénésie déférentielle, une recherche des mutations du gène CFTR est réalisée chez le patient et sa conjointe.

2. Le prélèvement de spermatozoïdes

Les prélèvements de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires sont réalisés au bloc d'Urologie tels que précédemment décrit [6].

En résumé le prélèvement peut être réalisé sous AG après extériorisation du contenu de la bourse et inspection minutieuse. Le prélèvement épидидymaire est réalisé par aspiration du liquide spermatique dans un cathéter de lymphographie 24 gauge adapté à une seringue introduite dans un canal épидидymaire incisé. La biopsie testiculaire est effectuée après ouverture de l'albuginée en incisant, à l'aide de fins ciseaux, les tubes séminifères qui s'extériorisent par la brèche. Le prélèvement testiculaire peut également être effectué sous anesthésie locale par ponction percutanée à l'aide d'une aiguille à biopsie 14 Gauge montée sur un pistolet Biopsy Gun. En moyenne deux prélèvements sont réalisés sur chaque testicule.

Tous les prélèvements testiculaires ou épидидymaires sont immergés dans une solution de Ringer et adressés au laboratoire de biologie de la Reproduction.

3. Synchronisation des prélèvements de spermatozoïdes et d'ovocytes

Au début de notre expérience, les prélèvements de spermatozoïdes et d'ovocytes étaient

réalisés le même jour, la microinjection étant alors réalisée avec des spermatozoïdes frais.

L'absence de spermatozoïdes dans plus de 50% des cas d'azoospermies non obstructives le jour de la ponction d'ovocytes nous a conduit à abandonner rapidement cette stratégie au profit d'un prélèvement de spermatozoïdes avec congélation systématique réalisée avant le cycle d'AMP, cette dernière stratégie supprimant les ponctions ovocytaires inutiles.

Après dilacération de la pulpe testiculaire dans une boîte de Pétri avec des lames de verre stériles, les spermatozoïdes sont dilués volume à volume avec un milieu cryoprotecteur dépourvu de jaune d'œuf (Cryosperm), puis congelés en paillettes fines de 0.25ml selon les techniques habituelles. La décongélation se fait à température ambiante puis les spermatozoïdes sont préparés pour la microinjection.

4. la microinjection

a) Préparation des ovocytes

La stimulation ovarienne est réalisée selon les protocoles classiques de désensibilisation hypophysaire et stimulation par FSH. Les ovocytes sont recueillis par voie vaginale sous échographie 35h après le déclenchement de l'ovulation. Les ovocytes sont ensuite décoronisés par la hyaluronidase à 80 UI/ml puis remis en suspension dans un milieu de culture jusqu'à la microinjection.

b) Préparation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires, frais ou congelés, sont directement déposés sur une colonne de gradient de densité (Sill-Select, PureSperm) puis centrifugés 15mn à 800g. Le culot de centrifugation est récupéré puis lavé une fois avec du milieu de culture (Ferticult) à 800g pendant 5mn.

Avec les spermatozoïdes testiculaires issus d'azoospermies non obstructives, la concentration et la mobilité des spermatozoïdes sont parfois extrêmement faibles, notamment après congélation, rendant la microinjection quasiment impossible. Une stimulation par de la pentoxifylline est alors réalisée : dans une boîte de Pétri recouverte d'huile de paraffine, sont disposées à proximité des microgouttes

contenant les ovocytes plusieurs microgouttes de 5 µl de spermatozoïdes en suspension auxquelles on ajoute le même volume de pentoxifylline 3mM. Après 15 mn, les spermatozoïdes mobiles sont recueillis à l'aide de la micropipette d'injection puis passés dans 3 bains successifs de milieu de lavage (Ferticult Hepes), pour enlever tout excès en Pentoxifylline. L'injection peut alors être réalisée suivant les techniques habituelles.

III. RÉSULTATS

1. azoospermies obstructive

Dans les cas d'azoospermies obstructives, une exploration chirurgicale à ciel ouvert permettant le recueil de spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires à été réalisée chez 40 patients pour lesquels une anastomose était envisageable. Les autres patients (n=37) pour lesquels une anastomose n'était pas envisageable ont tous eu une biopsie testiculaire percutanée à l'aiguille. Tous les prélèvements ont été positifs. Au total 70 patients ayant une azoospermie obstructive ont bénéficié d'au moins un cycle de microinjection soit avec des spermatozoïdes épидидymaires, soit avec des spermatozoïdes testiculaires (tableau 1).

Dans les cas de prélèvements épидидymaires, 21 cycles ont été effectués avec des spermatozoïdes frais avec obtention de 4 grossesses (19%) et 72 cycles ont été effectués avec des spermatozoïdes congelés avec obtention de 15 grossesses (21%).

Dans les cas de prélèvements testiculaires, 20 cycles ont été effectués avec des spermatozoïdes frais avec obtention de 9 grossesses (45%) et 43 cycles ont été effectués avec du sperme congelé avec obtention de 9 grossesses (21%)

Il n'est noté aucune différence significative entre ces différents groupes tant en ce qui concerne les taux de fécondation que les taux de grossesse. Le risque de fausses couches ne paraît pas non plus influencé par l'origine des spermatozoïdes.

2. azoospermies non obstructive

Dans les cas d'azoospermie non obstructive, sur les 133 patients ayant eu en première intention une biopsie percutanée à l'aiguille,

50 ont eu un prélèvement positif (38%). Cinq patients dont la biopsie percutanée à l'aiguille était négative ont souhaité une deuxième exploration chirurgicale à ciel ouvert. Ces 5 prélèvements furent à nouveau négatifs. Quarante deux patients ayant une azoospermie non obstructive ont finalement bénéficié d'au moins un cycle de microinjection.

Au total 64 cycles de microinjection (tableau 2) réalisés avec des spermatozoïdes frais ou congelés ont permis l'obtention de 18 grossesses (28%). Il n'est noté aucune différence significative entre les spermatozoïdes frais ou congelés, ni dans la survenue des grossesses, ni dans l'issue de celles-ci.

Sur les 33 cycles d'ICSI réalisés avec des spermatozoïdes testiculaires congelés, 18 cycles ont été réalisés en ayant au préalable incubé les spermatozoïdes pendant 15 minutes avec de la pentoxifylline. En effet, après congélation-décongélation, la mobilité des spermatozoïdes testiculaires issus d'azoospermies non obstructives, est parfois telle que plusieurs heures peuvent être nécessaires à la réalisation de la microinjection. Les résultats de l'adjonction de pentoxifylline montrent une augmentation significative de la mobilité des spermatozoïdes testiculaires congelés issus d'azoospermies non obstructives permettant une sélection rapide de spermatozoïdes vivants pour la réalisation de la microinjection (tableau 3).

Les taux de fécondation, la qualité des embryons et les taux de grossesses ne sont pas modifiés par l'utilisation de la pentoxifylline.

IV. DISCUSSION

En cas d'azoospermie, le recours aux techniques de microinjection intracytoplasmique avec les spermatozoïdes prélevés chirurgicalement est à l'évidence une alternative au don de sperme auxquels avaient recours les couples antérieurement.

Le prélèvement de spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires est la première étape indispensable vers ces techniques. Deux méthodes de prélèvement sont possibles : soit la biopsie chirurgicale à ciel ouvert sous anesthésie générale, soit la ponction percutanée sous anesthésie locale.

Tableau 1 : Azoospermies obstructives

	Spermatozoïdes Epididymaires	Spermatozoïdes Testiculaires
Cycles	93 cycles	64 cycles
Gros.	19 (20.4%)	18 (28.1%)
FC	3 (15%)	3 (16%)
GEU	-	1
En cours >3 mois	1	1
Accouchements	15	13
Enfants	20	17
Malformations	0	0

Tableau 2 : Azoospermies non obstructives

	Frais	Congelés
Cycles	31	33
Grossesses	6	12
Gros/cycle	19%	36%
FC	-	4
GEU	1	-
En cours >3 mois	1	1
Accouchements	4	7
Enfants	5	9
Malformations	-	-

Tableau 3 : Adjonction de pentoxifylline sur la mobilité des spermatozoïdes testiculaires congelés

	Avant la Pento	Après 15mn de Pento
Frémissants %	3,2 + 1,9	20,4 + 4,9*
Progressifs %	0,6 + 0,7	9,4 + 3,3*

* p < 0, 01

Dans les azoospermies obstructives, la spermatogénèse étant a priori normale, il est en général aisé d'obtenir par biopsie testiculaire ou épидидymaire des spermatozoïdes mobiles en nombre suffisant, et ces deux méthodes permettent dans 100% des cas de recueillir des spermatozoïdes [16, 22]. Nos résultats de plus ne montrent aucune différence entre les ICSI réalisées avec les spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires (Tableau 1). La méthode chirurgicale à ciel ouvert pourra donc être préférée si le bilan initial laisse présager d'un geste réparateur possible telle une anastomose épидидymo-déférentielle. Si par contre aucun geste réparateur n'est possible, comme dans les agénésies déférentielles, la biopsie chirurgicale ne paraît pas nécessaire, entraînant un geste agressif inutile, et une simple ponction testiculaire à l'aiguille paraît indiquée. Certains patients ayant pu bénéficier à la fois d'une biopsie chirurgicale puis d'une ponction percutanée ont exprimé clairement leur meilleur vécu et donc leur préférence pour la ponction percutanée, plus confortable.

La situation est très différente dans les azoospermies non obstructives. La spermatogénèse est par définition très altérée, et la présence de spermatozoïdes à la biopsie ne sera observée que dans 40 à 50% des cas. Dans notre expérience la ponction percutanée effectuée avec deux prélèvements par testicule, nous a permis dans 38% des cas de trouver des spermatozoïdes mobiles. Les résultats dans la littérature montrent de grandes différences liées à la technique, mais aussi à la population étudiée. Ainsi Prins [16] observe 35% de biopsies positives par voie chirurgicale dans une population d'azoospermies sécrétoires non sélectionnée, alors que Kupfer [12] et Palermo [15] observent respectivement 77% et 63% de biopsies positives par voie chirurgicale mais chez des patients sélectionnés ayant déjà eu au préalable une première biopsie positive. Le nombre de prélèvements testiculaires influence aussi les résultats : Amer [1] a obtenu 37% de biopsies positives avec 1 ou 2 prélèvements chirurgicaux, et 49% avec

3 ou 4 prélèvements. Lewis [13] en ponction percutanée a obtenu 56% de biopsies positives, mais en réalisant jusqu'à 15 prélèvements. Il est évident que plus le nombre et la taille du prélèvement sera important, plus la probabilité de trouver quelques spermatozoïdes augmentera, mais également plus le risque de complication (hématomes, voire nécrose testiculaire) sera important. Un juste milieu est donc nécessaire pour donner le maximum de chance à ces patients mais aussi avec le minimum de risques et d'inconfort.

Dans notre expérience, nous n'avons observé aucune différence entre les résultats obtenus avec des spermatozoïdes frais ou congelés. La congélation permet de dissocier le prélèvement testiculaire de la ponction ovocytaire. Cette dissociation entre les deux prélèvements présente au moins deux avantages : d'une part elle simplifie l'organisation des équipes médico-chirurgicales ; d'autre part et surtout elle évite les stimulations et les ponctions d'ovocytes inutiles et potentiellement agressives chez les patientes dont le conjoint présentera une biopsie négative. L'intérêt d'une congélation systématique préalable de spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires est donc évident.

Avec les spermatozoïdes épидидymaires la plupart des auteurs ne notent aucune différence avant ou après congélation [15, 27].

De nombreuses publications ont fait état de grossesses obtenus après ICSI réalisés avec des spermatozoïdes testiculaires congelés, et si la plupart des auteurs obtiennent un taux de fécondation satisfaisant [3, 4, 9, 10, 11, 17], certains auteurs [4, 9] observent un taux d'implantation et de naissance diminué par rapport à l'utilisation des spermatozoïdes frais. La congélation de spermatozoïdes testiculaires présente des difficultés liées au faible nombre et à la faible mobilité des spermatozoïdes, entraînant une recherche après décongélation longue et difficile. La détermination de la viabilité des spermatozoïdes est cependant un pré-requis indispensable dans la réalisation de la microinjection. Jusqu'à présent différentes stratégies ont été développées afin d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes testiculaires après congélation et plusieurs études ont rap-

porté une stimulation de la mobilité après culture in vitro des spermatozoïdes frais ou congelés pendant quelques jours avant la réalisation de la microinjection. [2, 5, 7, 8]. Un test hypo-osmotique a également été proposé par certains auteurs [18] pour différencier les spermatozoïdes morts ou vivants avant l'ICSI mais l'interprétation de ce test n'est pas simple en particulier sur les spermatozoïdes congelés, en effet, la congélation-décongélation induit fréquemment des variations importantes de la pression osmotique entraînant un enroulement des flagelles et dans ces conditions le test hypo-osmotique est difficilement interprétable.

La stimulation des spermatozoïdes par la pentoxifylline a également longtemps été utilisée en FIV classique en particulier dans les asthénozoospermies, avec des résultats variables [14, 28]. Son utilisation pour les spermatozoïdes testiculaires frais a récemment été proposée par Tasdemir [23] ou bien encore par Angelopoulos [2]. Nos résultats montrent qu'une incubation de 15 minutes avec de la pentoxifylline stimule également la mobilité des spermatozoïdes testiculaires congelés-décongelés. En effet, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles augmente significativement de 5,6 % sans pentoxifylline à 34,4 % avec pentoxifylline. Une mobilité progressive a même été observée dans 30 % des spermatozoïdes mobiles. Comparé à la culture in vitro des spermatozoïdes testiculaires, la pentoxifylline a l'avantage de permettre la distinction rapide entre les spermatozoïdes morts et vivants et de permettre la réalisation de la microinjection immédiatement de manière beaucoup plus facile et rapide. Nos résultats montrent également que l'étiologie de l'azoospermie n'influence pas les effets positifs de la pentoxifylline sur la mobilité des spermatozoïdes. Si la pentoxifylline a des effets toxiques évidents sur l'ovocyte et sur l'embryon [19, 24], le fait de laver les spermatozoïdes après incubation a permis son utilisation sans risque en FIV [25]. Cette étape de lavage apparaît également indispensable en ICSI afin d'éviter l'injection de pentoxifylline dans l'ovocyte avec le spermatozoïde.

Dans les azoospermies obstructives peu d'études ont comparé les résultats obtenus

avec les spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires ; nos résultats ne montrent aucune différence voire même une tendance à l'amélioration avec les spermatozoïdes testiculaires. Dans tous les cas il nous semble que les spermatozoïdes testiculaires supportent mieux la congélation que les spermatozoïdes épидидymaires, qui eux de plus ne réagissent pas à la pentoxifylline. De plus la ponction testiculaire à l'aiguille est plus simple que la ponction épидидymaire. Enfin Steele [21] a montré une augmentation de la fragmentation du DNA dans les spermatozoïdes épидидymaires par rapport aux spermatozoïdes testiculaires dans les azoospermies obstructives suggérant que la stase des spermatozoïdes dans un épидидyme obstrué, en contact avec des spermiphages et de nombreux débris cellulaires pouvait altérer l'intégrité génomique du spermatozoïde

V. CONCLUSION

Si la prise en charge des azoospermies en ICSI commence aujourd'hui à être bien codifiée, plusieurs questions essentielles demeurent. D'abord à qui peut-on ou doit-on proposer une biopsie, en particulier dans les azoospermies non obstructives, alors que toutes les études ont montré qu'il n'existait à ce jour aucun élément ni clinique ni biologique qui permettrait de prévoir le résultat de la biopsie. Ensuite l'évaluation du risque malformatif ou celui de transmission de l'infertilité à l'enfant sont mal évalués, et même si les résultats actuels sont plutôt rassurants, les séries sont trop faibles, et une surveillance systématique de ces enfants sur un long terme est nécessaire.

RÉFÉRENCES

- 1- AMER M., EL HAGGAR S., MOUSTAFA T., EL-NASER T.A., ZOHDY W. : Testicular sperm extraction : Impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 3030-3034.
- 2- ANGELOPOULOS T., ADLER A., KREY B.A. *et al.* : Enhancement or initiation of testicular sperm motility by in vitro culture of testicular tissue. *Fertil. Steril.*, 1999, 71, 240-243.
- 3- BEN-YOSEF D., YOVEG L., HAUSER R. *et al.* : Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 1794-1801.
- 4- DE CROO I., VAN DER ELST J., EVERAERT K. *et al.* : Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, 1893-1897.
- 5- EDIRISINGHE W.R., STEPHEN M.J., MATSON P.L. *et al.* : Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa : implication for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 2474-2476.
- 6- EL KADHER K., GUILLE F., KARMOUNI T. *et al.* : Aspiration microchirurgicale des spermatozoïdes épидидymaires, biopsie testiculaire et injection intracytoplasmique du spermatozoïde dans le traitement de l'infertilité masculine. *Progrès en Urologie*, 1999, 9, 696-702.
- 7- EMILIANI S., VAN DEN BERGH M., VANNIN A. S. *et al.* : Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, 2371-2374.
- 8- LIU J., TSAI Y.L., KATZ E. *et al.* : Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen-thawed human testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1997, 12, 1667-1672.
- 9- FRIEDLER S., RAZIEL A., SOFFER Y. *et al.* : Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia. - a comparative study. *Fertil. Steril.*, 1997, 68, 892-895.
- 10- HABERMAN H., SEO R., CIESLA J. *et al.* : In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular sperm. *Fertil. Steril.*, 2000, 73, 955-960.
- 11- GIL-SALOM M., ROMERO J., MINGUEZ Y. *et al.* : Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 1309-1313.
- 12- KUPFER W., SCHLEGEL P., AL-HASANI S *et al.* : Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2000, 73, 453-458.
- 13- LEWIS A., REUBINOFF B., PORAT-KATZ A. *et al.* : Testicular fine needle aspiration : the alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 1785-1790.
- 14- MATSON P.L., YOVICH J.M., EDIRISINGHE W.R. *et al.* : An argument for the past and continued use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.*, 1995, 10, suppl.1, 67-71.
- 15- PALERMO G.D., SCHLEGEL P.N., HARIPRASHAD J.J. *et al.* : Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 741-748.
- 16- PRINS G.S., DOLGINA R., STUDNEY P., KAPLAN

ABSTRACT

Azoospermia and Intracytoplasmic sperm injection

D. LE LANNOU, JF GRIVEAU, MC LAURENT,
B. LOBEL

In cases of azoospermia, testicular biopsy combined with cryopreservation of spermatozoa allows ICSI to be performed under good conditions. In this study, the authors present their results by emphasizing three major aspects:

- Retrieval of testicular spermatozoa by open biopsy or percutaneous needle aspiration: 40 patients with obstructive azoospermia underwent epididymal or testicular retrieval by open biopsy and 37 by percutaneous needle aspiration. All biopsies were positive. 133 patients with nonobstructive azoospermia underwent percutaneous needle aspiration and spermatozoa were successfully retrieved from 50 patients (38%).

- The freezing process was performed with a cryoprotective medium devoid of egg yolk after dilaceration of the testicular tissue using two sterile glass slides. No significant difference in the outcome of the ICSI procedure was observed between fresh and frozen-thawed spermatozoa. In cases of obstructive azoospermia, 13 pregnancies out of 41 ICSI cycles (31%) were obtained with the use of fresh testicular or epididymal spermatozoa and 24 pregnancies out of 115 ICSI cycles (20%) were obtained with the use of cryopreserved spermatozoa. In cases of non-obstructive azoospermia, 6 pregnancies out of 31 ICSI cycles (19%) were obtained with the use of fresh testicular spermatozoa and 12 pregnancies out of 33 ICSI cycles (36%) were obtained with the use of frozen-thawed spermatozoa.

- After the freezing-thawing process, the percentage of motile testicular spermatozoa is very low (about 4%), with a weakly shaking motility making selection of live spermatozoa very long and difficult. The addition of pentoxifylline (3 mM) significantly increases this motility within 15 minutes, as 30% of spermatozoa have a progressive motility. Selection of viable motile spermatozoa is therefore easier and more rapid. Fertilization and pregnancy rates are comparable to those generally reported. No malformation was observed on 51 live births.

Key-Words: Azoospermia, testis, epididymis, sperm freezing, ICSI

- B., ROSS L., NIEDERBERGER C. : Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J.Urol.*, 1999, 161, 1504-1508.
- 17- ROMERO J., RMOHI J., MINGUEZ Y *et al.* : Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1996, 65, 877-880.
- 18- SALLAM H.N., FARRAG A., AGAMEYA A.F. *et al.* : The use of a modified hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermatozoa in ICSI. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 272-276.
- 19- SCOTT L. and SMITH S. : Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil. Steril.*, 1995, 63, 166-176.
- 20- SILBER, S.J., VAN STEIRTEGHEM, A.C., NAGUY, Z.P. *et al.* : Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.*, 1996, 110-17.
- 21- STEELE E.K., McCLURE N., MAXWELL R.J. and LEWIS S.E. : A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5, 831-835.
- 22- STEELE EK, KELLY JD, LEWIS SE *et al.* : Testicular sperm extraction by Trucut needle and milking of seminiferous tubules. *Fertil. Steril.*, 2000, 74, 380-383.
- 23- TASDEMIR I., TASDEMIR M., TAVUKCUOGLU S. : Effect of Pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J. Ass.Reprod.Gen.*, 1998, 15, 90-92.
- 24- TOURNAYE H., VAN DER LINDEN M., VAN DEN ABBEEL E. *et al.* : Effects of pentoxifylline on in vitro development of preimplantation mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 1993, 8, 1475-1480.
- 25- TOURNAYE H., DEVROY P., VAN STEIRTEGHEM A. : Effect of pentoxifylline on mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 566.
- 26- TOURNAYE H., DEVROEY P., LIU J. *et al.* : Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection : a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil. Steril.*, 1994, 61, 1445-1450.
- 27- TOURNAYE H., MERDAD T., SILBER S. *et al.* : No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 90-95.
- 28- TOURNAYE H., DEVROY P., CAMUS M. *et al.* : Use of pentoxifylline in assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.*, 1995, 10, suppl.1, 72-79.
- 29- YOVICH J.M., EDIRISINGHE W.R., YOVICH J.L. : Effect of pentoxifylline on mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 566.