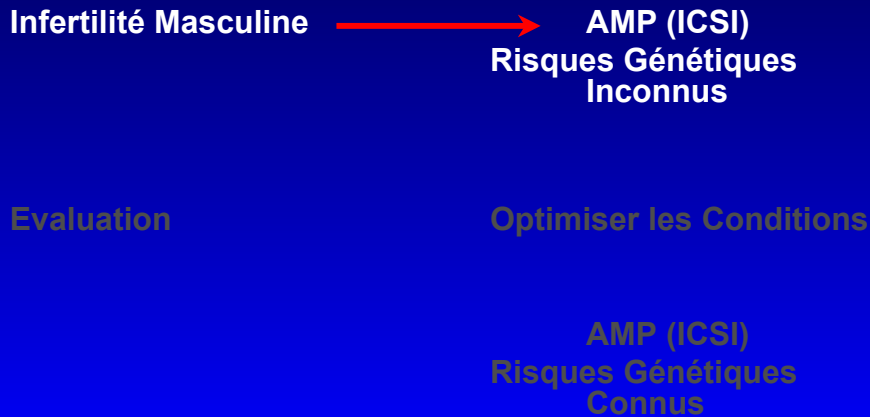

Azoospermie: Usage Optimal de l'AMP

**Armand Zini, MD, FRCSC
Université McGill**

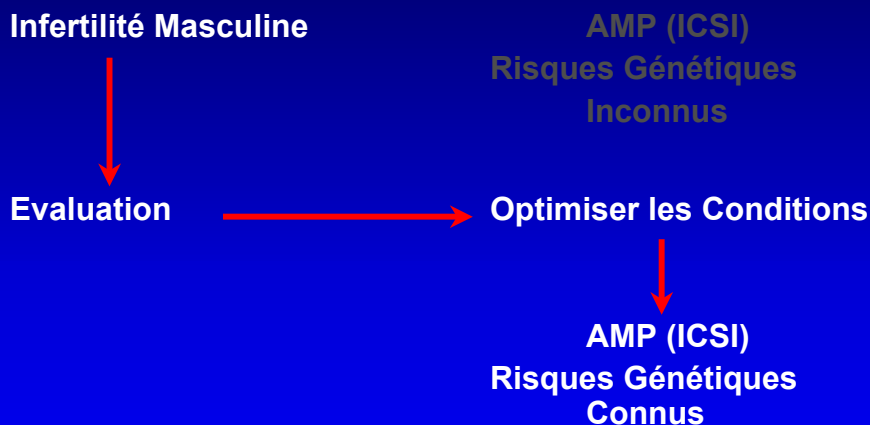
L'AMP pour l'Azoospermie

- **Optimisation du Potentiel de Fertilité Masculine**
- **Prélèvement de Spz. + AMP**
 - Azoospermie Obstructive
 - Azoospermia Non-Obstructive
- **Résultats**
- **Directions Futures**

Azoospermie: Importance de l'Evaluation du Male



Azoospermie: Importance de l'Evaluation du Male



Evaluation de l'Azoospermie

• Evaluation de Base

- Historique (Questionnaire)
- Examen physique (génital)
- Deux analyses séminales avec centrifugation
- Évaluation hormonale (FSH, LH, T, Prl)
- Évaluation et conseils génétiques

• Evaluation Additionnelle Optionnelle

- Etudes d'imagerie
- Biopsie testiculaire diagnostique

Evaluation Génétique de l'Azoospermie

Azoospermie Non Obstructive (idiopathique)

1. Analyse du Caryotype

- anomalies chez ~10% (surtout chromosomes sexuels)

2. Microdélétions du chromosome Y

- Microdélétion Yq détecté chez 10-15%

Azoospermie Obstructive (CBAVD, idio)

1. Mutations du gène de la Fibrose Kystique (FK)

- mutation FK chez ~80% des hommes avec CBAVD

Étiologie de l'Azoospermie: Conditions pouvant être corrigées

- **Obstructive (Epididyme, OCE, CBAVD)**
- Idiopathique
- Génétique
- Développement - cryptorchidisme
- Iatrogénique (dévascularisation)
- Infection (orchite)
- Torsion testiculaire
- Chimiothérapie/radiothérapie
- **Médication (e.g. testostérone)**
- **Endocrine**
- **Mode de vie (chaleur, toxines)**

L'AMP pour l'Azoospermie

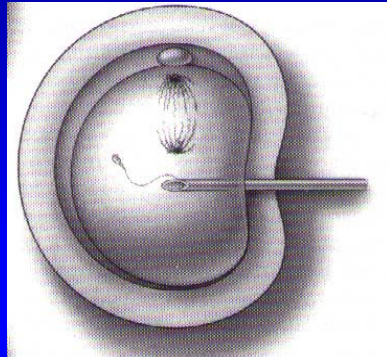
ICSI



FIV / ICSI: Perspectives Historiques

- Avant ICSI, les résultats de l'AMP (FIV or IUI) avec prélèvement des spz. par chirurgie (épididymaire) étaient faibles (taux de grossesse <10%)
- Avec ICSI, l'utilisation de spz. épидидymaires ou testiculaires donnent de meilleurs résultats (~30% TG)

SMART Study Group, *J Urol* 1994
Schoysman et al, *Lancet* 1993
Devroey et al, *Fertil Steril* 1994
Tournaye et al, *Fertil Steril* 1994
Gatti et al, *Anim Reprod Sci* 2004
deKretser *J Reprod Fertil* 1998
Temple-Smith *J In Vitro Fert Emb Transf* 1985



FIV/ICSI: Perspectives Historiques

- Usage favorable de spz. cryopréservés-dégelés, prélevés chirurgicalement
- Fertilisation & TG sont comparables en utilisant des spz. épидидymaires ou testiculaires, frais ou congelés (doivent être motiles)
 - Sauf, TG plus faibles avec spz. testiculaires congelés provenant d'hommes avec NOA
- L'usage de spz. congelés simplifie la planification du cycle de FIV

Nagy et al, *Fertil Steril* 1995
Oates et al, *Hum Reprod* 1996
Garrels et al, *Arch Androl* 1998
Torunaye et al, *Hum Reprod* 1999
Ben-Yosef et al, *Hum Reprod* 1999
Nicolopoulos et al, *Hum Reprod* 2004

Azoospermie: Techniques de Prélèvement de Spz.

- **Azoospermie Obstructive**
- **Azoospermie Non obstructive**

Azoospermie Obstructive : Indications pour le prélèvement de spz.

- **Obstruction irréparable du conduit**
 - iatrogénique, idiopathique (variante de CBAVD)
- **Absence bilatérale congénitale des canaux déférents (CBAVD)**
 - La plupart ont une spermatogenèse complète, mutation du gène CFTR
- **Comme alternative pour réparer l'obstruction du conduit**
 - idiopathique, post-vasectomie
- **Au moment de la chirurgie reconstructive**

Azoospermie Obstructive : Techniques de Prélèvement de spz.

- **Epididyme** (Site de préférence – spz. motiles)
 - PESA (percutaneous aspiration of caput)
 - MESA (open microsurgical aspiration of caput)

Avantages

PESA

- Simple
- Anesthésie locale

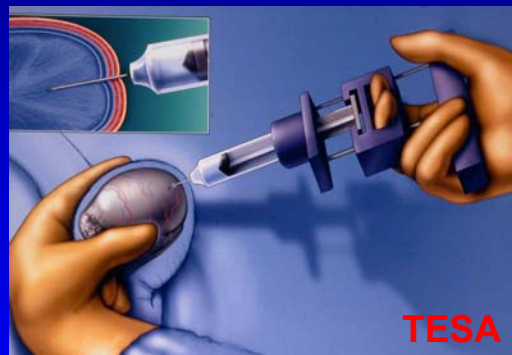
MESA

- Plus grande quantité de spz.



Azoospermie Obstructive : Techniques de Prélèvement de Sperme

- **Testicule**
 - TESE (extraction testiculaire de spz.) - trop invasif
 - TESA (aspiration testiculaire de spz.)



- **Conduits ou Vésicules Sémiales (rare)**

Azoospermie Obstructive : Résultats avec FIV / ICSI

	<u>Epididymaire</u>	<u>Testiculaire</u>
Extraction de spz.	~100%	~100%
Taux de fertilisation	50-70%	40-70%
Taux de grossesse	30-50%	30-50%

Nagy et al, *Fertil Steril* 1995

Devroey et al, *Hum Reprod* 1996

De Croo et al, *Hum Reprod* 1998

Palermo et al, *Hum Reprod* 1999

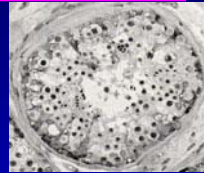
Azoospermie: Techniques de Prélèvement de Sperme

● Azoospermie Obstructive

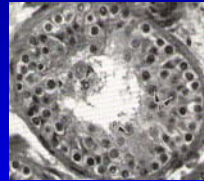
● Azoospermie Non-obstructive

Azoospermie Non Obstructive (NOA)

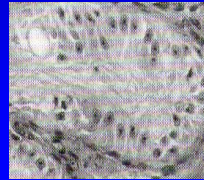
- Spermatogenèse affaiblie
(0-6 spermatides matures/tubule)



- Arrêt de maturation



- Sertoli cell only



Azoospermie Non Obstructive : Etiologie

- Idiopathique
- Génétique (anomalie chromosomique, microdélétion du chromosome Y)
- Développement - cryptorchidisme
- Iatrogénique (dévascularisation)
- Infections (orchite)
- Torsion testiculaire
- Chimiothérapie / radiothérapie
- Médication (hormonal)
- Déficience hormonale (idiopathique, syndrome de Kallmann)

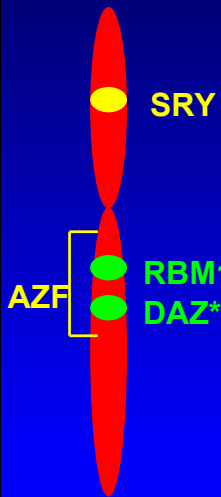
Azoospermie Non Obstructive : Caractéristiques Cliniques

- Volume testiculaire réduit (<15 cc)
- Niveaux sériques de FSH accrus
- Possibilité de niveau élevé de LH et de niveau faible de testostérone
- Volume de sperme or réduit (hormonal)
- Biopsie testiculaire anormale (spermatogenèse absente ou arrêtée)

Extraction Testiculaire de Sperme pour Azoospermie Non Obstructive

- ~10-15% des hommes infertiles ont une NOA
- Toutefois,
 - La présence de spz. testiculaires dépend de la sévérité de la NOA (~50% des hommes avec NOA ont des sites de production de sperme)
 - Le prélèvement de spz. dépend de la technique d'extraction et des niveaux de FSH & Inhibin B
Silber et al, Hum Reprod 1997, Schlegel et al, Hum Reprod 1999
 - Le prélèvement de spz. testiculaire dépend de la présence ou de l'absence de microdélétions du chromosome Y (détecté chez 10-15% of des hommes avec NOA)
Hopps et al, Hum Reprod 2003

Evaluation Génétique: Microdélétions du chromosome Y



- Les microdélétions Y se produisent dans la région AZF (AZoospermia factor avec sous-régions a,b,c)
- Le prélèvement de spz. testiculaires est faible chez les hommes avec microdélétions dans les régions AZFa et/ou AZFb

Conséquence de reproduction:

- Progéniture male (FIV/ICSI) porte la même microdélétion que leur père.

Reijo et al, *Lancet* 1996

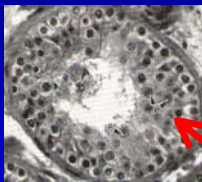
Vogt et al, *Hum Mol Genet* 1996

Pryor et al, *NEJM* 1997

Girardi et al, *Human Reprod* 1997

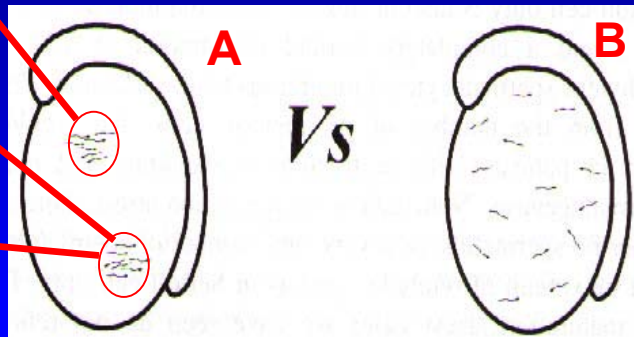
*RNA binding motif, Deleted in Azoospermia

Azoospermie Non Obstructive : Distribution Intra-Testiculaire de Sperme



- Sites de production de spz. testiculaires peuvent être
 - Irréguliers et focaux (A) ou
 - homogènes et épars (B)
- La technique de prélèvement devrait augmenter le rendement de spz. et diminuer la qté de tissu prélevée

Silber et al, *Hum Reprod* 1997, Schlegel et al, *Hum Reprod* 1999



Azoospermie Non-Obstructive: Options de Prélèvement de Sperme

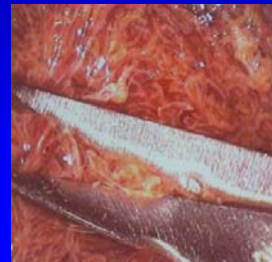
- **Biopsies ouvertes simples/multiples**

- techniquement simple
- perte importante de tissu (>500 mg)
- effet adverse potentiel sur la fcn endocrine



- **Microdissection et micro-TESE**

- techniquement compliquée
- perte minimale de tissu (~10 mg)



Ezeh et al, *Hum Reprod* 1998

Silber et al, *Hum Reprod* 1997

Schlegel et al, *Hum Reprod* 1999

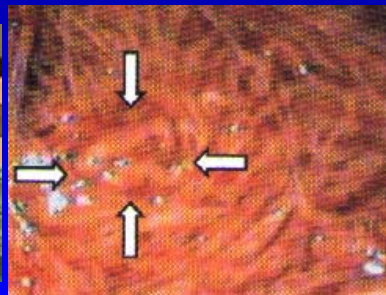
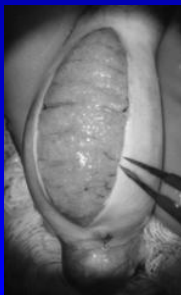
Extraction Microchirurgicale de Spz. Testiculaires (Micro-TESE)

- La spermatogenèse normale peut être différenciée des zones de spermatogenèse abolie (Sertoli cell-only syndrome) par microscopie

- Tubules dilatés → normal or maturation arrêtée
- Tubules fin, tissu cicatriciel → motif du syndrome Sertoli cell-only

Silber et al, *Hum Reprod* 1997

Schlegel et al, *Hum Reprod* 1999



Azoospermie Non Obstructive: Résultats avec FIV / ICSI

	<u>NOA</u>	<u>OA</u>
Prélèv. de spz. testic.	~50%	~100%
Taux de fertilisation	40-60%	40-70%
Tx de gross. cliniques	30-40%	30-50%

Nagy et al, *Fertil Steril* 1995

Devroey et al, *Hum Reprod* 1996

Kahraman et al, *Hum Reprod* 1996

Palermo et al, *Hum Reprod* 1999

Azoospermie Non-Obstructive : Directions Futures

- Transplantation de cellules germinales
- Maturation de cellules germinales in vitro
- Thérapie génique

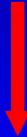
Directions Futures : Transplantation de Cellules Germinales

- Transplantation de cellules germinales rat à souris ✓

Clouthier et al, *Nature* 1996

- Cryopréservation de cellules souches ✓

Avarbock et al, *Nature Med* 1996



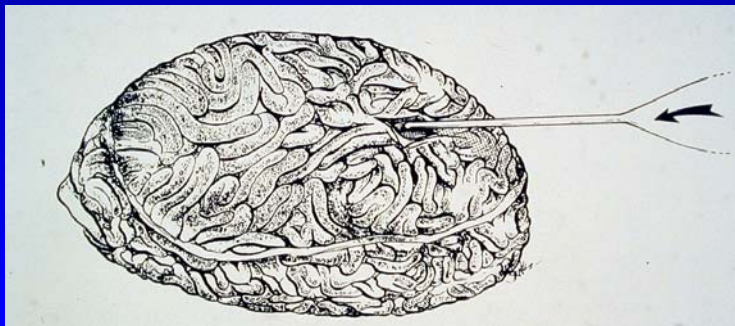
- Lignée germinale male maintenant immortelle (chez les rongeurs)

Directions futures: Transplantation de Cellules Germinales

Spermatogenèse de rat dans le testicule de souris

Clouthier et al, *Nature* 1996

- Transfert de cellules germinales d'un donneur intra-testiculaire (rat)



Directions futures: Transplantation de Cellules Germinales

Spermatogenèse de rat dans le testicule de souris

Clouthier et al, *Nature* 1996

- Les souris ont été tuées entre les jours 42 et 127 après le transfert
- L'histologie testiculaire et le fluide épидидymaire ont été examinés



Directions futures: Transplantation de Cellules Germinales

Résumé

Transplantation de rongeur à souris:

- Maintien à long terme de CG et maturation en spermatozoïdes sont les deux possible

Transplantation de NON-rongeur à souris:

- Maintien à long terme de CG possible mais maturation en spermatozoïdes n'a pas encore été accomplie
- Dans le futur, des raffinements dans la transplantation de CG pourraient en faire une approche viable pour le traitement de l'infertilité masculine sévère

Brinster et al, *Science* 2002

Directions Futures:

Maturation de Cellules Germinales In Vitro

Principes

- Promouvoir la différenciation plus poussée de CG in vitro (au-delà de celle établie in vivo)
- Utiliser des CG matures in vitro dans l'AMP (la maturation doit dépasser le stade de spermatide ronde)

Conditions in vitro

- Cellules de support:
 - Cellules de Sertoli avec taux élevé de FSH, T
 - Cellules Vero
- Processus sensible à la température (~30°C)

Maturation de Cellules Germinales In Vitro

Deux étapes "observées" in vitro

1. Différenciation de Spermatides (avec cellules de Sertoli)



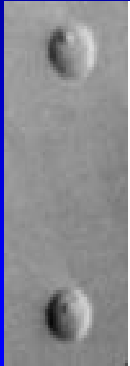
2. Progression Méiotique (avec CS & Cell. Vero)



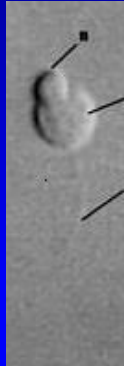
Maturation de Cellules Germinales In Vitro

- Évaluation de la maturation in vitro des CG vérifiée par **échantillonnage en série (Tesarik)** ou **évaluation en série de CG individuelles (Tanaka)** par microscopie lumineuse

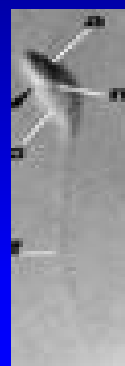
Spermatide rond



Spermatide en élongation



Spermatide allongé



Maturation de Cellules Germinales In Vitro: Succès et Limitations

Succès

- Grossesse avec ICSI possible avec spermatides allongés maturés in vitro

Limitations et Questions

- Besoin initial de maturation au stade de spermatocyte
- Tesarik – tubules séminifères (Cell. Sertoli)
 - Progression méiotique & maturation de spermatides observées
 - Erreur d'échantillonnage?
- Tanako – Co-culture de Cellule Vero + CG
 - Progression méiotique mais pas de maturation de spermatides
- Effectué par un petit nombre de laboratoires

Tesarik et al, *Hum Reprod* 1998, 2000, Tanako et al, *Fertil Steril* 2003
Cremades et al, *Hum Reprod* 1999, Sousa et al, *Hum Reprod* 2002

Directions Futures: Thérapie Génique

Restauration de spermatogenèse par transfert de gène viral

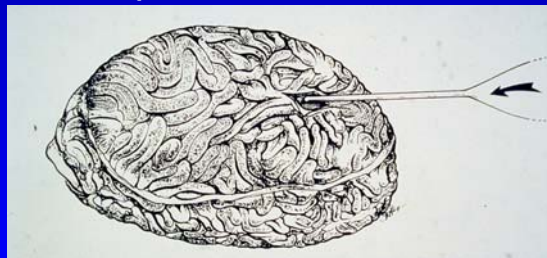
- Les souris mutées avec défaut de cell. de Sertoli spécifique (causant l'infertilité) ont été traitées par injection intratesticulaire d'un vecteur viral
- La spermatogenèse a été rétablie et les spz. ont été utilisés dans la FIV/ICSI pour générer une progéniture normale

Kanatsu-Shinohara et al, *PNAS* 2001

Ikawa et al, *PNAS* 2002

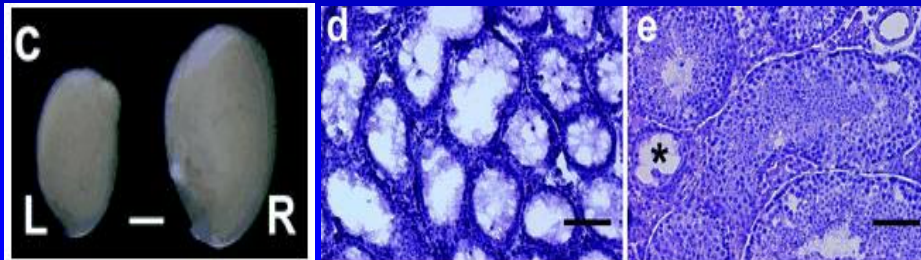
Transfert de Gène Viral: Design Expérimental

- Plasmides contenant le vecteur viral (portant le gène *c-kit* ligand) ont été construits
- Souris mutées (avec *c-kit* ligand défectueux) ont été utilisées comme receveuses
- Transfert du vecteur viral intratesticulaire dans le testicule D (le testicule G a servi de contrôle)



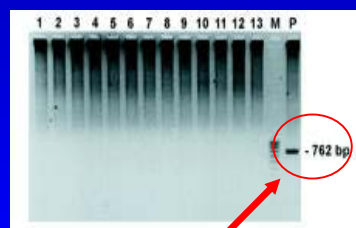
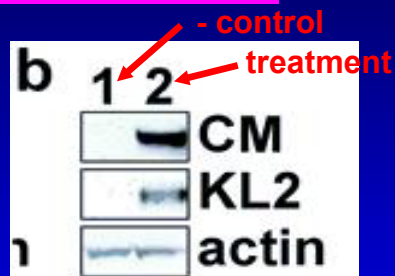
Transfert de Gène Viral: Design Expérimental

- Les souris ont été tuées 90 jours après le transfert de gène
- Poids et histologie testiculaires G (contrôle) & D (traité) ont été examinés



Transfert de Gène Viral: Design Expérimental

- Transduction de cellules de Sertoli (somatiques)
 - Analyse par Western blot du transfert de gène (KL2)
- Pas de transmission de lignée germinale
 - Analyse PCR pour détecter la présence de transgène



+ control

Thérapie Génique

- La thérapie génique peut devenir une approche prometteuse pour traiter les hommes avec des causes génétiques définies d'infertilité
 - Microdélétions du chromosome Y
 - Anomalies génétiques des cell. De Sertoli
- Risques associés à la procédure ???
 - Confirmer l'absence de mutations de novo
 - Confirmer l'absence de transmission de lignée germinale
 - Faisabilité chez les primates

Usage Optimal de l'AMP chez les Hommes Azoospermiques

- Une évaluation minutieuse est essentielle pour optimiser le potentiel de fertilité masculine et définir les risques génétiques
- Les techniques de prélèvement de sperme sont généralement sécuritaire et efficace
- Il reste à développer des techniques pour optimiser la spermatogenèse des hommes avec NOA