



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2016

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**La stimulation de la spermatogenèse par le citrate de clomiphène dans
l'azoospermie et la cryptozoospermie : autoconservations et
grossesses**

Présentée et soutenue publiquement le 21 juin 2016 à 16h
Au Pôle Formation
Par Valentine Carlier Loof

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Franck Broly

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau

Madame le Professeur Sophie Catteau-Jonard

Monsieur le Docteur Jean-Marc Rigot

Madame le Docteur Bérengère Ducrocq

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Valérie Mitchell

Institut de Biologie de la Reproduction- CBP Lille

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

AM	Arrêt de Maturation
AM-cyte	Arrêt de maturation au stade spermatocyte
AM-tide	Arrêt de maturation au stade spermatide
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
AO	Azoospermie obstructive
ANO	Azoospermie non obstructive
CECOS	Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
ICSI	Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
LH	Hormone lutéinisante
SCOS	Syndrome des cellules de Sertoli seules only
TESE	Extraction de spermatozoïdes testiculaires

Table des matières

Résumé	18
Introduction	19
Généralités.....	21
I. La spermatogenèse	21
II. Le contrôle hormonal de la spermatogenèse.....	23
III. Spermatogenèse et anomalies	26
A. Les normes OMS	26
B. L'azoospermie et la cryptozoospermie	27
IV. L'extraction testiculaire de spermatozoïdes	32
A. Déroulement.....	32
B. Phénotypes histologiques et traduction clinico-biologique	33
V. Le citrate de clomiphène.....	35
A. Structure (<i>Figure 9</i>).....	35
B. Propriétés et mode d'action.....	35
A. Métabolisme	37
Matériels et méthodes.....	40
I. Patients.....	40
A. Inclusion	40
B. Exclusion	42
II. Modalités de traitement	42
III. Suivi clinique (<i>tableau 2</i>).....	43
A. En amont de l'inclusion	43
B. Consultation d'inclusion : M0.....	43
C. Suivi à 1 mois de traitement : M1	43
D. Suivi à 3 mois, 6 mois et 9 mois de traitement : M3, M6, M9	43
IV. Suivi biologique et sanguin (<i>tableau 2</i>)	44
A. Bilan initial à l'inclusion : M0.....	44
B. Bilan à 1 mois de traitement : M1	44
C. Bilans à 3 mois, 6 mois et 9 mois de traitement : M3, M6, M9	44
V. Tentatives d'autoconservation spermatique au CECOS	46
A. Procédure d'autoconservation spermatique	46
B. Congélation du sperme	46
VI. Extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires (TESE)	47
A. Mode opératoire de la biopsie de pulpe testiculaire	47
B. Extraction de spermatozoïdes à partir de la pulpe testiculaire, au laboratoire (TESE)	48
C. Congélation des pailles de sperme testiculaire	49
D. Etude histologique (32)	49
E. Analyse statistique	49

Résultats	50
I. Caractéristiques clinico-biologiques avant traitement par le citrate de clomiphène.....	50
II. Suivi hormonal durant le traitement par citrate de clomiphène	52
A. Groupe « azoospermes »	52
B. Groupe « azoospermes virtuels ».....	54
C. Groupe « cryptozoospermes »	55
III. Suivi spermiologique.....	56
A. Groupe « azoospermes »	56
B. Groupe « azoospermes virtuels ».....	56
C. Groupe « cryptozoospermes »	56
IV. Suivi chirurgical testiculaire	57
A. Groupe « azoospermes »	57
B. Groupe « azoospermes virtuels ».....	57
C. Groupe « cryptozoospermes »	57
V. Conclusion des résultats.....	58
A. Groupe « azoospermes »	58
B. Groupe « azoospermes virtuels ».....	59
C. Groupe « cryptozoospermes »	60
D. Récapitulatif des autoconservations spermatiques	61
VI. Résultats en AMP	62
A. Résultats selon le phénotype clinique	62
B. Résultats selon le phénotype histologique testiculaire	64
VII. Réponse hormonale à la stimulation par citrate de clomiphène selon l'autoconservation spermatique.....	66
A. LH moyenne	68
B. Testostérone totale moyenne	69
C. FSH moyenne	70
D. Inhibine B moyenne.....	71
Discussion	72
Conclusion	83
Références bibliographiques	84

RESUME

Contexte : L'infertilité touche un nombre croissant de couples, avec une cause masculine pure dans 20% des cas. Depuis 1992, la FIV-ICSI a révolutionné la prise en charge des patients ayant une atteinte spermatique sévère, amenant un regain d'intérêt pour certains traitements, tels que le citrate de clomiphène, utilisé de façon empirique dans les années 1980 dans le traitement des infertilités masculine idiopathiques.

Méthodes : Un total de 69 patients a reçu un traitement par citrate de clomiphène prolongé 9 à 12 mois : 25 patients « azoospermes », 11 patients « azoospermes virtuels », et 33 patients « cryptozoospermes ». Les patients avaient un suivi clinique, biologique et des tentatives d'autoconservation de sperme éjaculé à 3, 6 et 9 mois de traitement. Une extraction testiculaire de spermatozoïdes après traitement pouvait ensuite être décidée au cas par cas.

Résultats : Trois/25 patients « azoospermes » (12%) ont eu une congélation de sperme testiculaire et de très rares spermatozoïdes sans congélation possible ont été observés pour 4 autres patients (16%). Deux couples ont fait des tentatives en AMP et ont eu 2 enfants. Quatre/11 patients « azoospermes virtuels » (36,4%) ont autoconservé des pailles : 2 sur sperme testiculaire, et 2 sur sperme éjaculé. Un enfant est né en FIV-ICSI. Vingt-deux/33 patients « cryptozoospermes » (66,7%) ont autoconservé, dont 16 patients sur sperme éjaculé (52%). Neuf/17 patients ayant eu une extraction testiculaire de spermatozoïdes après traitement ont congelé du sperme testiculaire (52,9%). Douze enfants sont nés en FIV-ICSI. Au total, pour les 69 patients inclus, 15 enfants sont nés pour 13 couples (18,9%).

Conclusion : Ce traitement, a un retentissement hormonal dans les 3 groupes de patients traités. Il semble bénéfique pour stimuler une spermatogenèse résiduelle, chez des patients présentant une altération de la spermatogenèse, en particulier les patients cryptozoospermes. L'effectif de notre étude apparaît cependant trop faible pour avoir une significativité statistique. Il serait intéressant, au vu de ces résultats préliminaires d'évaluer l'intérêt d'administrer ce traitement sur une plus grande cohorte de patients aux critères d'inclusion stricts, afin d'identifier plus finement les caractéristiques des patients répondeurs au traitement par citrate de clomiphène.

INTRODUCTION

L'infertilité touche un nombre croissant de couples, 9 à 14% des couples en âge de procréer auraient ainsi des difficultés à concevoir (1,2).

En France, 1 couple sur 7 consultera ainsi pour infertilité durant sa vie reproductive. Le bilan d'infertilité met en évidence des causes mixtes dans 39% des cas et une cause d'origine masculine pure dans 20% des cas (2).

Chez ces patients, une azoospermie (absence de spermatozoïde), non obstructive, due à une altération de la spermatogenèse, est retrouvée dans 6% des cas (soit 1% de la population générale) (3).

Une oligozoospermie (numération de spermatozoïdes diminuée) plus ou moins sévère est retrouvée dans 2% des cas.

Avant 1992, les seules solutions de parentalité proposées aux couples présentant des altérations sévères de la spermatogenèse, à type d'azoospermie, cryptozoospermie ou oligozoospermie sévère, étaient le recours au don de gamètes ou l'adoption.

Depuis 1992 et l'avènement de la Fécondation *in vitro* de type injection intracytoplasmique de spermatozoïde (FIV-ICSI), la prise en charge de ces couples a été révolutionnée, leur offrant la possibilité d'une Assistance Médicale à la Procréation (AMP) intra-couple (4).

En effet, cette technique perfectionnée de Fécondation *in vitro* consiste à injecter un spermatozoïde, sélectionné à fort grossissement, directement dans le cytoplasme ovocytaire. Elle devient donc réalisable avec quelques spermatozoïdes, pas forcément mobiles, contrairement à la Fécondation *in vitro* de type Classique (FIVc), laquelle nécessite une bonne concentration de spermatozoïdes mobiles pour espérer obtenir une fécondation.

Cette révolution de la prise en charge en AMP a amené un regain d'intérêt pour certains traitements utilisés de façon empirique dans les années 1980 dans les infertilités masculines idiopathiques.

Le citrate de clomiphène, modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes, était largement prescrit dans ce cadre, dans les années 1970 à 1980 (5–9).

Cette molécule stimule de façon endogène la production de GnRH, ce qui augmente la production de LH et FSH endogène (10–13). Cela provoque alors une augmentation de la sécrétion de testostérone circulante et de la concentration intratesticulaire de testostérone (10). Un effet testiculaire direct pourrait également être suspecté mais n'a pas encore été mis en évidence (14).

Plusieurs études auraient ainsi démontré l'intérêt d'administrer ce type de traitement à des patients sélectionnés ayant une spermatogenèse défailante, se traduisant par une azoospermie (15–17).

En effet, plusieurs options de stimulation de la spermatogenèse ont été imaginées et sont actuellement encore testées. Ainsi, les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, les inhibiteurs de l'aromatase, les gonadotrophines, les antioxydants et même la GnRH sont des options qui ont été testées, dans des indications variables (18,19).

Notre hypothèse, est que le traitement par citrate de clomiphène, prolongé 6 à 9 mois, en augmentant les concentrations sériques de LH, FSH et testostérone, pourrait améliorer le microenvironnement testiculaire et optimiser une spermatogenèse défailante, dans certaines indications d'infertilité. Le but de ce traitement est de favoriser la remise en route d'une spermatogenèse, qui soit utilisable en FIV-ICSI.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer les indicateurs hormonaux et spermatiques d'un traitement par citrate de clomiphène chez des patients ayant une atteinte sécrétoire sévère de la spermatogenèse se traduisant par une azoospermie (absence de spermatozoïde dans le sperme), ou une cryptozoospermie (très rares spermatozoïdes dans le sperme).

Les objectifs secondaires sont d'évaluer les taux de grossesses et de naissances vivantes, à l'issue du traitement et de la prise en charge en AMP.

GENERALITES

I. La spermatogenèse

La spermatogenèse résulte de plusieurs mécanismes successifs et interdépendants. Elle se déroule au sein des tubes séminifères testiculaires, dès la puberté, sous contrôle hormonal hypothalamo-hypophysaire. Elle va permettre la différenciation des cellules germinales en spermatozoïdes.

Elle résulte de l'interaction des hormones centrales FSH et LH, avec les compartiments endocrine et exocrine testiculaires.

Le compartiment endocrine est constitué de cellules de Leydig, et de vaisseaux sanguins, au sein d'un tissu conjonctif. Il assure la synthèse des androgènes testiculaires.

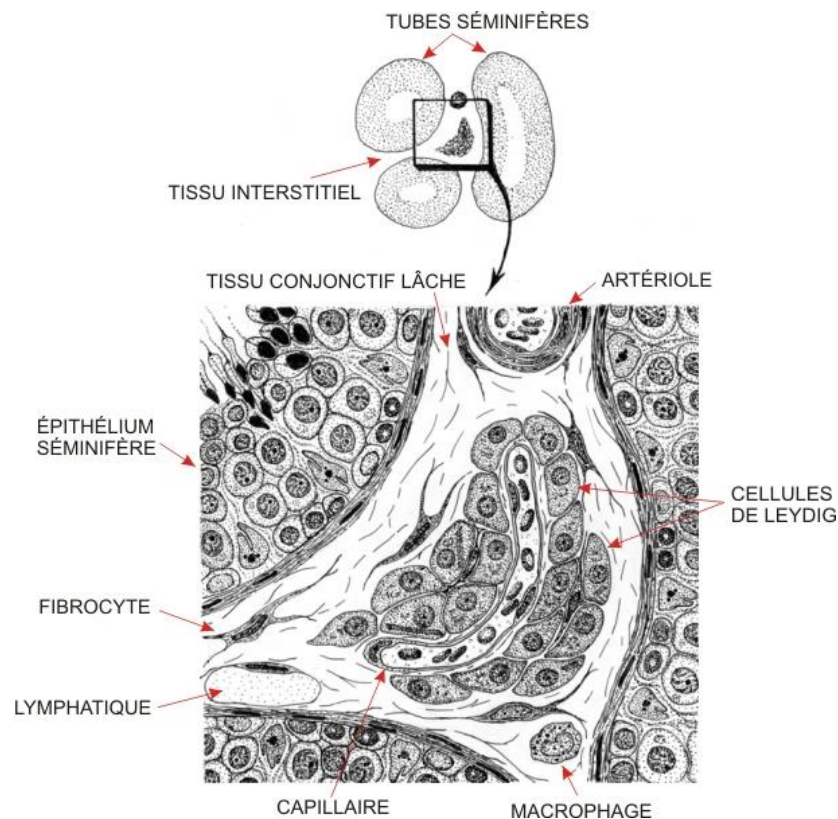


Figure 1 : Schéma de la structure du tissu interstitiel testiculaire. Il renferme des vaisseaux sanguins et des cellules de Leydig, au sein d'un tissu conjonctif. D'après Y. Clermont, *Atlas d'histologie en microscopie optique*. (20)(19)

Le compartiment exocrine comprend les tubes séminifères, qui sont constitués de cellules de la lignée germinale et de cellules de Sertoli (**Figure 1**).

Ces cellules de Sertoli vont être le support nutritionnel, structural et immunologique des cellules germinales en développement. Ce compartiment est le siège de la spermatogenèse (20) (**Figure 2**).

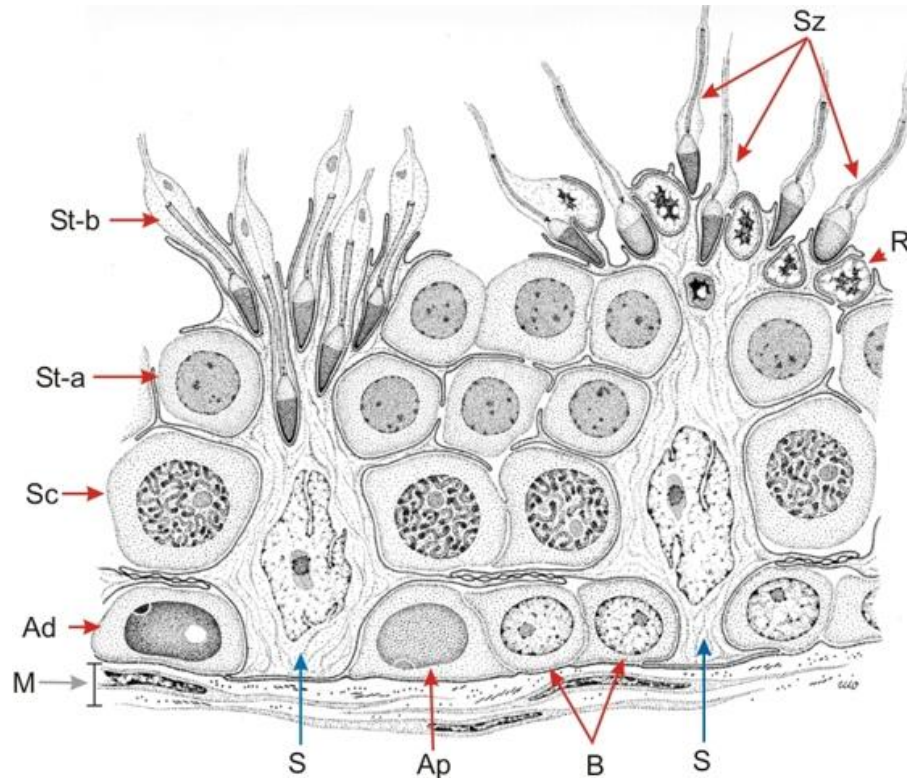


Figure 2 : Schéma de la structure d'un tube séminifère composé de cellules de Sertoli, et de cellules germinales en différenciation : spermatogonies (Ad, Ap, B), spermatocytes pachytènes (Sc), spermatides rondes (St-a), spermatides allongées (St-b) et spermatozoïdes (Sz). D'après Y. Clermont, Atlas d'histologie en microscopie optique. (19)

Lors de ce processus, les spermatogonies entrent en méiose. Elles vont subir de grandes modifications et passer par le stade de spermatocytes pour aboutir aux spermatides rondes puis allongées (20) (**Figure 3**).

C'est ensuite lors du phénomène de spermiogenèse qu'apparaissent l'acrosome, la pièce intermédiaire et le flagelle.

Les spermatozoïdes vont être libérés dans la lumière des tubes séminifères lors du phénomène de spermiation, grâce aux cellules de Sertoli, soutien de la spermatogenèse.

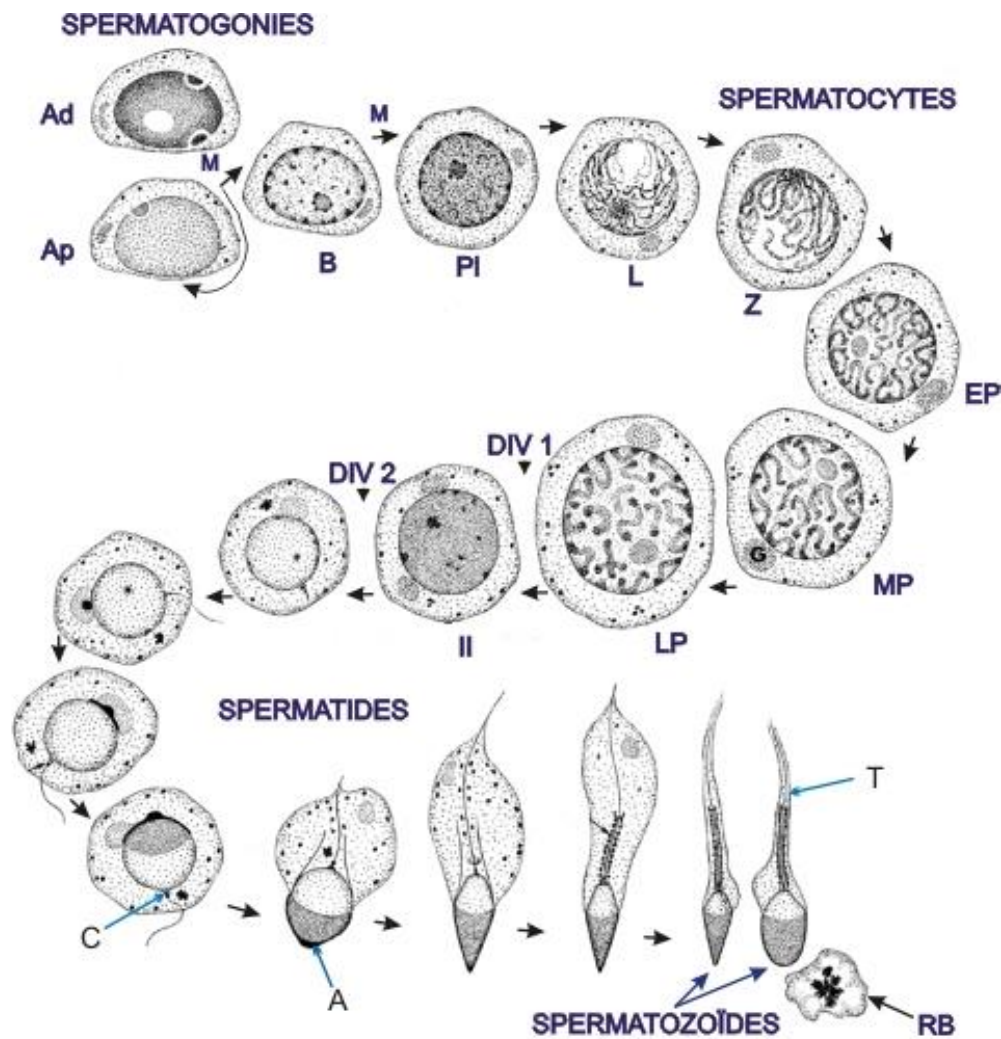


Figure 3 : Schéma illustrant un cycle de spermatogenèse. Les spermatogonies (Ad, Ap, B) se divisent et donnent naissance aux spermatocytes primaires : préleptotène (PI), leptotène (L), zygotène (Z) et pachytènes (EP, MP, LP) lesquels se transforment en spermatocytes secondaires (II). Ils vont ensuite donner les spermatides rondes puis allongées (A). Enfin lors de la spermiogenèse de nouvelles transformations donneront naissance aux spermatozoïdes. D'après Y. Clermont, *Atlas d'histologie en microscopie optique*.

Ce cycle complet de spermatogenèse est constant et dure environ 74 jours chez l'homme. Les spermatozoïdes vont ensuite achever leur maturation et acquérir leur mobilité fécondante, lors du transit épидидymaire d'une durée de 10 à 15 jours.

II. Le contrôle hormonal de la spermatogenèse

La spermatogenèse est initiée dès la puberté, par la modification des stimulations centrales hypothalamo-hypophysaires.

L'hypothalamus synthétise la GnRH qui va avoir une action de stimulation pulsatile sur l'hypophyse qui va sécréter la LH et la FSH (**Figure 4**).

L'axe LH-testostérone : La LH agit sur les cellules de Leydig, qui produisent les androgènes, notamment la testostérone, et induisent les caractères sexuels secondaires masculins (développement des organes génitaux, de la masse osseuse et musculaire, de la pilosité, maintien de la libido...).

Les androgènes, aromatisés en œstradiol au niveau de certains tissus, vont ensuite avoir un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus.

L'axe FSH-inhibine : La FSH stimule la prolifération et l'organisation des cellules de Sertoli au sein des tubes séminifères, qui sont le support de la spermatogenèse, sous l'influence de la testostérone.

Les cellules de Sertoli sécrètent l'inhibine B, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de FSH (21).

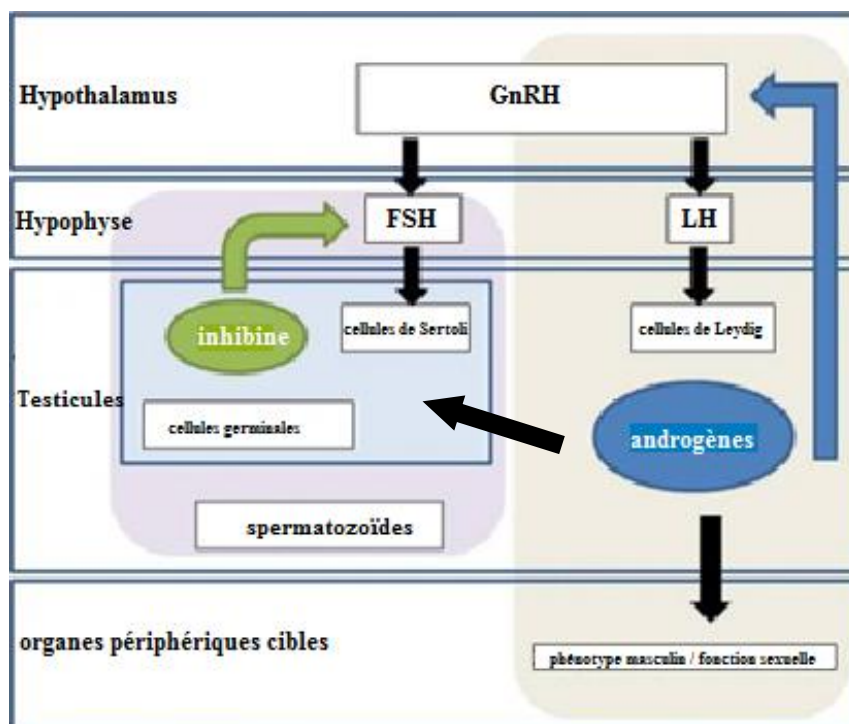


Figure 4 : Diagramme illustrant le contrôle hormonal de la fonction testiculaire d'après Schlatt et al (21).

Effets sur la spermatogenèse : La prolifération et la survie des cellules germinales dépendent fortement des gonadotrophines (21,22).

La FSH aurait un effet anti-apoptotique prédominant dans la régulation du développement des spermatogonies. Elle interviendrait dans la méiose, principalement jusqu'au stade de spermatocyte primaire pachytène (22).

La testostérone et la FSH seraient ensuite les principaux supports de la poursuite de la méiose. Ces hormones auraient un effet synergique anti-apoptotique, lié à des mécanismes moléculaires encore mal connus.

La spermiogenèse serait ensuite principalement induite par la testostérone (22).

Récepteurs hypothalamiques des œstrogènes :

Il aurait été mis en évidence que les neurones à GnRH hypothalamiques présenteraient des récepteurs aux œstrogènes (23).

Ces récepteurs seraient de plusieurs types mais les plus classiques sont les ER α et ER β . Ce sont des récepteurs membranaires qui ont une action génomique *via* les ERE (estrogen response elements). Ils auraient également une action non génomique rapide *via des* cascades de signalisation intracellulaires (23).

Ils sont tous les 2 présents au niveau du noyau arqué hypothalamique (24).

III. Spermatogenèse et anomalies

A. Les normes OMS

Le recueil de sperme reflète, entre autres, la fonctionnalité de la spermatogenèse. L'OMS a étudié les caractéristiques des éjaculats d'hommes fertiles et a pu émettre des valeurs de références pour l'analyse du sperme (25).

Le **Tableau 1** reprend les normes et principales anomalies décrites lors de l'analyse du spermogramme, selon les normes OMS (25) et l'actualisation des valeurs de référence de la classification de David modifiée (26).

Tableau 1 : Normes et anomalies observées sur le spermogramme

Normes	Anomalies décrites
Volume du recueil : 1,5 – 6 ml	<1,5 ml : Hypospermie >6 ml : Hyperspermie
Numération des spermatozoïdes : >15 millions/ml >39 millions/éjaculat	Absence de spermatozoïdes : Azoospermie Quelques spermatozoïdes après centrifugation : Cryptozoospermie <20 millions/ml ou <39 millions/éjaculat : Oligozoospermie
Mobilité à 1h : Progressive a+b : > 32% Totale a+b+c : > 40%	Mobilité progressive (a+b) à 1h < 32% ou totale (a+b+c)<40% : Asthénozoospermie
Vitalité des spermatozoïdes : >58%	Vitalité <58% : Nécrospermie
Morphologie normale des spermatozoïdes : >4% (Classification de Kruger) >23% (Classification de David modifiée)	Nombre de spermatozoïdes de forme typique < 4% (Kruger) ou <23% (David modifiée d'après Auger et al, 2016): Térazoospermie
Leucocytes : < 1 million/ml	Leucocytes > 1 million/ml: Leucospermie

B. L'azoospermie et la cryptozoospermie

1. Diagnostic

L'absence de spermatozoïde à l'examen direct du recueil, et après centrifugation correspond à une azoospermie (25).

Ce constat doit être authentifié à au moins 2 reprises, lors de recueils espacés d'au moins 3 mois, avant de conclure à une azoospermie (3).

L'absence de spermatozoïde à l'examen direct du recueil, mais la présence de spermatozoïdes après centrifugation correspond à une cryptozoospermie (25). La cryptozoospermie est très proche de l'azoospermie sécrétoire et peut fluctuer entre les spermogrammes (27,28), c'est pourquoi leurs étiologies et leurs prises en charges sont semblables (29).

2. Etiologies

Les causes d'azoospermie et de cryptozoospermie sont nombreuses. La recherche de la cause est importante pour évaluer les réponses thérapeutiques éventuelles qui pourront être proposées au patient.

Les étiologies d'une azoospermie ou d'une cryptozoospermie peuvent être divisées en trois catégories anatomiques : les causes pré-testiculaires qui regroupent les anomalies endocriniennes, les causes testiculaires par défaillance intrinsèque au testicule, et les causes post-testiculaires, relatives à une anomalie des voies séminales (3).

Toutes ces causes sont liées à 2 grands mécanismes physiopathologiques :

- un problème d'obstruction (ou excrétion), qui se manifeste par une azoospermie obstructive (AO) principalement.
- ou un problème de non obstruction (ou sécrétion), qui peut se manifester par une azoospermie non obstructive (ANO) ou une cryptozoospermie.

Il apparaît essentiel de bien différencier ces 2 mécanismes car la stratégie de prise en charge est spécifique à chacun.

a) Cause obstructive = excrétoire

Elle résulte d'une obstruction sur les voies séminales. L'atteinte se manifeste principalement par une azoospermie. Les causes de l'AO sont donc anatomiquement post-testiculaires.

La spermatogenèse testiculaire est conservée, mais les voies séminales sont interrompues. C'est un déficit excrétoire. Elle est suspectée en cas de FSH normale et de volume testiculaire conservé, sans hypogonadisme notamment.

L'interruption des voies séminales peut être liée à des causes acquises : vasectomie, obstruction épидидymaire, des déférents ou des canaux éjaculateurs. Ces obstructions acquises sont provoquées par des sténoses post-infectieuses, des atteintes lors d'interventions chirurgicales, voir une compression kystique.

L'atteinte des voies séminales peut également être congénitale, notamment par absence bilatérale des canaux déférents. Cette anomalie est fréquemment observée lors d'une mutation du gène CFTR (30).

b) Cause non obstructive = sécrétoire

Elle résulte d'une atteinte de la spermatogenèse. C'est un déficit sécrétoire d'origine pré-testiculaire ou d'origine testiculaire. Dans ce cas, on constate fréquemment une hypotrophie testiculaire, avec une FSH basse ou augmentée selon l'origine centrale ou périphérique. L'atteinte est variable de l'azoospermie à l'oligospermie sévère en passant par la cryptozoospermie.

- Causes pré-testiculaires = « centrales »

Ce sont des causes endocriniennes qui sont responsables d'un hypogonadisme hypogonadotrope. Elles sont rares (environ 1% des hommes infertiles (31)).

L'hypogonadisme peut être d'origine congénitale : le plus connu est le syndrome de Kallmann de Morsier, qui associe une anosmie à un hypogonadisme congénital dans des formes syndromiques variables (31).

Les autres formes d'hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux sans trouble de l'olfaction sont dits « idiopathiques » (31). De nombreux gènes ont été identifiés, mais pour 70%, des cas l'origine reste méconnue.

L'hypogonadisme peut être également acquis. Il est alors lié à une insuffisance hypophysaire d'origine tumorale ou non tumorale. Mais il peut aussi être lié à une cause fonctionnelle à type de dénutrition ou d'excès d'activité physique. La cause peut également être exogène par prise de neuroleptiques (provoquant une hyperprolactinémie) ou d'anabolisants.

- Causes testiculaires = « périphériques »

Ce sont des causes qui vont englober les atteintes de la spermatogenèse par défaillance intrinsèque du testicule. Ces causes sont nombreuses.

Les causes génétiques, telles que le syndrome de Klinefelter, les atteintes autosomiques à type d'inversion ou translocation équilibrée, ou les micro-délétions du chromosome Y sont de grandes pourvoyeuses d'atteintes sécrétoires de la spermatogenèse. Ces anomalies sont parfois détectées lors du bilan d'une infertilité avec la découverte d'une azoospermie ou d'une cryptozoospermie.

L'atteinte testiculaire peut également être liée à d'autres causes telles qu'une varicocèle, un antécédent de cryptorchidie uni ou bilatérale, un traumatisme testiculaire important, une atteinte ischémique du testicule par torsion ou lésion chirurgicale, une orchite ourlienne...

Les causes sécrétoires sont aussi fréquemment exogènes suite à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie, à une exposition à des toxiques professionnels ou à la chaleur.

La présence d'un tabagisme actif, d'une consommation régulière d'alcool ou de drogues sont également recherchées.

Les atteintes sécrétoires sans étiologie identifiée sont dites d'origine « idiopathique » et représentent environ 36% des causes.

3. Bilan étiologique devant une azoospermie ou une cryptozoospermie

Le bilan étiologique de l'azoospermie ou la cryptozoospermie, confirmée sur 2 spermogrammes, est essentiel pour différencier l'AO de l'ANO.

L'identification de la cause étiologique sera primordiale pour proposer le traitement le plus adapté et informer le patient du pronostic.

Le bilan initial comporte un historique médical minutieux accompagné d'un examen andrologique complet à la recherche de signes d'hypogonadisme (30).

Cet examen initial sera complété par une évaluation endocrinienne avec un dosage de la testostérone totale, de la FSH, de la LH et de l'inhibine B sériques

Une recherche de spermatozoïdes dans les urines doit être demandée en cas d'hypospermie inférieure à 1 ml (30).

L'appareil génital masculin sera exploré lors d'une échographie scrotale plus ou moins accompagnée d'une échographie endorectale, selon les données cliniques et spermatiques. Cela permettra de constater une éventuelle anomalie des voies urogénitales (30).

L'analyse de la composition biochimique du liquide séminal permettra d'argumenter une origine excrétoire ou sécrétoire (3).

Le bilan sera systématiquement complété par des analyses génétiques : caryotype sur lymphocytes sanguins, recherche des micro-délétions AZF, et en cas d'atteinte obstructive, une recherche des mutations du gène CFTR (30). Selon les résultats, un conseil génétique sera demandé avant prise en charge en AMP (3).

Une proposition de démarche diagnostique face à une altération très sévère du spermogramme, à type d'azoospermie ou d'oligozoospermie sévère, a été décrite dans la littérature, par notre équipe (32) (**Figure 5**).

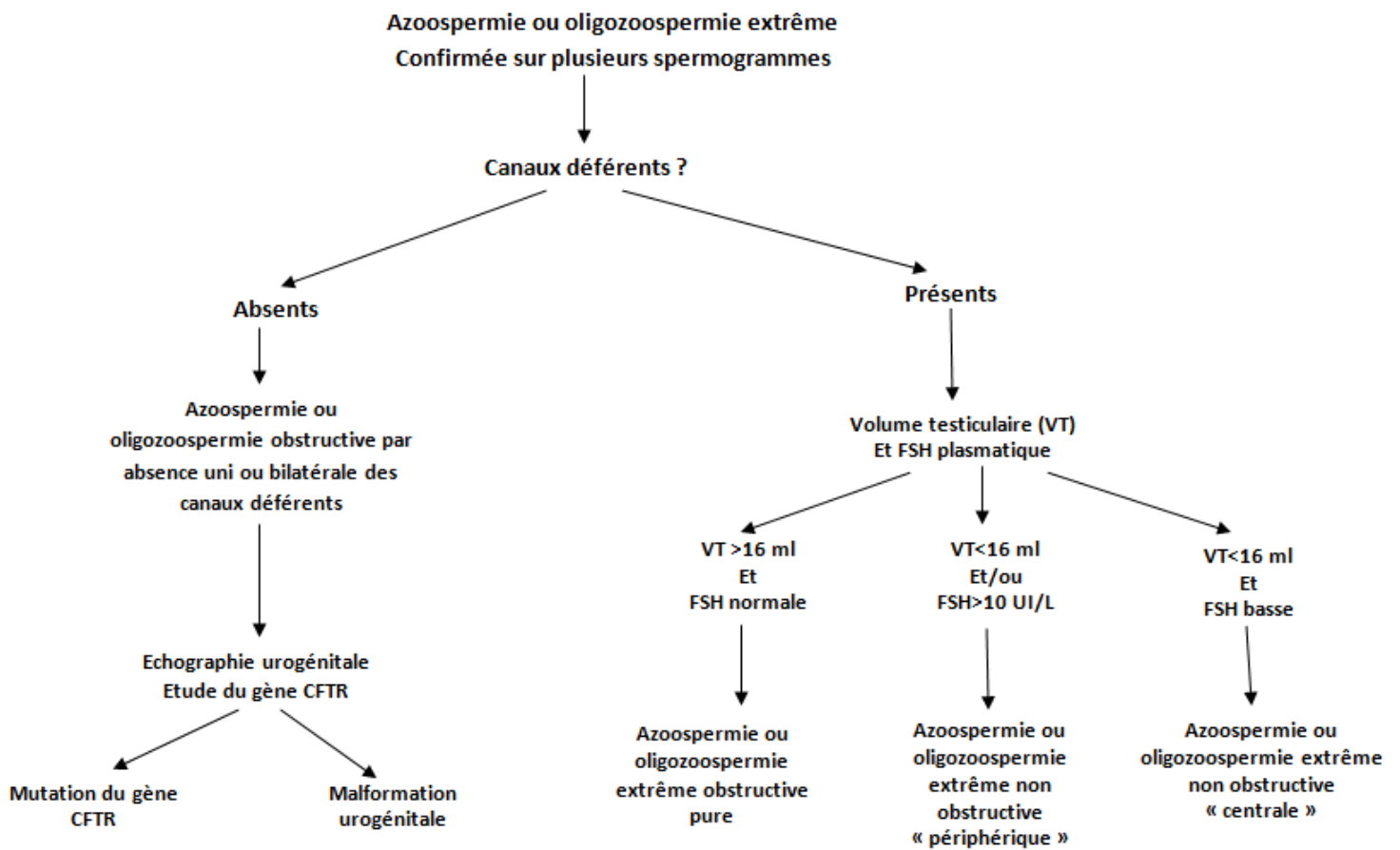


Figure 5 : Algorithme diagnostique face à une azoospermie ou une oligozoospermie extrême d'après Robin et al (32).

IV. L'extraction testiculaire de spermatozoïdes

A. Déroulement

La biopsie testiculaire (BT) à visée d'extraction testiculaire de spermatozoïdes (TESE) a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1994 (33). La TESE est principalement indiquée chez les patients avec des atteintes sévères de la spermatogenèse (29,34–36). L'objectif principal de cette intervention est de confectionner des pailles de sperme testiculaire qui soient utilisables en FIV-ICSI.

Ainsi elle concerne principalement les patients azoospermes et les patients cryptozoospermes ayant une numération insuffisante pour autoconserver le sperme éjaculé.

Certains patients oligozoospermes très sévères n'ayant pas pu autoconserver peuvent également être concernés.

D'autres patients suivis en Andrologie et ayant une atteinte de l'éjaculation sont parfois amenés à subir une TESE, la stimulation par alpha-stimulant (Gutron®) et vibreur n'ayant pas permis d'obtenir un éjaculat.

L'extraction chirurgicale de pulpe testiculaire se déroule au bloc opératoire, sous anesthésie générale. L'abord testiculaire est unilatéral ou bilatéral selon les cas. Au cours de l'intervention, le chirurgien excise un fragment de pulpe testiculaire pour l'extraction testiculaire de spermatozoïdes (TESE), laquelle se déroule au laboratoire de Biologie de la Reproduction, et un autre fragment pour le diagnostic histologique (37).

Le fragment destiné au laboratoire de Biologie de la Reproduction y est acheminé rapidement. Il est ensuite dilacéré dans le but d'extraire et de conserver les spermatozoïdes.

Si un nombre suffisant de spermatozoïdes est observé pour qu'on ait des spermatozoïdes qui résistent à la décongélation, des pailles de sperme testiculaire sont réalisées.

B. Phénotypes histologiques et traduction clinico-biologique

Le fragment destiné à l'analyse histologique va permettre de documenter l'atteinte suspectée de la spermatogenèse. Les 3 phénotypes histo-pathologiques fréquemment rencontrés dans les altérations spermatiques à type d'azoospermie ou de cryptozoospermie (32) sont :

- ❖ Les hypospermatogénèses (HYPO) : les tubes séminifères peuvent être de taille normale ou diminuée. On observe des cellules germinales en nombre diminué au sein des tubes séminifères.

Si elles évoluent jusqu'aux spermatozoïdes, c'est une hypospermatogénèse complète. Au contraire, si on n'observe pas de formes matures telles que les spermatides et les spermatozoïdes, on parlera d'hypospermatogénèse incomplète (**Figure 6**).

La prévalence des hypospermatogénèses dans l'azoospermie est de 32% (38).

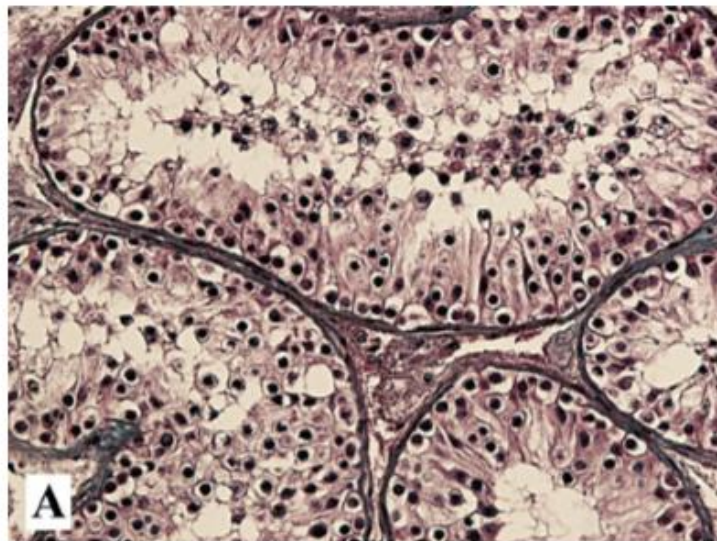


Figure 6 : Coupe histologique de biopsie testiculaire avec une hypospermatogénèse incomplète, d'après Robin et al. (32).

- ❖ Le Syndrome des cellules de Sertoli seules only (SCOS) : les tubes séminifères sont diminués de taille, la gaine péri-tubulaire est épaissie, on observe des cellules de Sertoli, mais aucune cellule germinale dans tous les tubes séminifères (SCOS pur) (**Figure 7**). Sa prévalence serait de 15,7% (38). Si quelques cellules germinales résiduelles sont vues dans les tubes séminifères, on parlera de SCOS mixte.

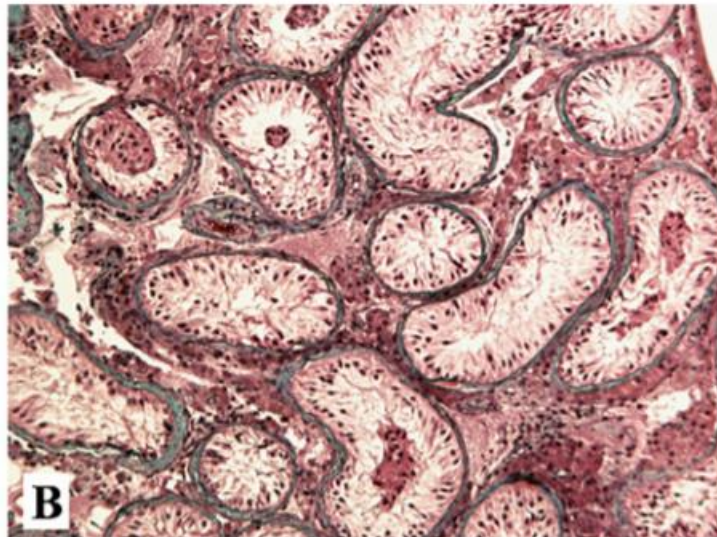


Figure 7 : coupe histologique de biopsie testiculaire avec un SCOS pur, d'après Robin et al (32).

- ❖ Les Arrêts de maturation (AM) : les tubes séminifères sont de taille conservée. On observe des cellules de Sertoli et des cellules germinales en grand nombre, jusqu'à un certain stade de la spermatogénèse. On définit plusieurs types d'arrêts de maturation selon le niveau du blocage de la spermatogénèse. Un arrêt de maturation peut ainsi être observé au stade spermatogonie (pré-méiotique) (**Figure 8 B**) avec une prévalence de 1,7%, au stade spermatocyte (méiotique) (**Figure 8 D**) avec une prévalence de 4,1%, ou plus tardivement au stade spermatide (post-méiotique) avec une prévalence de 10,1% (38).

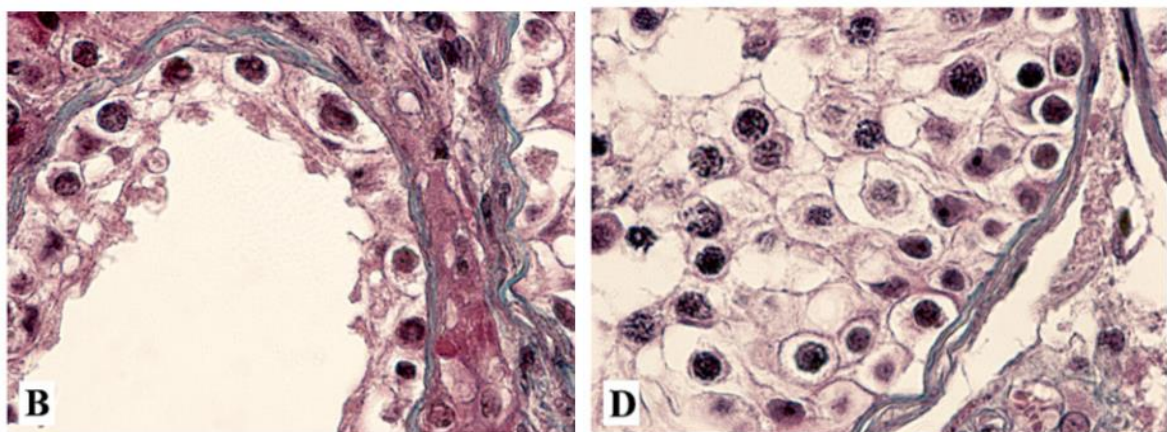


Figure 8 : coupes histologiques de biopsies testiculaires avec des arrêts de maturation aux stades spermatogonie (**B**) et spermatocyte (**D**), d'après Robin et al (32).

Ces phénotypes histologiques peuvent présenter un aspect identique dans tous les tubes séminifères. On parle alors de phénotype pur. Mais ces phénotypes histologiques peuvent également être associés de façon variable selon les tubes séminifères, on parle alors d'histologie mixte, plus fréquente (32).

V. Le citrate de clomiphène

A. Structure (Figure 9)

Le citrate de clomiphène est composé de deux isomères géométriques, l'enclomiphène (le (E)-clomiphène), le plus actif, et le zuclomiphène (le (Z)-clomiphène), à un ratio de 3/2 (39,40).

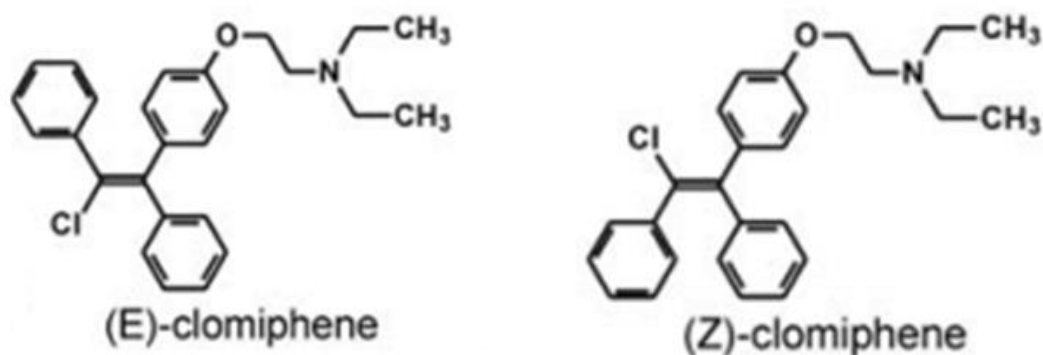


Figure 9 : Structure moléculaire du citrate de clomiphène, d'après Human Molecular Genetics, 2012, Vol 21, No. 5

B. Propriétés et mode d'action

L'enclomiphène aurait principalement des propriétés anti-œstrogéniques chez l'homme. C'est cet isomère qui bloquerait le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol au niveau hypothalamique.

Le zuclomiphène, ne posséderait pas d'action anti-œstrogénique à des concentrations physiologiques. Il pourrait néanmoins agir comme un agoniste, à dose élevée.

Pour bien comprendre le mode d'action du citrate de clomiphène, il est nécessaire de rappeler que c'est la testostérone qui est l'androgène majeur chez l'homme. Elle exerce son action directement, ou par l'intermédiaire de sa bioconversion en un androgène plus puissant la di-hydro-testostérone, ou par l'intermédiaire d'un œstrogène puissant, l'œstradiol (41).

La testostérone provient principalement des cellules de Leydig testiculaires (>95%), mais une très petite quantité de testostérone provient de la surrénale et du cerveau. La testostérone est métabolisée en œstradiol par l'aromatase (41).

Cette aromatisation est ainsi source de 75 à 90% des œstrogènes sériques chez l'homme. Elle a lieu dans les tissus périphériques (graisse) principalement, mais également en plus petite proportion dans la peau, le rein, l'os et le cerveau (41).

Une petite quantité serait également synthétisée à partir du testicule, directement dans le sang (15%) (41).

Le citrate de clomiphène (Clomid®) est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM) de 1^{ère} génération.

Analogue structurel des œstrogènes, le citrate de clomiphène se fixe sur les récepteurs aux œstrogènes hypothalamiques.

D'une part, il est antagoniste de la liaison du 17-β-œstradiol à son récepteur au niveau du noyau arqué hypothalamique, par un mécanisme d'inhibition compétitive (12,13). C'est ainsi qu'il inhibe le rétrocontrôle négatif physiologique de l'œstradiol sur l'hypothalamus (**Figure 10**).

Le « blocage » des récepteurs aux œstrogènes, qui ne peuvent plus lier l'œstradiol, simule donc un manque d'œstrogènes au niveau hypothalamo-hypophysaire.

En réponse à ce « manque », l'hypothalamus augmente, de façon endogène, la fréquence et l'intensité des pulses de GnRH, et stimule donc la production de LH et FSH hypophysaires.

D'autre part, le citrate de clomiphène augmenterait la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH (12).

Ainsi, par ces deux mécanismes combinés, le citrate de clomiphène stimule la sécrétion hypophysaire de LH et de FSH et augmente la concentration sanguine et intra-testiculaire d'androgènes.

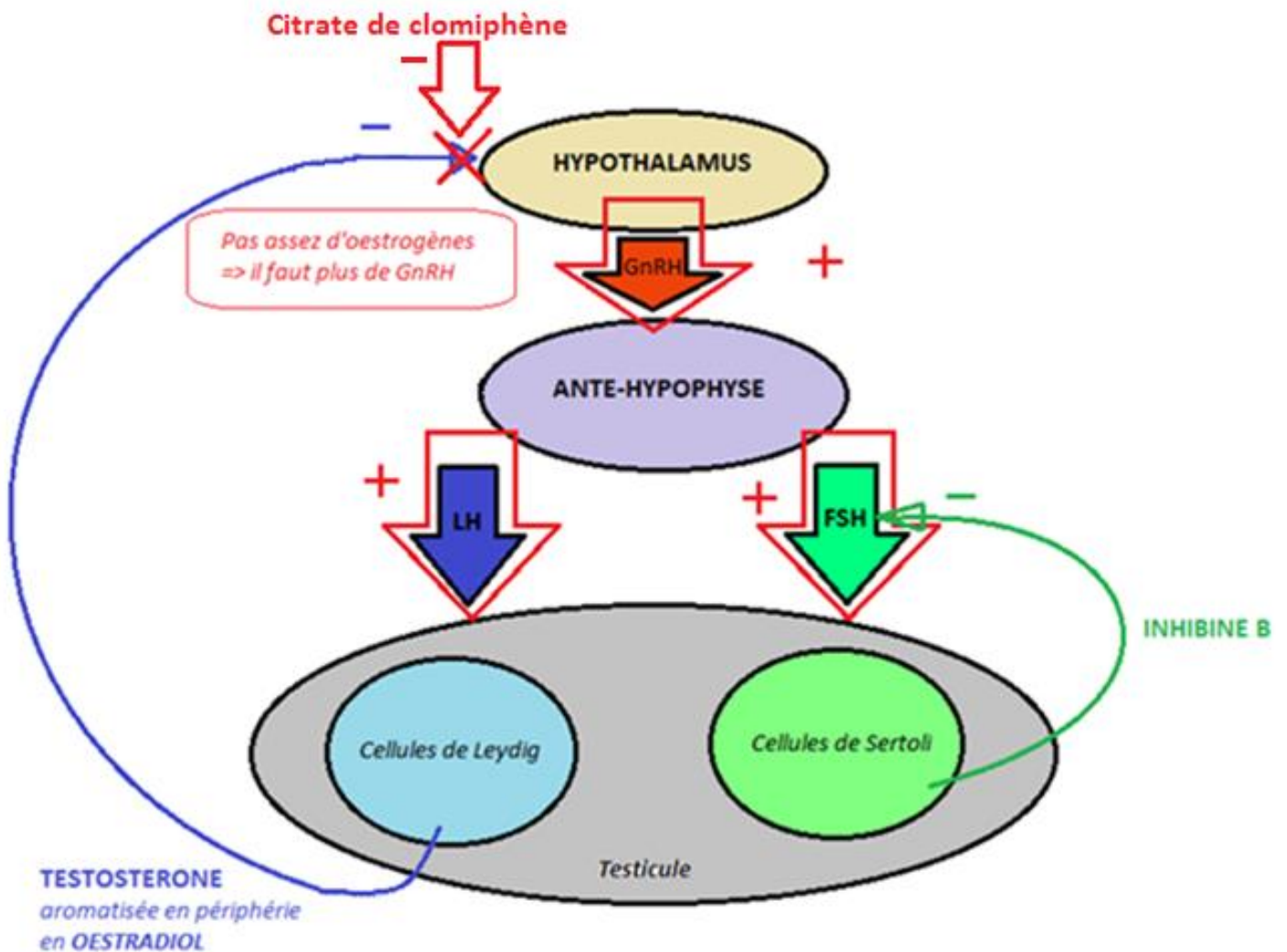


Figure 10 : schéma illustrant le mode d'action du citrate de clomiphène

A. Métabolisme

Le citrate de clomiphène est principalement métabolisé par des complexes enzymatiques de synthèse hépatique, les cytochromes P450. Ce sont des hémoprotéines à fonction de détoxification (42).

Les cytochromes P450 sont très nombreux et regroupent des enzymes, des transporteurs et des facteurs de modulation génique, qui ont muté avec l'évolution pour s'adapter à l'environnement auquel ils sont soumis.

Il existe 54 cytochromes P450 chez l'homme qui métabolisent des composés endogènes ainsi que des xénobiotiques, dans un but commun de détoxification de l'organisme.

Le métabolisme du citrate de clomiphène est donc assez complexe et met en jeu de nombreux cytochromes P450 (**Figure 11**).

Ainsi, cela serait principalement les cytochromes P450 2D6 (CYP2D6) et 3A4 (CYP3A4) qui métaboliseraient le citrate de clomiphène (43).

Le CYP2D6, qui aurait notamment un rôle prépondérant dans le métabolisme du (E)-clomiphène, l'isomère le plus actif (13,43).

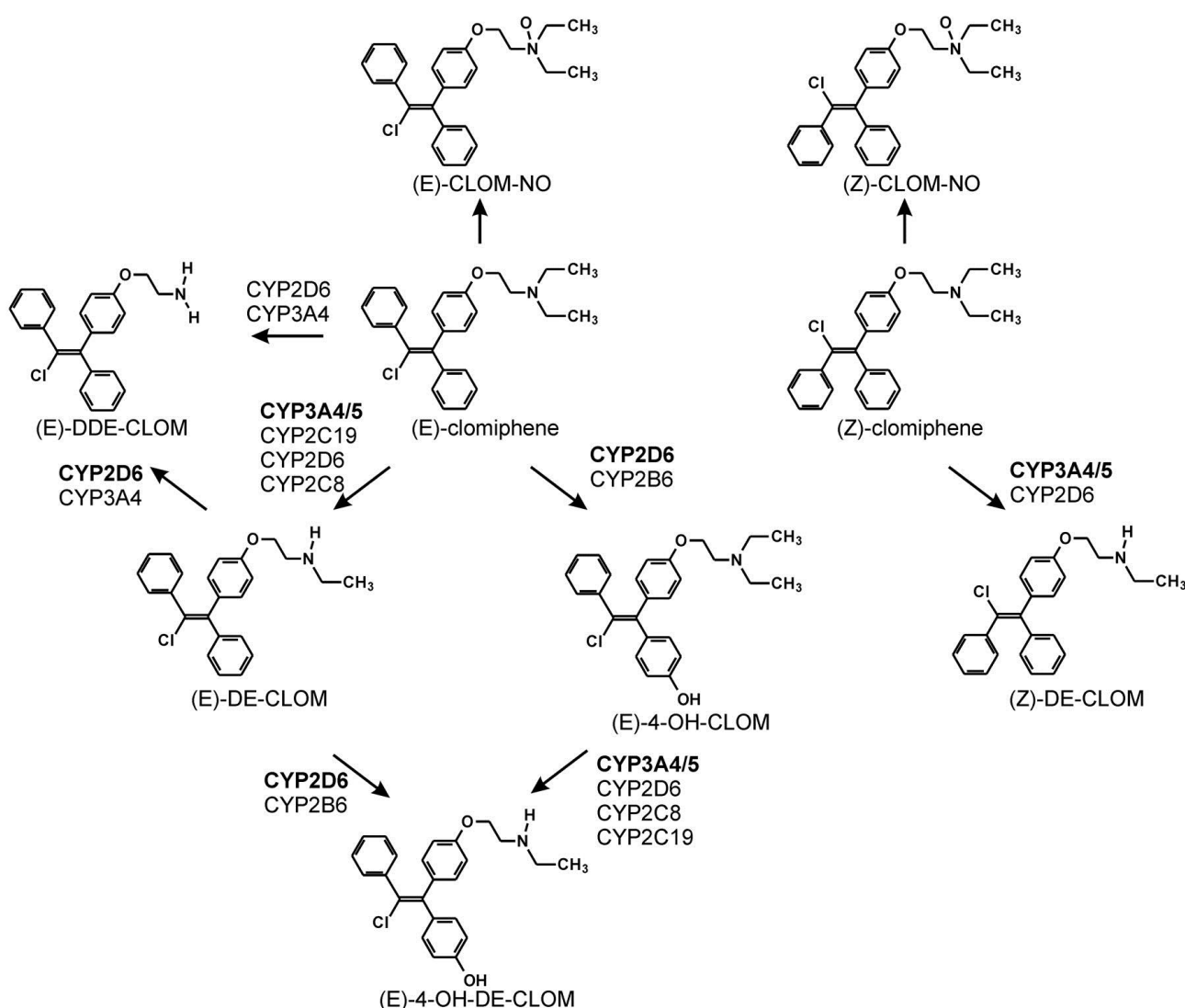


Figure 11 : Métabolisme humain du (E)- et (Z)-clomiphène avec les différentes étapes et les cytochromes contribuant à ces transformations d'après Mürdter et al. (13).

C'est le gène *CYP2D*, situé sur le bras long du chromosome 22, qui code l'enzyme CYP2D6. Il comporte 9 exons et 8 introns, susceptibles de subir des mutations, insertions ou délétions.

Ainsi, le CYP2D6 possède un polymorphisme génétique élevé, avec plus de 100 variants alléliques (44). Cela affecte l'expression du gène et l'activité enzymatique, qui peut être diminuée ou augmentée (13,44).

Ce polymorphisme est donc étudié, dans le cadre de la pharmacogénétique, pour définir le profil génétique et donc la réponse thérapeutique potentielle du patient au traitement par citrate de clomiphène.

L'étude de ces allèles va ainsi permettre de prédire le profil métabolique du patient pour le CYP2D6. Il sera alors classé en métaboliseur limité, intermédiaire, ou extensif. Ce classement est effectué selon le statut homozygote ou hétérozygote des allèles, qui peuvent être non fonctionnels, à fonction diminuée, ou pleinement fonctionnels (45).

Dans la population caucasienne, on observerait ainsi 13% de personnes présentant un profil de métaboliseur limité (2 allèles non fonctionnels) et intermédiaire (1 allèle non fonctionnel et 1 à fonction diminuée), qui seraient donc déficitaires pour l'enzyme CYP2D6 (13).

Compte tenu de l'effet du citrate de clomiphène sur le bilan hormonal masculin, nous avons souhaité étudier l'intérêt de l'administration prolongée de ce traitement chez des patients, métaboliseurs extensifs pour le CYP2D6, présentant des altérations sévères de la spermatogenèse, par une étude longitudinale prospective.

MATERIELS ET METHODES

La prise en charge des patients et des analyses a été réalisée au CHRU de Lille.

Notre étude a inclus des patients consultant pour infertilité ayant subi une biopsie testiculaire à visée d'extraction testiculaire de spermatozoïdes (TESE) et d'examen histo-fonctionnel de la spermatogenèse, dans le service d'Andrologie du CHRU de Lille, dirigé par le Dr. Rigot.

Au total, entre avril 2011 et novembre 2014, 69 patients ont été inclus et trois groupes de patients ont pu être définis. La répartition dans les groupes a été réalisée en fonction des résultats du spermogramme et de la TESE (TESE-1).

I. Patients

A. Inclusion

Le critère principal d'inclusion dans notre étude était un antécédent de biopsie testiculaire à visée d'extraction testiculaire de spermatozoïdes, dans un objectif de prise en charge en PMA. Les patients étaient donc azoospermes ou cryptozoospermes.

❖ Patients azoospermes :

Les patients concernés par l'étude, étaient ceux consultant pour infertilité en Andrologie, qui présentaient une azoospermie non obstructive constatée sur au moins 2 spermogrammes au laboratoire de Spermiologie du CHRU de Lille. Tous ces patients avaient déjà bénéficié d'une biopsie testiculaire au CHRU de Lille.

Le spermogramme était systématiquement réévalué 2 à 3 fois avec centrifugation et examen du culot au microscope, pour confirmer l'azoospermie.

Chez 25 patients, l'azoospermie a donc été confirmée aux spermogrammes, avec une 1^{ère} biopsie testiculaire et une TESE-1 négative. Le phénotype histologique est connu pour 23 d'entre eux.

Si l'analyse histologique de cette biopsie avait mis en évidence des cellules de la lignée germinale, voir quelques spermatozoïdes mais en quantité insuffisante pour une autoconservation spermatique, le patient était alors éligible à l'inclusion.

Ces 25 patients sont définis comme « azoospermes » dans l'étude.

❖ Patients Azoospermes virtuels :

Chez 11 patients venus consulter pour infertilité en Andrologie, une azoospermie non obstructive avait été confirmée aux spermogrammes et lors du bilan masculin. Ces patients avaient également bénéficié d'une biopsie testiculaire avec TESE-1.

Cependant pour l'ensemble des 11 patients, une extraction de spermatozoïdes avait été possible lors de la TESE-1 avec congélation de spermatozoïdes testiculaires.

Ils sont définis comme « azoospermes virtuels » dans l'étude.

❖ Patients cryptozoospermes :

Les autres patients concernés par l'étude étaient ceux qui consultaient pour infertilité en Andrologie, et présentaient une cryptozoospermie ou une oligozoospermie sévère, non obstructive, constatée sur au moins 2 spermogrammes.

Ces patients n'ayant pas eu d'autoconservation de sperme, ou ayant eu une autoconservation mais de qualité insuffisante pour assurer le projet de parentalité du couple, ont également été inclus.

Le même bilan andrologique était réalisé et le spermogramme était également réévalué avec centrifugation et examen du culot au microscope, pour confirmer le diagnostic.

Tous ces patients éligibles étaient alors informés en consultation andrologique, de l'intérêt potentiel d'un traitement par citrate de clomiphène pour stimuler la spermatogenèse. Les modalités de prise du traitement, le coût et le suivi leur étaient expliqués.

S'ils en acceptaient le principe, ils étaient alors inclus, après vérification de leur profil de métaboliseur extensif pour le CYP2D6 et l'absence d'atteinte de la fonction hépatique.

B. Exclusion

Les patients exclus étaient ceux pour lesquels une cause obstructive pure était responsable de l'azoospermie ou de la cryptozoospermie observée.

Étaient également exclus, les patients pour lesquels l'analyse histologique de la biopsie testiculaire ne mettait pas en évidence de cellules germinales ou de spermatozoïdes.

Si l'analyse du phénotype du CYP2D6, révélait un profil « métaboliseur limité », le patient n'était pas inclus, car probablement non répondeur au traitement.

Au cours de la stimulation, si un épisode de scotome scintillant (« mouches volantes »), ou tout autre signe clinique pouvant incriminer le traitement introduit, venait à survenir, le patient devait arrêter immédiatement le traitement et était exclu de l'étude.

Toute contre-indication médicale à la prise du citrate de clomiphène, soit un antécédent de tumeur hormono-dépendante, une altération de la fonction hépatique, un antécédent de trouble visuel lors d'une prise antérieure, ou une hypersensibilité au clomiphène entraînait l'exclusion.

II. Modalités de traitement

Le citrate de clomiphène (Clomid®) était prescrit à l'inclusion, à la dose initiale de 25 mg par jour (1/2 comprimé), en prise orale journalière.

La dose était ajustée, si nécessaire, en consultation de suivi andrologique, après 1 mois de traitement. Les doses allaient, après ajustement à 1 mois de traitement, de 25 mg (1/2cp) 1 jour sur 2, à 100 mg/j (2cp), selon les patients.

Les patients étaient informés de la nécessité de prendre le traitement pendant 9 mois successifs avec un suivi clinique, biologique, et des tentatives d'autoconservation spermatique à 3, 6 et 9 mois de traitement.

III. Suivi clinique (*tableau 2*)

A. En amont de l'inclusion

Le bilan andrologique comprenait au minimum un interrogatoire, un examen andrologique, un bilan hormonal et hépatique, un caryotype constitutionnel sur lymphocytes circulants en résolution standard et une recherche de micro-délétions AZF sur le bras long du chromosome Y par PCR multiplex. Ce bilan était complété par une échographie scrotale et des voies urogénitales.

Le polymorphisme génétique du CYP2D6 était étudié au laboratoire de Toxicologie et Génopathies (Pr F. Broly). Les patients étaient potentiellement éligibles au traitement si l'analyse génétique montrait un phénotype du CYP2D6 métaboliseur « extensif ».

B. Consultation d'inclusion : M0

Si le patient présentait les critères d'inclusion, le protocole lui était expliqué et proposé, avec une information claire sur les bénéfices espérés mais incertains.

C. Suivi à 1 mois de traitement : M1

A 1 mois de prise du traitement, les patients étaient reçus en consultation d'Andrologie pour évaluer leur tolérance du traitement.

Si le patient décrivait des symptômes évocateurs d'un surdosage en androgènes, à type de nervosité, hypersexualité, irritabilité voire agressivité, la dose était minorée.

D. Suivi à 3 mois, 6 mois et 9 mois de traitement : M3, M6, M9

A M3, M6 et M9 de prise du traitement, les patients bénéficiaient d'une consultation andrologique de suivi. Ces consultations permettaient notamment d'évaluer la tolérance du traitement et de discuter avec les patients des résultats des tentatives d'autoconservation spermatique effectuées au CECOS.

IV. Suivi biologique et sanguin (*tableau 2*)

A. Bilan initial à l'inclusion : M0

A l'inclusion, un bilan sanguin hormonal comprenant les dosages de LH, testostérone totale, FSH, œstradiol et inhibine B était prélevé.

Un bilan hépatique était également demandé, pour dépister une éventuelle altération de la fonction hépatique qui nécessiterait un arrêt du traitement.

L'analyse génétique du polymorphisme génétique du CYP2D6 était étudiée en amont de l'inclusion, lors d'une consultation antérieure. Les patients étaient potentiellement éligibles au traitement si l'analyse génétique montrait un phénotype du CYP2D6 métaboliseur « extensif ».

B. Bilan à 1 mois de traitement : M1

Le bilan sanguin réalisé comprenait les dosages de LH, testostérone totale, FSH, inhibine B, œstradiol, TGO, et TGP. Si la testostérone totale restait trop basse ou était trop élevée, la dose était adaptée en conséquence.

C. Bilans à 3 mois, 6 mois et 9 mois de traitement : M3, M6, M9

A 3, 6 et 9 mois de prise du traitement, les patients bénéficiaient d'un bilan sanguin de suivi, comprenant les dosages de LH, testostérone totale, FSH, inhibine B, œstradiol, TGO et TGP. Un spermogramme à visée de conservation du sperme était également réalisé au CECOS Nord.

Tableau 2 : Suivi clinique, biologique et spermologique lors de l'étude

SUIVI LORS DE L'ETUDE	Suivi clinique	Suivi biologique	Suivi spermologique
En amont de l'inclusion	-Examen andrologique -Echographie scrotale ± des voies urogénitales	-Polymorphisme génétique du CYP2D6 -caryotype constitutionnel -micro-délétions AZF -LH, FSH, oestradiol, Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	Au minimum 2 spermogrammes
M0	-Inclusion dans l'étude -information sur le déroulement de l'étude et le suivi	LH, FSH, oestradiol, Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	
M1	-Tolérance du traitement	LH, FSH, oestradiol Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	
M3	-Tolérance du traitement -Résultats d'autoconservation spermatique	LH, FSH, oestradiol Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	Tentative d'autoconservation sur recueil de sperme au CECOS
M6	-Tolérance du traitement -Résultats d'autoconservation spermatique	LH, FSH, oestradiol Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	Tentative d'autoconservation sur recueil de sperme au CECOS
M9	-Tolérance du traitement -Résultats d'autoconservation spermatique -Discussion TESE-2	LH, FSH, oestradiol Testostérone totale, inhibine B, TGO, TGP	Tentative d'autoconservation sur recueil de sperme au CECOS Programmation TESE-2

V. Tentatives d'autoconservation spermatique au CECOS

Les patients étaient systématiquement amenés à effectuer un spermogramme, à visée de préservation au CECOS Nord (Dr B. Ducrocq), à 3, 6 et 9 mois de traitement.

A. Procédure d'autoconservation spermatique

Les patients venaient effectuer un recueil de sperme au CECOS avec un délai d'abstinence de 2 à 5 jours.

Une autoconservation de sperme était alors tentée. Après liquéfaction, le recueil était lavé et centrifugé en totalité, pour obtenir un culot. Le culot était ensuite minutieusement examiné en microgoutte de 5 à 20 μ l, sous huile minérale (27). Cette technique était réalisée sur un microscope à double contraste de phase avec platine thermostatée.

Lorsque des spermatozoïdes mobiles étaient observés, une estimation de la morphologie et du nombre de spermatozoïdes mobiles dans la préparation finale était effectuée.

Si on estimait le nombre de spermatozoïdes mobiles injectables par paille suffisant, une congélation de sperme était réalisée. L'objectif était d'obtenir des pailles utilisables en FIV-ICSI, avec la présence de quelques spermatozoïdes mobiles après décongélation.

B. Congélation du sperme

On ajoutait alors, volume à volume, un cryoprotecteur, le Sperm Freezing Medium (Origio®), à la préparation de spermatozoïdes.

Les pailles étaient ensuite identifiées et montées manuellement en pailles hautes sécurité VHS.

Puis la procédure de congélation lente était réalisée, à l'aide d'un congélateur programmable de type Freezal. Le programme de congélation définissait 3 paliers :

- Un palier de +15°C à -10°C

- Un 2^{ème} palier de -10°C à -25°C
- Puis un 3^{ème} palier de -25°C à -150°C.

Au terme du programme, les pailles étaient immergées dans l'azote liquide puis conservées à -196°C, au sein des cuves du CECOS.

VI. Extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires (TESE)

Cette procédure était la même pour les TESE-1 et les TESE-2.

A. Mode opératoire de la biopsie de pulpe testiculaire

Les biopsies de pulpe testiculaire (BT) ont été réalisées sous anesthésie générale, aux Blocs communs de l'Hôpital Claude Huriez (CMCA) par les Andrologues du service d'Andrologie du Dr. Rigot.

L'abord était unilatéral ou bilatéral selon les cas. Le testicule était maintenu par l'aide opératoire, en veillant à tendre la peau scrotale. Il était réalisé une incision scrotale de 1 cm environ, au bistouri manuel. Les différents plans étaient franchis, avec hémostase au fur et à mesure. Après ouverture de la vaginale, l'albuginée était incisée.

Par expression manuelle, la pulpe testiculaire faisait saillie au travers de cette incision et un fragment était saisi par un coup de ciseau fin. Ce fragment était divisé en 2 échantillons.

Un premier échantillon de bonne taille, immédiatement placé dans un tube à hémolyse identifié contenant du milieu de culture à 37°C (Ferticult®) était acheminé dans une valisette à 37°C au laboratoire de Biologie de la Reproduction, pour la TESE.

Le deuxième échantillon, de plus petite taille, était déposé dans un pot contenant du liquide de Bouin pour l'étude histo-fonctionnelle de la spermatogenèse, et adressé au Laboratoire de Spermiologie.

B. Extraction de spermatozoïdes à partir de la pulpe testiculaire, au laboratoire (TESE)

A l'arrivée du fragment au laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHRU de Lille, il était pesé puis dilacéré mécaniquement à l'aide de 2 scalpels stériles, dans une boîte de Pétri contenant du Fercult® à 37°C.

Le fragment était ensuite replacé dans un tube Eppendorf® avec 200µl de milieu de culture à 37°C. L'extraction était ensuite réalisée avec une aiguille intramusculaire à l'aide de mouvements rotatifs sur les bords du tube (**Figure 12**).

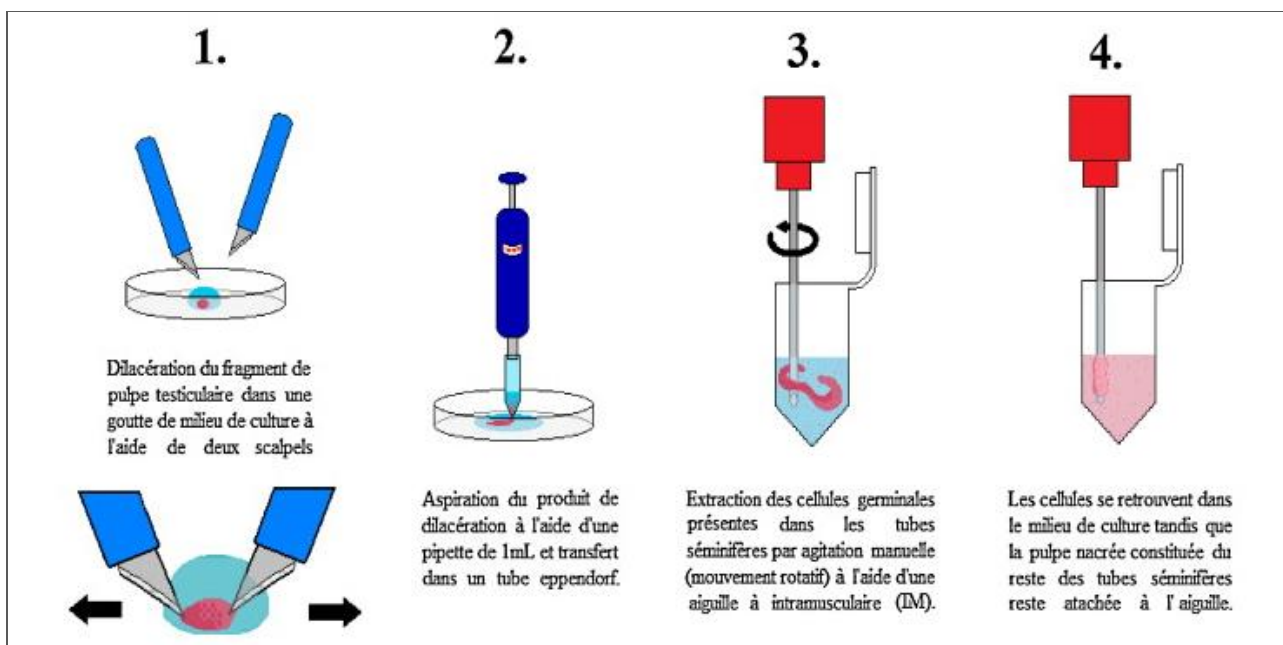


Figure 12 : Schéma du traitement du fragment de pulpe testiculaire, au laboratoire de BDR. D'après Robin et al (32).

La vitalité était réalisée avec ajout d'une goutte d'éosine dans la boîte de Pétri ayant servi au dilacérât. L'examen direct était réalisé au microscope inversé à contraste de phase à un grossissement x400.

Ensuite, dans une 2^{ème} boîte de Pétri, l'extrait contenu dans le tube Eppendorf® avec du Fercult®, était examiné en microgouttes de 5µl, sous huile minérale, après avoir posé 15 minutes à 37°C. Cet examen quantifiait le nombre de spermatozoïdes et leur mobilité.

Dès l'observation de 2 à 3 spermatozoïdes, la décision de confectionner une ou plusieurs pailles était prise, en fonction de la numération, la mobilité et la morphologie spermatique.

C. Congélation des pailles de sperme testiculaire

Les pailles étaient ensuite montées manuellement et dans des conditions stériles. Un cryoprotecteur, le Sperm Freezing Medium© (Origio) était ajouté volume à volume à la suspension finale issue de la biopsie testiculaire. Les pailles étaient ensuite confectionnées à l'aide de pailles haute sécurité et identifiées au nom du patient.

Ces pailles étaient ensuite congelées par le processus de congélation lente, avec un seeding à -8°C et une descente progressive en température jusque -150°C à l'aide d'un congélateur programmable (Planer®). Finalement les pailles étaient immergées dans de l'azote liquide à -196°C .

A l'issue de cette congélation, les pailles étaient rangées et stockées dans une cuve d'azote liquide maintenue à -196°C .

D. Etude histologique (32)

L'échantillon de pulpe testiculaire prélevé pour l'analyse histologique est immédiatement plongé dans un pot contenant le fixateur de Bouin, au bloc opératoire et adressé au service de Spermiologie.

La biopsie est ensuite incluse en paraffine, puis coupée en tranches de 4 à 5 μm à l'aide d'un microtome. Ces sections fines de pulpe testiculaire sont ensuite déposées manuellement sur des lames et colorées à l'aide d'Hématéine Eosine Safran (HES).

L'analyse des types histologiques précédemment décrits (pages 33-34) est ensuite réalisée au microscope aux l'objectifs X20, x40 et x100.

E. Analyse statistique

Les tests statistiques ont été réalisés sur le site internet biostaTGV à l'aide d'un test de Mann Whitney avec un seuil de significativité $p \leq 0,05$.

RESULTATS

Les données clinico-biologiques concernant les 69 patients âgés de 23 à 47 ans et des 3 groupes tels que définis précédemment (pages 40-41) ont été étudiées.

I. Caractéristiques clinico-biologiques avant traitement par le citrate de clomiphène

La population totale avait $33,2 \pm 5,6$ ans d'âge moyen, le VTT moyen était de $17,9 \pm 7,8$ mL, la LH moyenne était à $6,5 \pm 4,8$ UI/L, la testostérone totale moyenne à $4,1 \pm 1,3$ ng/mL, la FSH moyenne à $16,5 \pm 11,9$ UI/L et l'inhibine B moyenne était à $52,8 \pm 48,1$ pg/mL.

Quarante-trois patients parmi les 69, ont bénéficié d'une biopsie testiculaire TESE-1. Pour ces 43 patients ayant eu une TESE-1, le phénotype histologique lors de la TESE-1 est présenté dans la **Figure 13**. On y retrouve une majorité de phénotypes histologiques purs (63%).

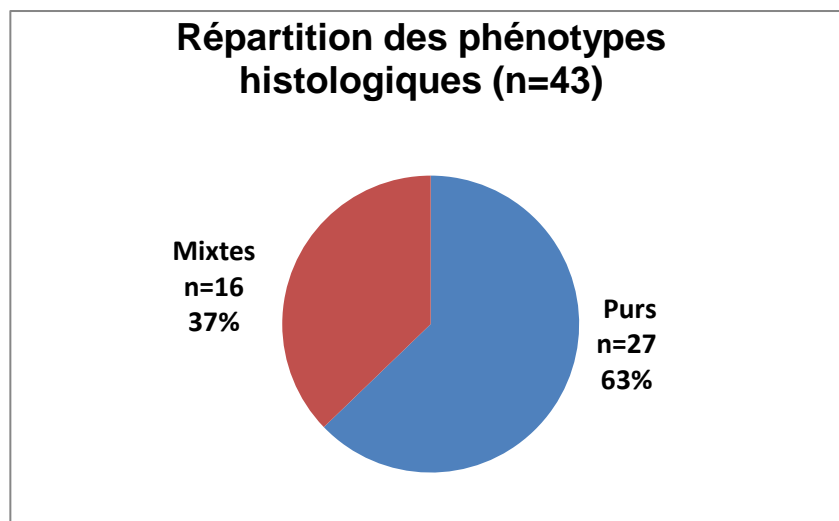


Figure 13 : Répartition des phénotypes histologiques lors de la TESE-1 (n=43).

Pour les patients pour lesquels la TESE-1 a révélé un phénotype histologique pur, on a observé 3 phénotypes différents :

- Les arrêts de maturation (AM),
- Les hypospermatogénèses (HYPO),
- Les syndromes de cellules de Sertoli seules only (SCOS).

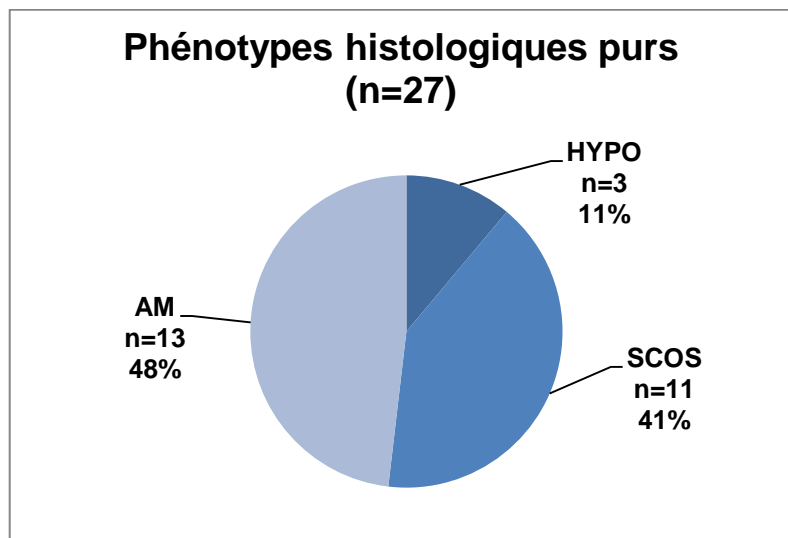


Figure 14 : répartition des phénotypes histologiques purs lors de la TESE-1 (n=27).

Parmi les 27 patients présentant un phénotype histologique pur à la TESE-1, on retrouve donc une majorité d'arrêts de maturation (48%), et de syndrome de cellules de Sertoli seules only (41%) (**Figure 14**).

Pour 16 patients, la TESE-1 a révélé des phénotypes histologiques mixtes comprenant :

- Un syndrome de cellules de Sertoli seules only associé à une hypospermatogénèse (SCOS-HYPO),
- Un syndrome de cellules de Sertoli seules only associé à un arrêt de maturation (SCOS-AM).

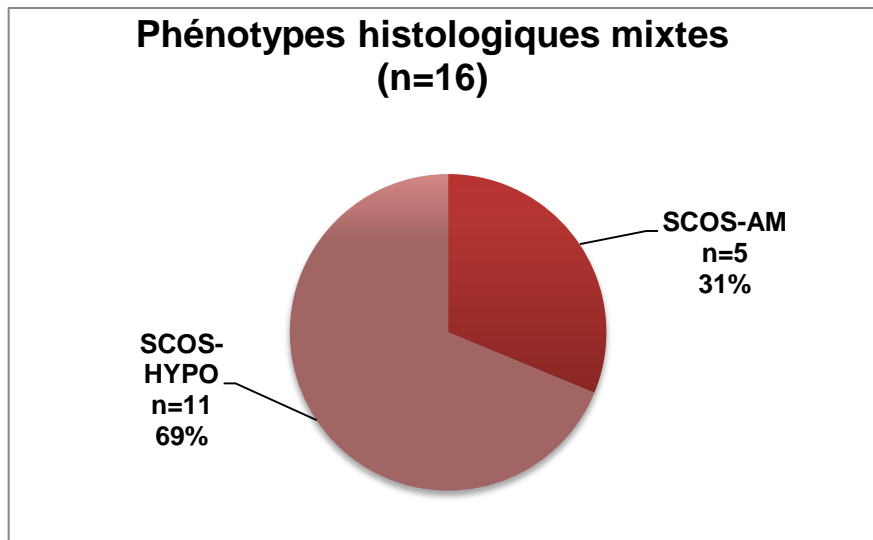


Figure 15 : répartition des phénotypes histologiques mixtes lors de la TESE-1 (n=16).

Pour les TESE-1 présentant un phénotype histologique mixte, associant 2 phénotypes histologiques dominants, la majorité présente un syndrome de cellules de Sertoli seules only (SCOS) associé à une hypospermatogenèse (69%) (**Figure 15**).

II. Suivi hormonal durant le traitement par citrate de clomiphène

A. Groupe « azospermes »

Pour les 25 patients du groupe « azospermes », la LH, la FSH et la testostérone totale montrent une forte augmentation des taux entre M0 et M1, à l'initiation du traitement (**tableau 3**).

La testostérone totale est multipliée par 2.25 entre M0 et M1, et 1.92 entre M0 et M9. Les taux hormonaux de LH, FH et testostérone totale sont stables entre M1 et M9.

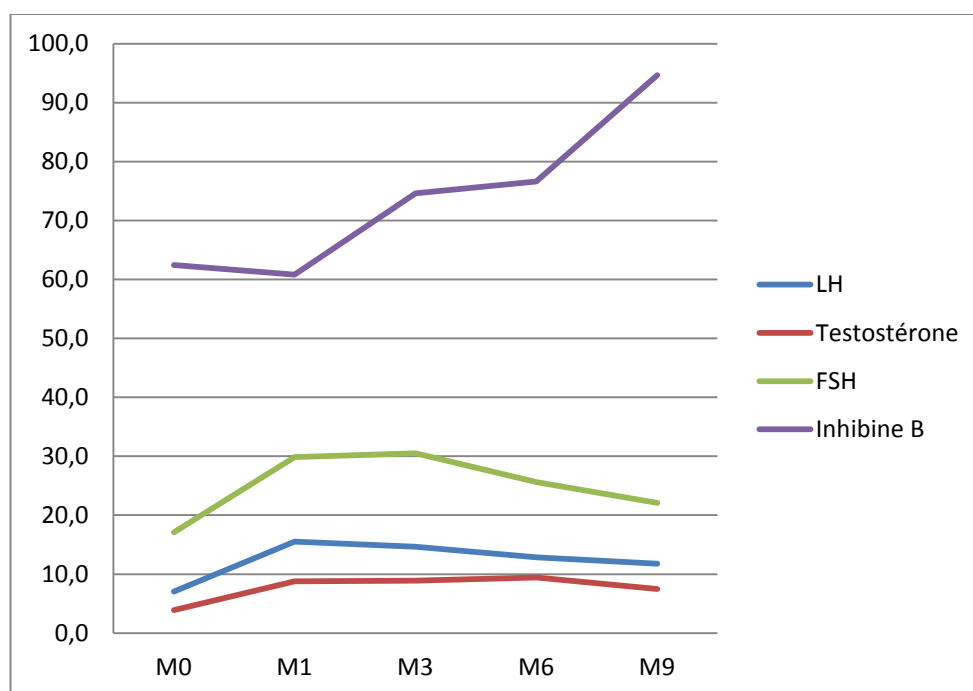
L'inhibine B montre une lente progression, avec un taux qui s'élève à M3 et à M9.

Tableau 3 : caractéristiques hormonales de base et lors du suivi à M1, M3, M6, et M9 du groupe « azoospermes ».

Azoospermes n=25	M0	M1	M3	M6	M9
LH (UI/L)	7,0±6,8 (1,3-32,6)	15,5±9,3 (5,4-46,5)	14,6±8,4 (5,8-35,8)	12,9±7,5 (4-34,9)	11,8±10,1 (2,2-36)
Testostérone totale (ng/mL)	3,9±1,1 (1,7-6,1)	8,8±2,2 (3,9-12,6)	8,9±3,2 (4,2-15,8)	9,4±5,0 (3,1-24,7)	7,5±3,7 (2,1-12,8)
FSH (UI/L)	17,1±15,9 (1,6-66)	29,9±20,6 (3,9-88,3)	30,5±18,5 (3,5-78,8)	25,6±14,8 (3,4-66,5)	22,1±15,7 (5,3-49,3)
Inhibine B (pg/mL)	62,4±64,5 (10-236)	60,8±77,7 (10-257)	74,6±86,8 (10-305)	76,6±82,6 (10-262)	94,7±89,0 (10-221)

Le tableau reprend la valeur moyenne ± DS (min- max)

Figure 16 : Courbes des réponses hormonales moyennes au cours du suivi pour le groupe « azoospermes »



B. Groupe « azoospermes virtuels »

Pour les 11 patients du groupe « azoospermes virtuels », le suivi de la LH, la FSH et la testostérone totale suit un mode comparable au groupe « azoospermes » : on observe une forte élévation de LH, FSH et testostérone totale de M0 à M1, puis une stabilisation entre M1 et M9.

La testostérone totale est multipliée par 2 entre M0 et M1, et par 1.28 entre M0 et M9.

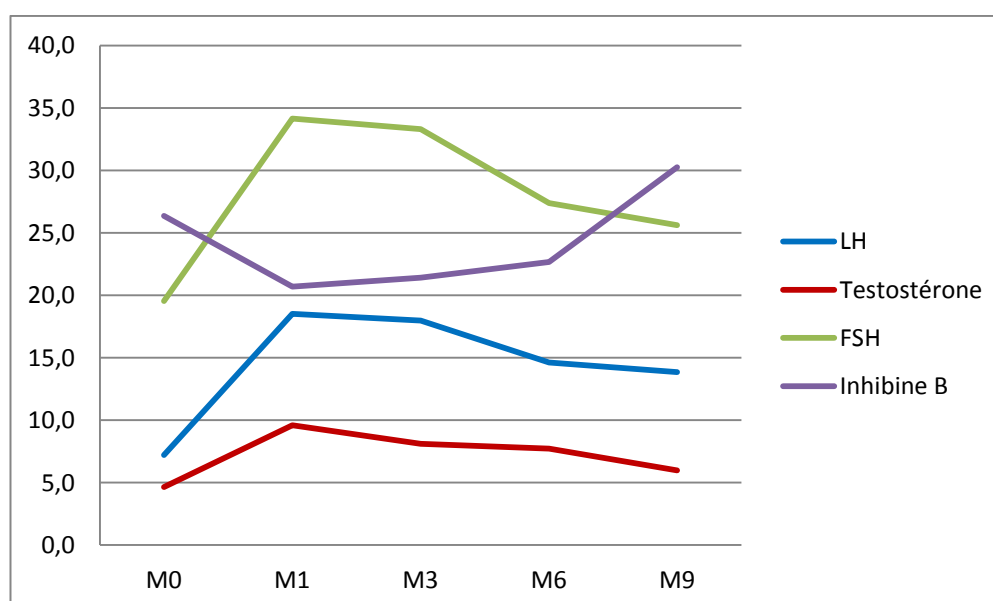
Concernant l'inhibine B, une impulsion est observée à M9.

Tableau 4 : caractéristiques hormonales de base et lors du suivi à M1, M3, M6, et M9 du groupe « azoospermes virtuels ».

Azoospermes virtuels n=11	M0	M1	M3	M6	M9
LH (UI/L)	7,2±2,4 (3,9-11,8)	18,5±6,7 (8,3-31,5)	18,0±9,2 (8,5-35,3)	14,6±4,5 (7,8-22,2)	13,9±4,4 (9,2-19)
Testostérone totale (ng/mL)	4,7±1,5 (2,5-6,4)	9,6±4,4 (3,5-20,9)	8,1±3,7 (4-14,7)	7,7±2,4 (3,5-11,9)	6,0±2 (4-8,7)
FSH (UI/L)	19,5±6,6 (9,7-31,7)	34,2±10,7 (20-55,7)	33,3±13,2 (18,2-68)	27,4±5,7 (20-35,7)	25,6±10,5 (15,1-40,2)
Inhibine B (pg/mL)	26,4±15,9 (10-60)	20,7±17,8 (10-68)	21,4±14,5 (10-53)	22,7±18,9 (10-70)	30,3±40,5 (10-91)

Le tableau reprend la valeur moyenne ± DS (min- max)

Figure 17 : Courbes des réponses hormonales moyennes au cours du suivi pour le groupe « azoospermes virtuels »



C. Groupe « cryptozoospermes »

Dans le groupe « cryptozoospermes », l'évolution est similaire pour la LH, la FSH, et la testostérone totale, avec une forte augmentation entre M0 et M1 et une stabilisation à M9.

La testostérone totale est multipliée par 1,37 entre M0 et M9.

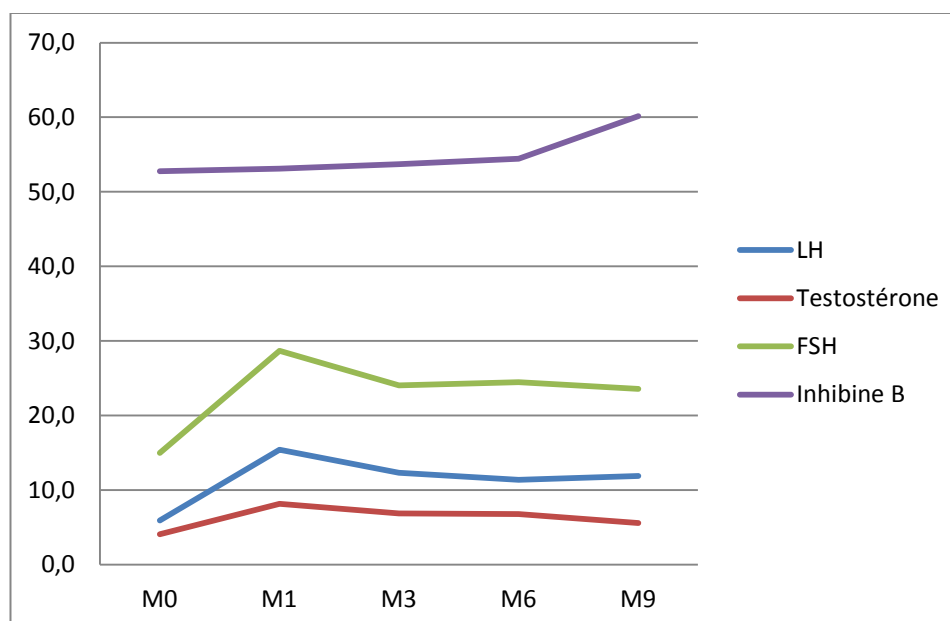
Concernant l'inhibine B, son taux reste stable entre M0 et M6 et augmente légèrement à M9.

Tableau 5 : caractéristiques hormonales de base et lors du suivi à M1, M3, M6, et M9 du groupe « cryptozoospermes ».

Cryptozoospermes n=33	M0	M1	M3	M6	M9
LH (UI/L)	6,0±3,2 (1,7-17,8)	15,4±10,6 (5,8-66,2)	12,3±6,7 (3,2-28,8)	11,4±5,7 (3,2-28,3)	11,9±9,6 (2,1-42,4)
Testostérone totale (ng/mL)	4,1±1,3 (1,3-7,1)	8,2±3,5 (2,6-17,7)	6,9±2,5 (2,1-12,2)	6,8±2,3 (2-10,4)	5,6±2,1 (3-9,4)
FSH (UI/L)	15,0±9,6 (1,7-47,4)	28,7±16,6 (4,9-75,4)	24,1±15,2 (3,8-63,1)	24,5±14,3 (3,4-64,1)	23,6±14,6 (5-58,6)
Inhibine B (pg/mL)	52,8±48,1 (10-225)	53,1±51 (10-204)	53,7±49,8 (10-199)	54,4±64,7 (10-259)	60,1±55 (10-201)

Le tableau reprend la valeur moyenne ± DS (min- max)

Figure 18 : Courbes des réponses hormonales moyennes au cours du suivi pour le groupe « cryptozoospermes »



III. Suivi spermologique

A. Groupe « azoospermes »

Chez les 25 patients « azoospermes », 21 sont venus autoconserver au CECOS. De très rares spermatozoïdes ont été observés pour 4 patients.

Il n'y a pas eu d'autoconservation spermatique, compte tenu de la pauvreté en spermatozoïdes de l'éjaculat.

B. Groupe « azoospermes virtuels »

Chez les 11 patients « azoospermes virtuels », 2 patients ont bénéficié d'une autoconservation spermatique sur éjaculat, soit 18% des azoospermes virtuels.

Ils ont eu en moyenne 6 pailles autoconservées (min 5 ; max 7).

C. Groupe « cryptozoospermes »

Dans le groupe « cryptozoospermes », 31 patients parmi les 33 se sont présentés au CECOS.

Pour 3 d'entre eux (9%), des spermatozoïdes ont été observés mais l'autoconservation spermatique n'était pas réalisable, compte tenu de la pauvreté en spermatozoïdes de l'éjaculat.

Pour 16 d'entre eux (52%), une congélation de sperme éjaculé a été possible, avec en moyenne 3,1 pailles par patient (min 1; max 8).

IV. Suivi chirurgical testiculaire

A. Groupe « azoospermes »

Parmi les 25 patients « azoospermes », 9 patients ont bénéficié d'une réintervention à visée d'extraction de spermatozoïdes, sur proposition de l'andrologue. Trois patients ont congelé du sperme testiculaire (33%).

B. Groupe « azoospermes virtuels »

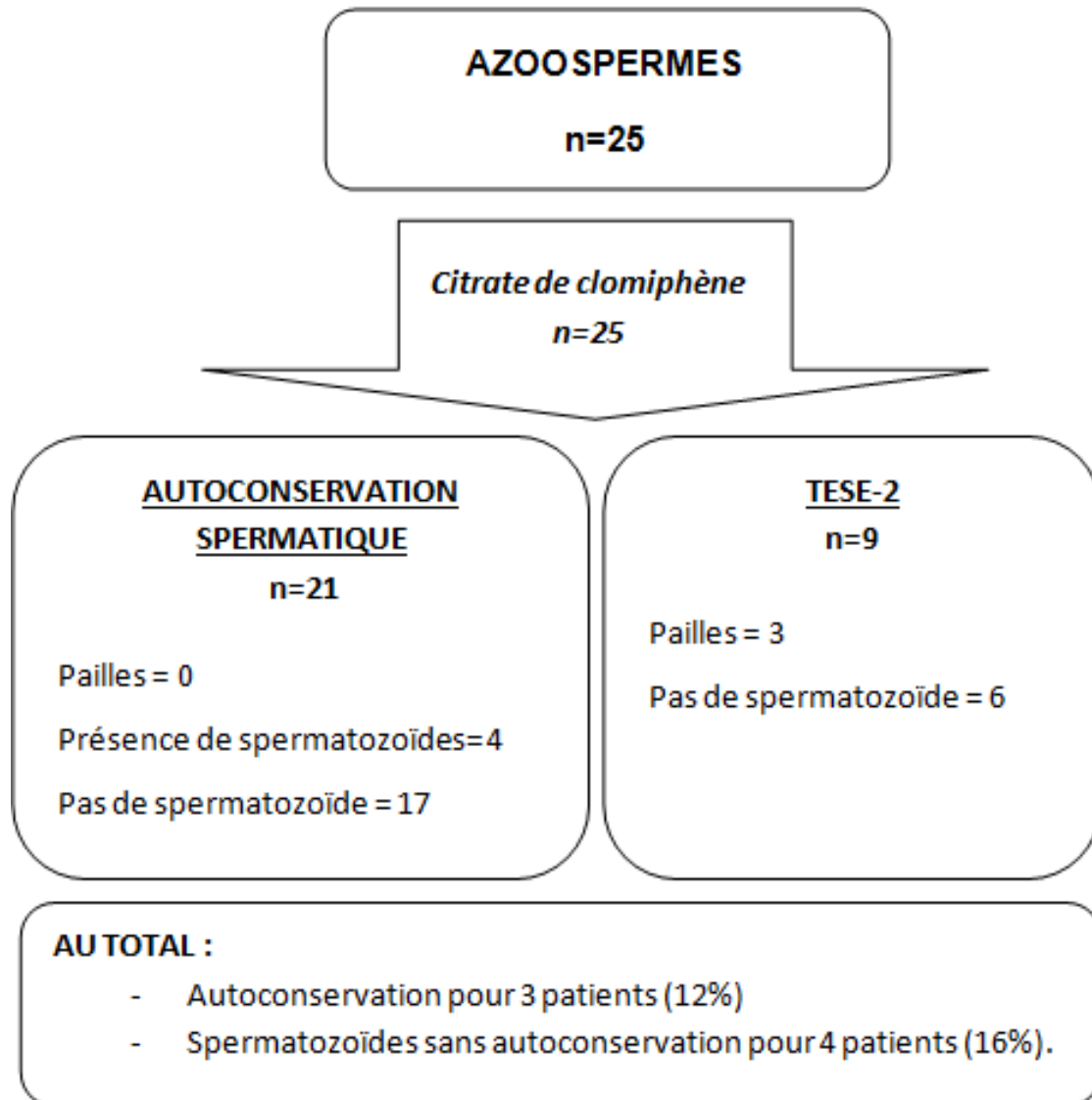
Parmi les 11 patients « azoospermes virtuels », 3 patients ont eu une réintervention, en accord avec l'andrologue. Deux patients ont bénéficié de la congélation de sperme testiculaire, tandis que des spermatozoïdes ont été observés, mais en nombre insuffisant pour permettre une congélation pour le 3^{ème}.

C. Groupe « cryptozoospermes »

Parmi les 33 patients « cryptozoospermes », 17 ont été opérés après stimulation par citrate de clomiphène. Ces 17 TESE-2 ont permis 9 autoconservations de sperme testiculaire (52,9%). Pour 2 patients la congélation n'a pas été possible, bien que des spermatozoïdes aient été observés (11,8%).

V. Conclusion des résultats

A. Groupe « azoospermes »

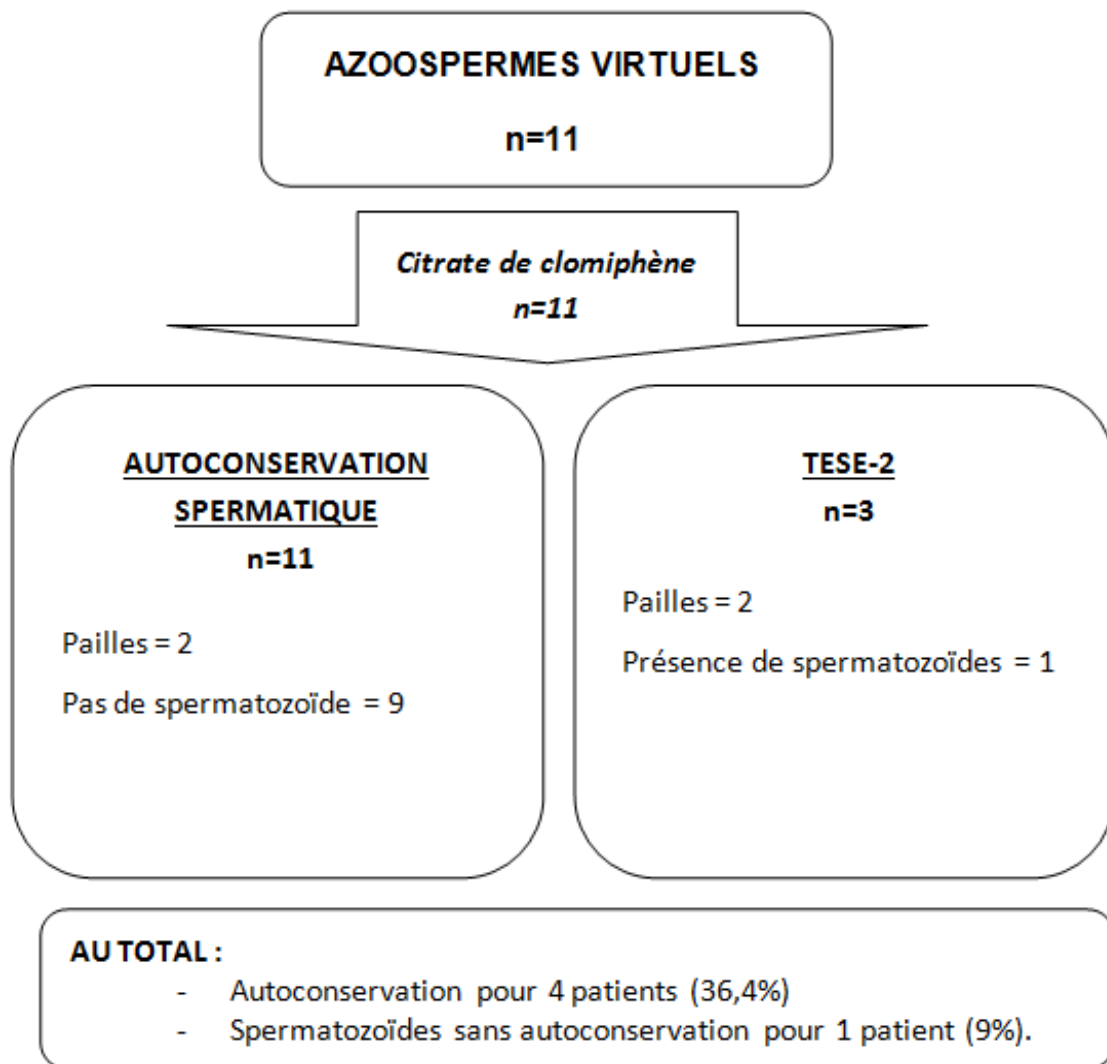


Pour les 25 patients azoospermes, 3 patients ont eu des pailles confectionnées, lors de la TESE-2 (12%).

Pour 4 autres patients (16%), des spermatozoïdes ont été observés sur l'éjaculat, mais en nombre insuffisant pour permettre une congélation.

Pour les 18 autres patients du groupe « azoospermes », aucun spermatozoïde n'a été vu.

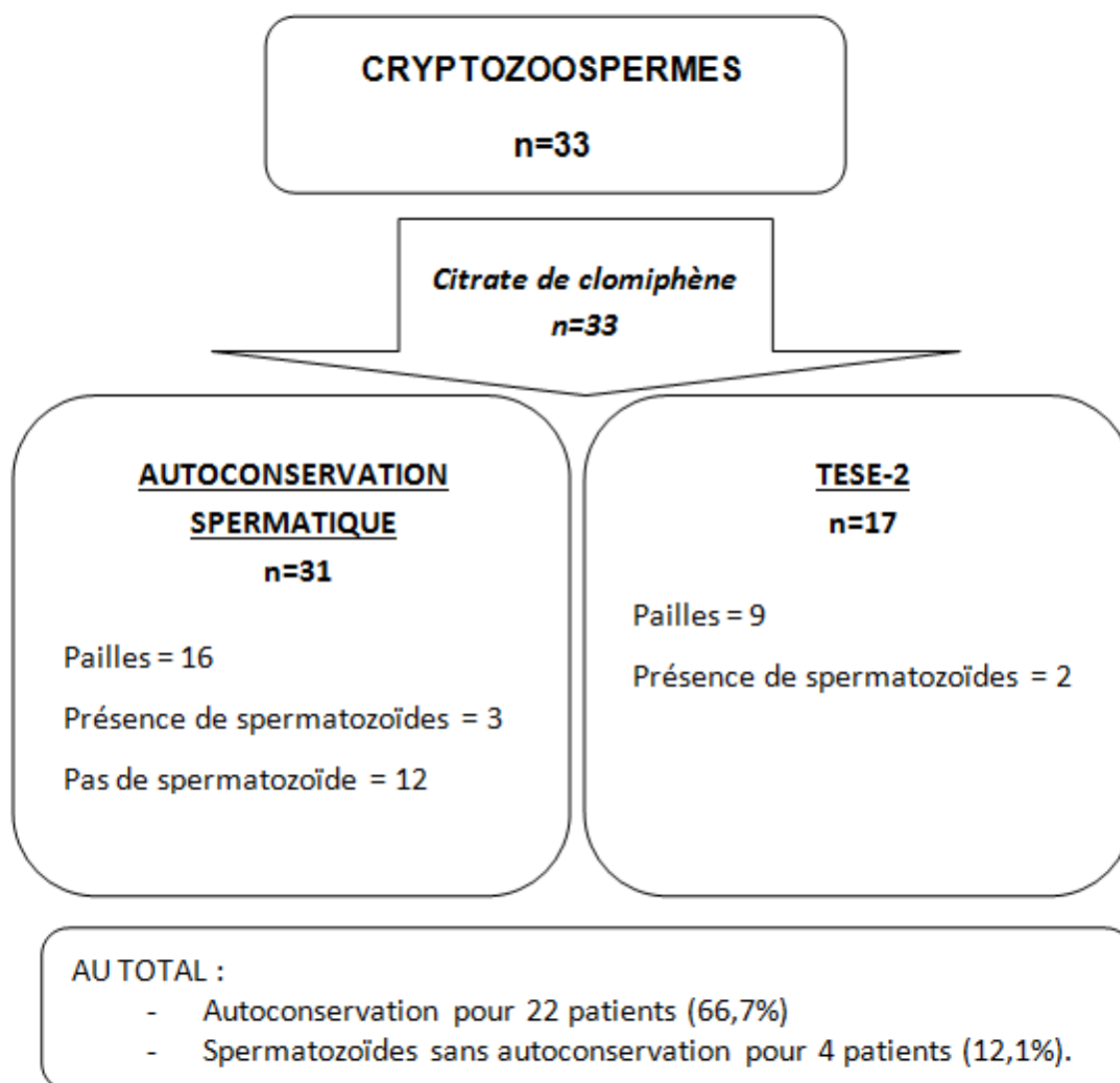
B. Groupe « azoospermes virtuels »



Pour les 11 patients « azoospermes virtuels », 4 patients ont eu des pailles confectionnées (36,4%) : 2 sur sperme éjaculé, et 2 sur sperme testiculaire.

Pour 1 autre patient (9%) des spermatozoïdes ont été observés, mais sans congélation possible.

C. Groupe « cryptozoospermes »



Pour les patients « cryptozoospermes », des pailles ont été confectionnées à 25 reprises pour 22 patients différents (66,7%).

Pour 3 patients il a été possible de conserver des pailles de sperme sur l'éjaculat, mais également lors d'une TESE-2.

En effet, 4 patients ont eu des pailles sur sperme éjaculé pendant le traitement mais ils souhaitent augmenter et améliorer leur stock de pailles pour assurer leur fertilité future ; leurs pailles contenant moins d'une trentaine de spermatozoïdes avant la congélation.

Une TESE-2 avait donc été décidée pour ces 4 patients, et 3 ont pu avoir des pailles supplémentaires.

Pour 4 autres patients (12,1%) des spermatozoïdes ont été observés, mais sans congélation possible.

D. Récapitulatif des autoconservations spermatisques

Ainsi au total dans cette étude, 63/69 patients se sont présentés au CECOS pour tenter une autoconservation spermatisque.

Des pailles ont pu être confectionnées pour 18 d'entre eux (28,6%), et des spermatozoïdes ont été observés sans congélation possible pour 7 patients (11,1%).

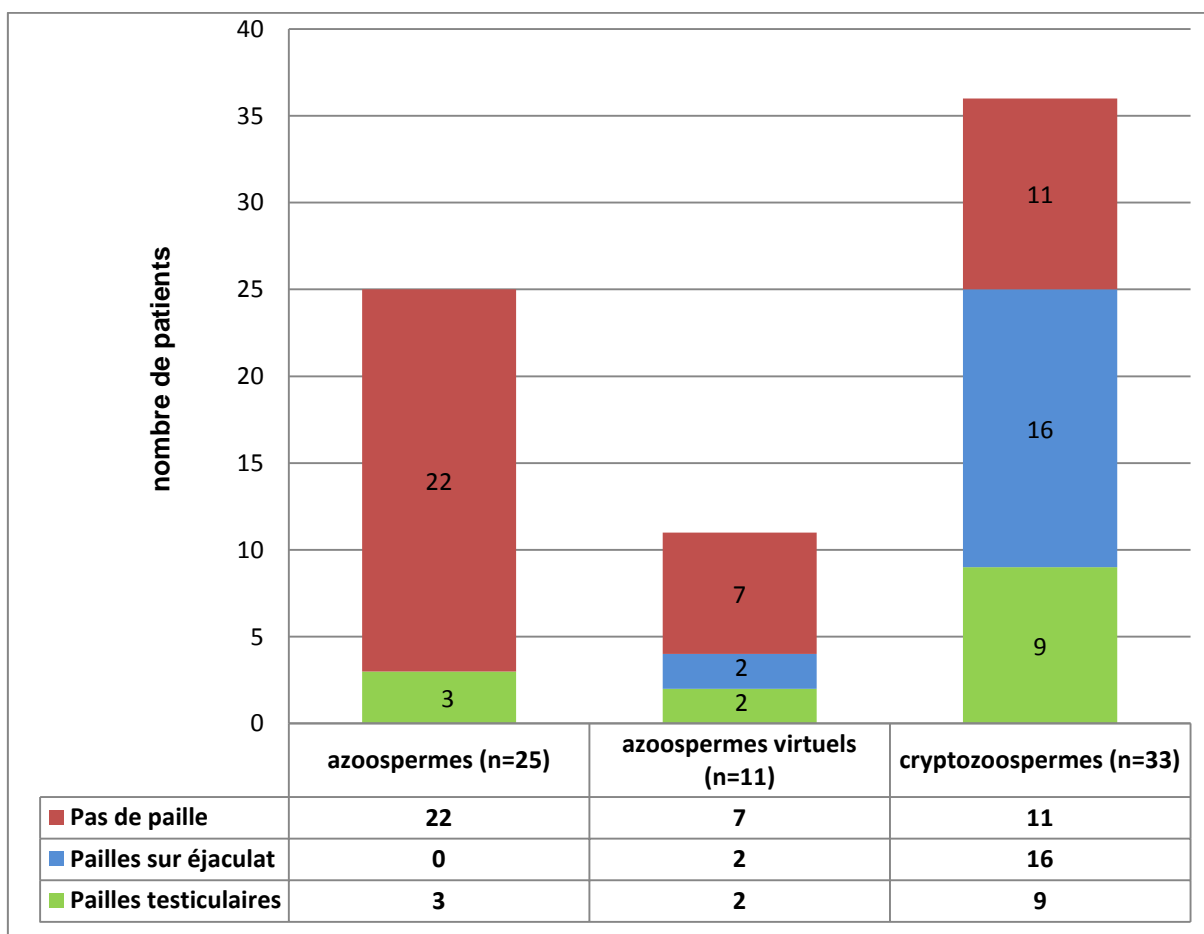
Trente-huit patients (60,3%), sont restés azoospermes.

Concernant le suivi chirurgical, dans cette étude, 29 patients ont bénéficié d'une TESE-2 après traitement par le citrate de clomiphène.

Pour 14 d'entre eux, une congélation de sperme testiculaire a eu lieu (48,3%), et des spermatozoïdes ont été observés, sans congélation possible pour 3 patients (10,3%).

Pour les 12 patients restants, aucun spermatozoïde n'avait été observé (41,4%).

Figure 19 : Histogramme des autoconservations spermatisques des 3 groupes.



Au total, dans cette étude, 29/69 patients (42%) ont pu avoir une congélation de paille lors du suivi :

-16 patients (23,2%) qui n'avaient aucune paille autoconservée avant le traitement par citrate de clomiphène,

-13 patients (18,8%) qui augmentent leur stock de pailles antérieures. La plupart de ces 13 patients avaient en effet quelques pailles autoconservées. Ces pailles étaient néanmoins d'utilisation extrêmement délicate, avec moins d'une centaine de spermatozoïdes estimés disponibles par paille, avant congélation.

Les 40 autres patients (58%) n'ont pas réalisé d'autoconservation.

VI. Résultats en AMP

A. Résultats selon le phénotype clinique

1. Groupe « azoospermes »

Dans le groupe « azoospermes », 2 couples ont fait des tentatives en AMP. On dénombre 2 grossesses sur sperme testiculaire, avec la naissance de 2 enfants pour ces 2 couples.

2. Groupe « azoospermes virtuels »

Dans le groupe « azoospermes virtuels », 3 couples ont fait des tentatives en AMP. Un couple a eu 1 grossesse sur sperme autoconservé, suivie de la naissance d'1 enfant.

3. Groupe « cryptozoospermes »

Parmi les 33 patients cryptozoospermes, 22 patients ont eu une autoconservation. Dix-neuf couples ont fait des tentatives en AMP, parmi lesquels 10 couples ont obtenu 11 grossesses évolutives. Douze enfants sont nés (1 couple ayant eu 2 grossesses et 1 couple ayant eu 1 grossesse gémellaire).

4. Récapitulatif des résultats (Figure 20)

Dans cette étude, il a été observé 14 grossesses évolutives pour 13 couples ayant fait des tentatives en AMP. L'une d'elle est survenue de façon spontanée, après une tentative en AMP sur sperme éjaculé.

Au total, 15 enfants sont nés.

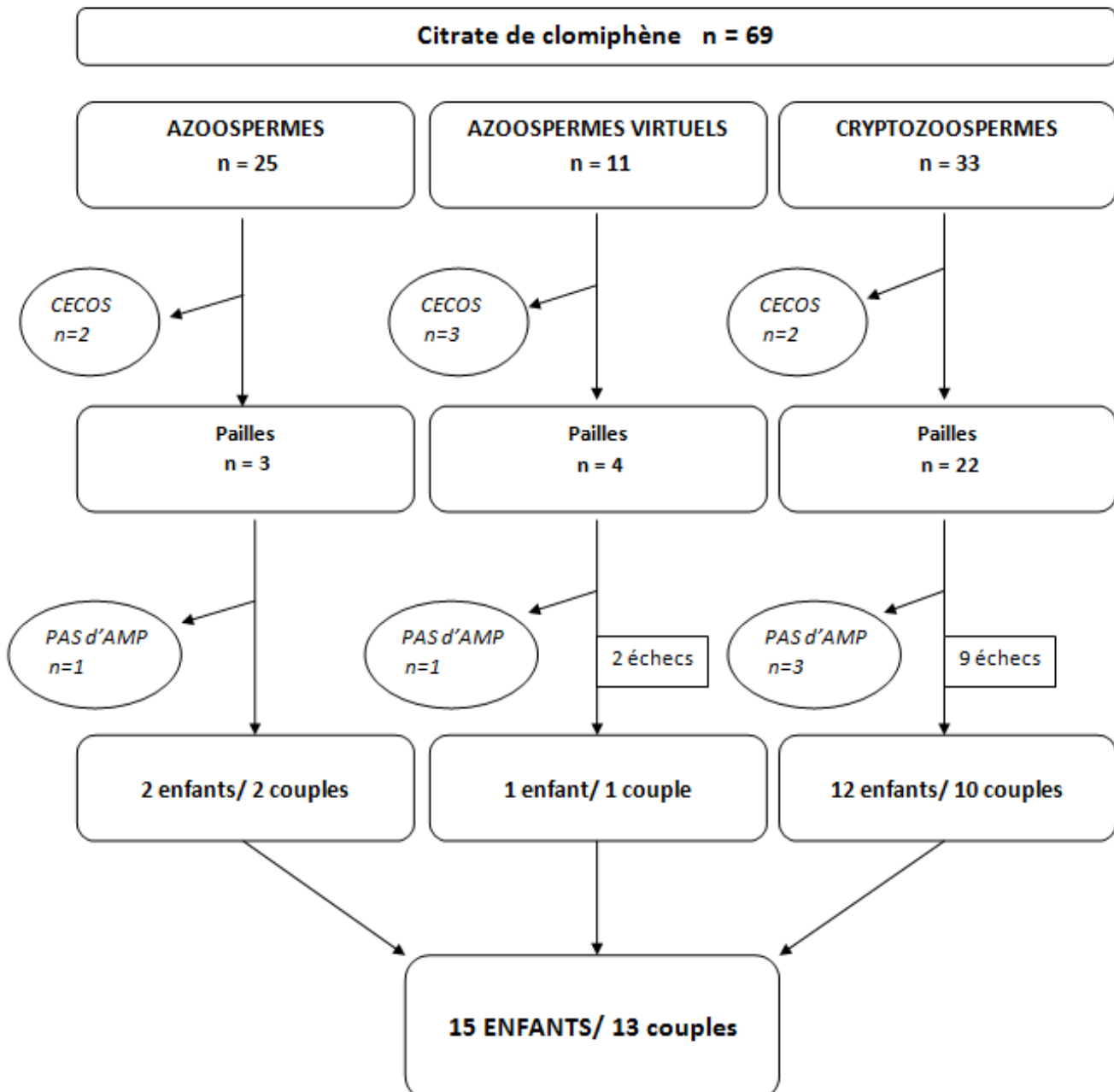


Figure 20 : Résultats des autoconservations spermatisques et des issues de tentatives en AMP.

B. Résultats selon le phénotype histologique testiculaire

1. Phénotype histologique pur (Figure 21)

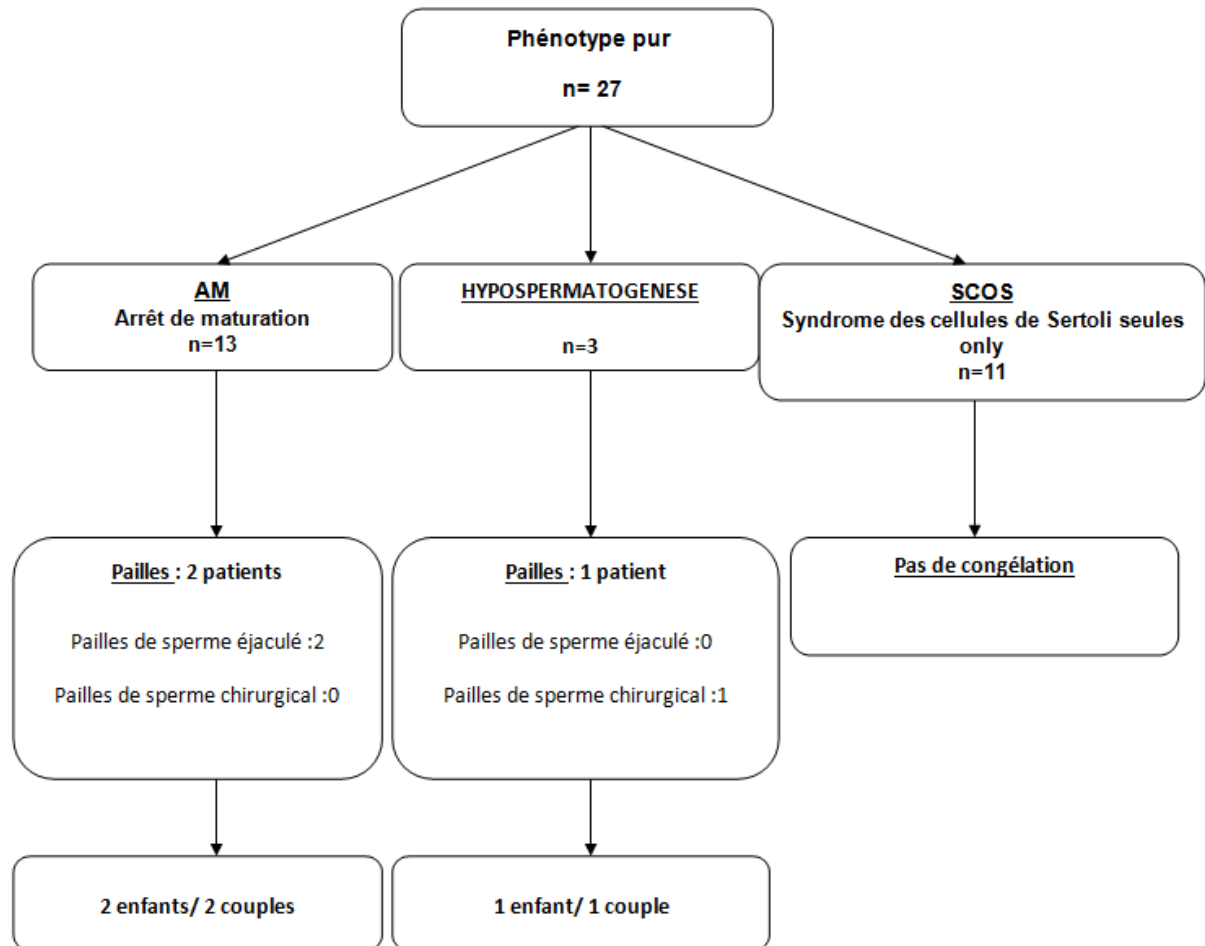


Figure 21 : Résultats des autoconservations spermatiques et des issues de tentatives en AMP pour les 27 patients présentant un phénotype histologique pur à la TESE-1.

Parmi les patients pour lesquels un phénotype pur a été mis en évidence à la TESE-1, 3 patients ont pu bénéficier de la congélation de paille (11,1%).

Pour le phénotype de type SCOS, aucun patient n'a pu conserver de paille.

Pour le phénotype d'hyospermatogenèse, 1/3 patient a pu bénéficier de la conservation de pailles de sperme testiculaire (33%). Il a ensuite eu 1 enfant en ICSI.

Pour le phénotype d'arrêt de maturation, 2/13 patients ont pu bénéficier de la conservation de pailles de sperme éjaculé (15,4%). Ces 2 patients ont ensuite eu 2 enfants en ICSI.

2. Phénotype histologique mixte (Figure 22)

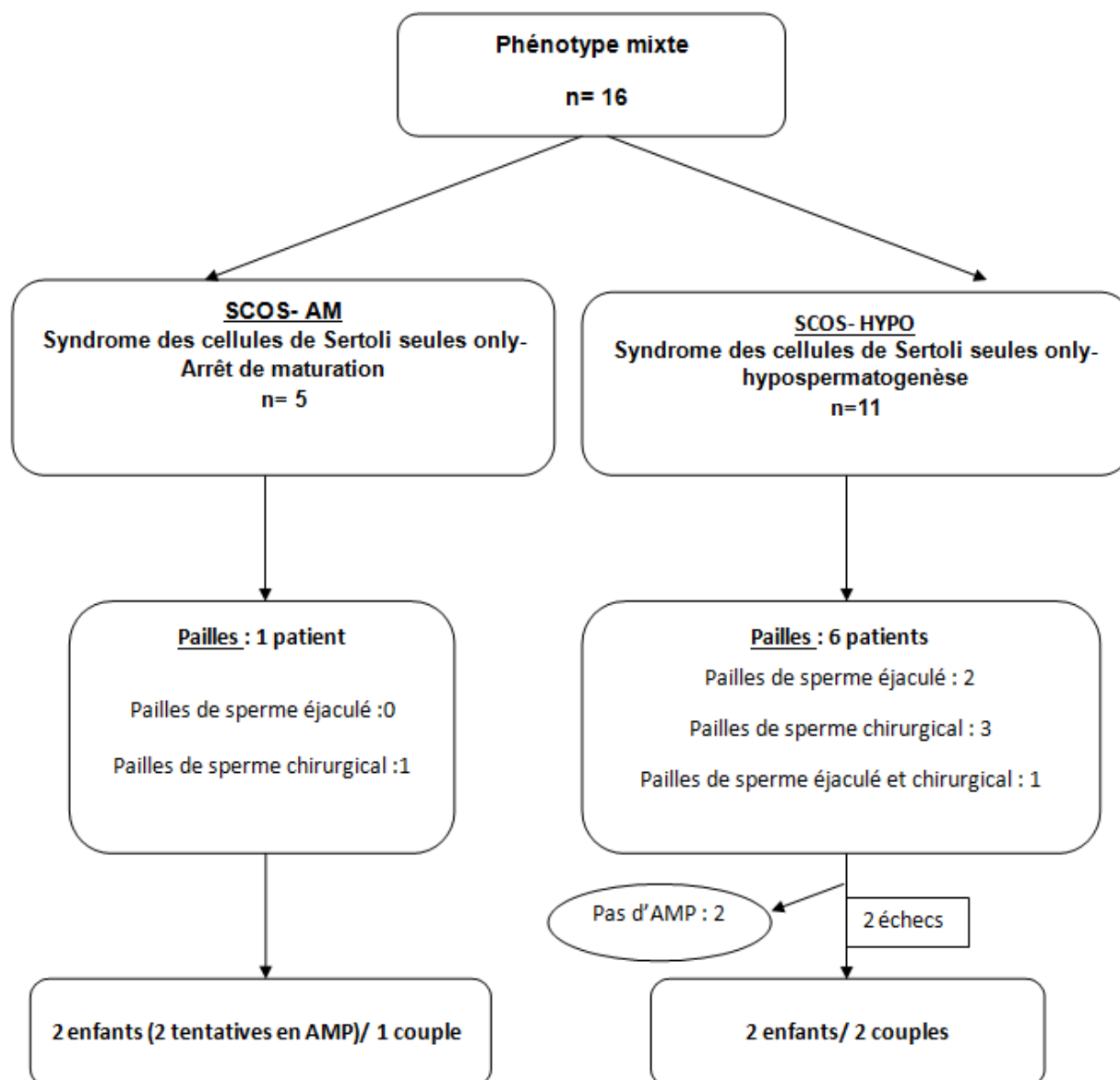


Figure 22 : Résultats des autoconservations spermatisques et des issues de tentatives en pour les 16 patients présentant un phénotype mixte à la TESE-1.

Parmi les 16 patients pour lesquels un phénotype mixte a été mis en évidence à la TESE-1, 7 patients ont bénéficié de la congélation de pailles (43%).

Pour les phénotypes SCOS-AM, 1/5 patient a eu des pailles de sperme testiculaire conservées (20%). Il a ensuite eu 2 enfants nés en 2012 et 2014 en ICSI sur sperme testiculaire.

Pour les phénotypes SCOS-HYPO, 6/11 patients ont eu des pailles de sperme conservées (54%).

Le sperme était testiculaire pour 4 d'entre eux et éjaculé pour 3 d'entre eux, 1 patient ayant pu conserver sur l'éjaculat et lors de la TESE-2. Ce patient, jeune, n'ayant pu conserver qu'une paille d'utilisation extrêmement délicate à 24 spermatozoïdes estimés avant congélation, il avait alors été décidé une TESE-2.

Pour ces 6 patients ayant pu conserver des pailles, 4 ont effectué des tentatives en AMP. Deux couples ont eu 2 enfants.

VII. Réponse hormonale à la stimulation par citrate de clomiphène selon l'autoconservation spermatique

Au total, parmi les 69 patients inclus dans l'étude, 29 patients (42%) ont pu congeler des pailles de sperme après stimulation par le citrate de clomiphène, que le sperme soit éjaculé ou testiculaire. Quarante patients sont restés azoospermes (58%).

Nous avons comparé la réponse hormonale observée pour la LH, la testostérone totale, la FSH et l'inhibine B pour les différents groupes de patients (**Tableau 6**) :

- « pailles » : 29 patients ayant conservé des pailles
- « pas de paille » : 40 patients n'ayant pas eu d'autoconservation spermatique.

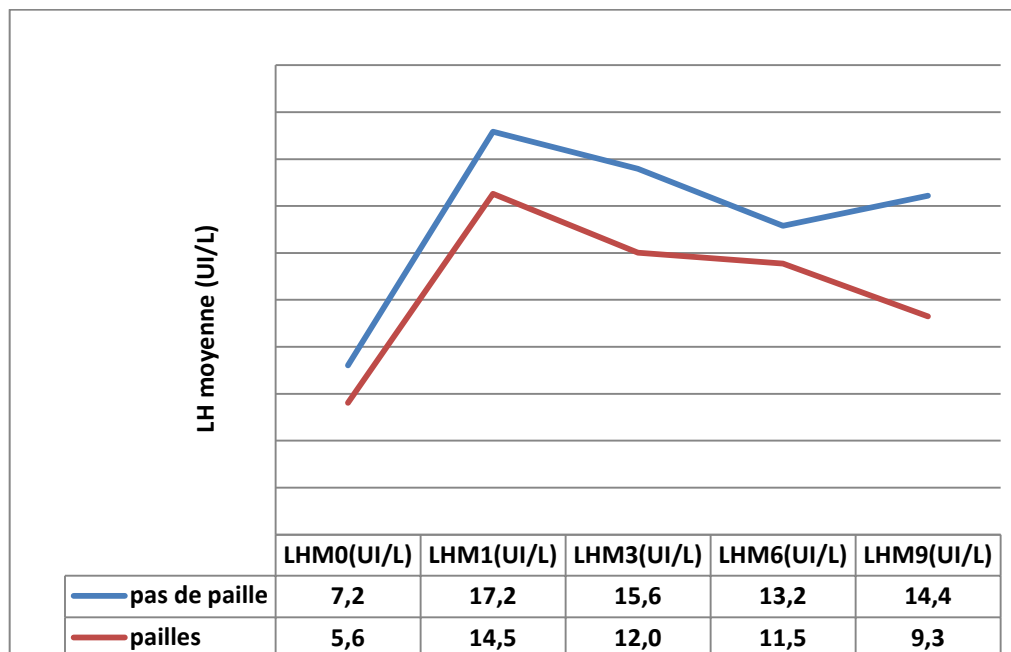
Tableau 6 : Tableau comparatif des caractéristiques clinico-biologiques moyennes des patients ayant autoconservé (pailles) par rapport à ceux n'ayant pas autoconservé (pas de paille).

	Pailles (n=29)	Pas de paille (n=40)	p
Age moyen Mr	33,4±6,1 (22-47)	33±5,3 (23-46)	0,68
VTT moyen (mL)	19,3±8,2 (7,6-41)	17±7,5 (7-39)	0,15
LH M0 (UI/L)	5,6±2,6 (1,3-11,6)	7,2±5,8 (1,7-32,6)	0,46
LH M1	14,5 ±5,7 (5,9-26)	17,2 ±11,8 (5,4-66,2)	0,72
LH M3	12 ±7 (4,2-30,7)	15,6 ±8,3 (3,2-35,8)	0,067
LH M6	11,5 ±4,5 (4,4-19,5)	13,2 ±7,2 (3,2-34,9)	0,064
LH M9	9,3 ±4,8 (2,1-19)	14,4 ±10,8 (5,3-42,4)	0,49
Testostérone totale M0 (ng/mL)	4,2±1,6 (1,3-7,1)	4±1 (2,2-6,4)	0,85
Testostérone totale M1 (ng/mL)	9 ±4,1 (2,6-20,9)	8,3 ±2,5 (3,5-12,2)	0,86
Testostérone totale M3 (ng/mL)	8 ±3,5 (2,1-15,8)	7,6 ±2,8 (3,4-14,1)	0,80
Testostérone totale M6 (ng/mL)	8,3 ±4,8 (2-24,7)	7,8 ±3 (3,1-15,7)	0,85
Testostérone totale M9 (ng/mL)	5,7 ±2,3 (3-9,4)	6,7 ±3,1 (2,1-12,8)	0,46
FSH M0 (UI/L)	13,4±7,1 (1,6-25,8)	18,7±14,1 (1,7-66)	0,19
FSH M1 (UI/L)	25,4±13,5 (3,9-55,7)	33,7 ±18,8 (4,9-88,3)	0,075
FSH M3 (UI/L)	22,3±13,4 (3,5-61,6)	31,9 ±17,2 (3,8-78,8)	0,006
FSH M6 (UI/L)	22,2±9,6 (3,4-43,3)	27,5 ±14,9 (3,4-66,5)	0,21
FSH M9 (UI/L)	16,4±8,5 (5-30)	28,9 ±15,2 (8,3-58,6)	0,050
Inhibine B M0 (pg/mL)	58,8±51,4 (10-236)	47,2±53,1 (10-244)	0,10
Inhibine B M1 (pg/mL)	62,1±63,2 (10-257)	39,8 ±51,8 (10-219)	0,14
Inhibine B M3 (pg/mL)	64,7 ±68,5 (10-305)	49 ±60,1 (10-244)	0,20
Inhibine B M6 (pg/mL)	64,8 ±73,9 (10-262)	55 ±68,5 (10-259)	0,36
Inhibine B M9 (pg/mL)	73,7±65 (10-201)	62,1 ±72,3 (10-221)	0,50

Le tableau présente les valeurs moyennes ± écart-type (min-max).

A. LH moyenne

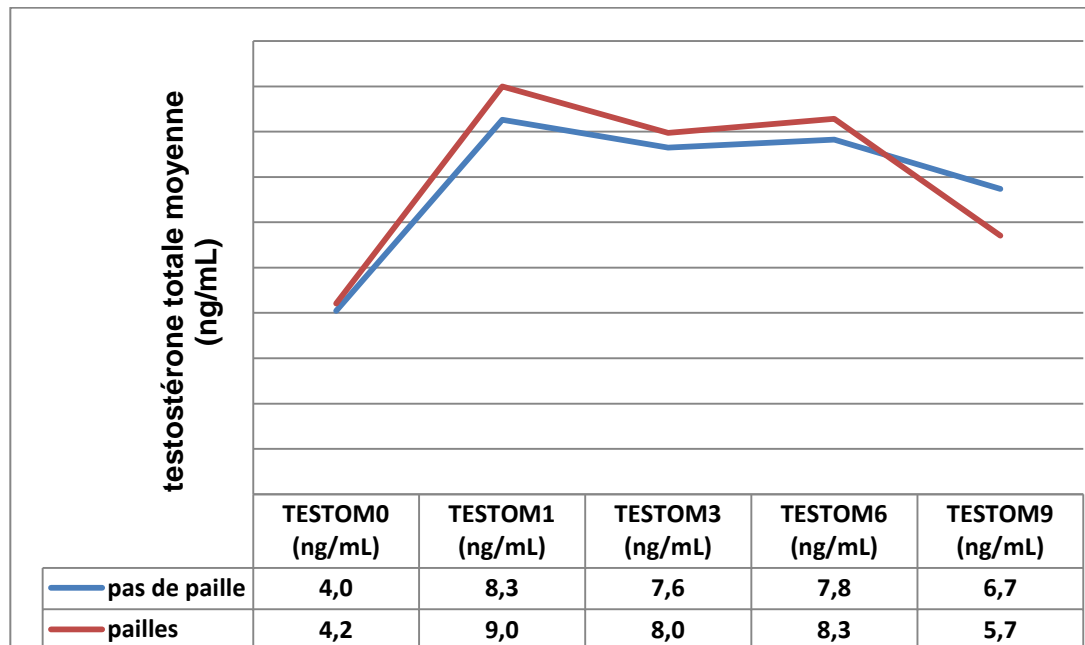
Figure 23 : Courbes et résultats hormonaux de l'évolution de la LH moyenne (en UI/L), pour les patients ayant conservé des pailles (n=29), et les patients n'ayant pas conservé de paille (n=40).



On observe une évolution à peu près semblable de la LH dans les 2 groupes. Les patients ayant eu des pailles et ceux n'ayant pas eu de paille ont une LH de base qui n'est pas statistiquement différente à M0, ni à M1, M3 et M6 (**Tableau 6**).

B. Testostérone totale moyenne

Figure 24 : Courbes et résultats hormonaux de l'évolution de la testostérone totale moyenne (en ng/mL), pour les patients ayant conservé des pailles (n=29), et les patients n'ayant pas conservé de paille (n=40)

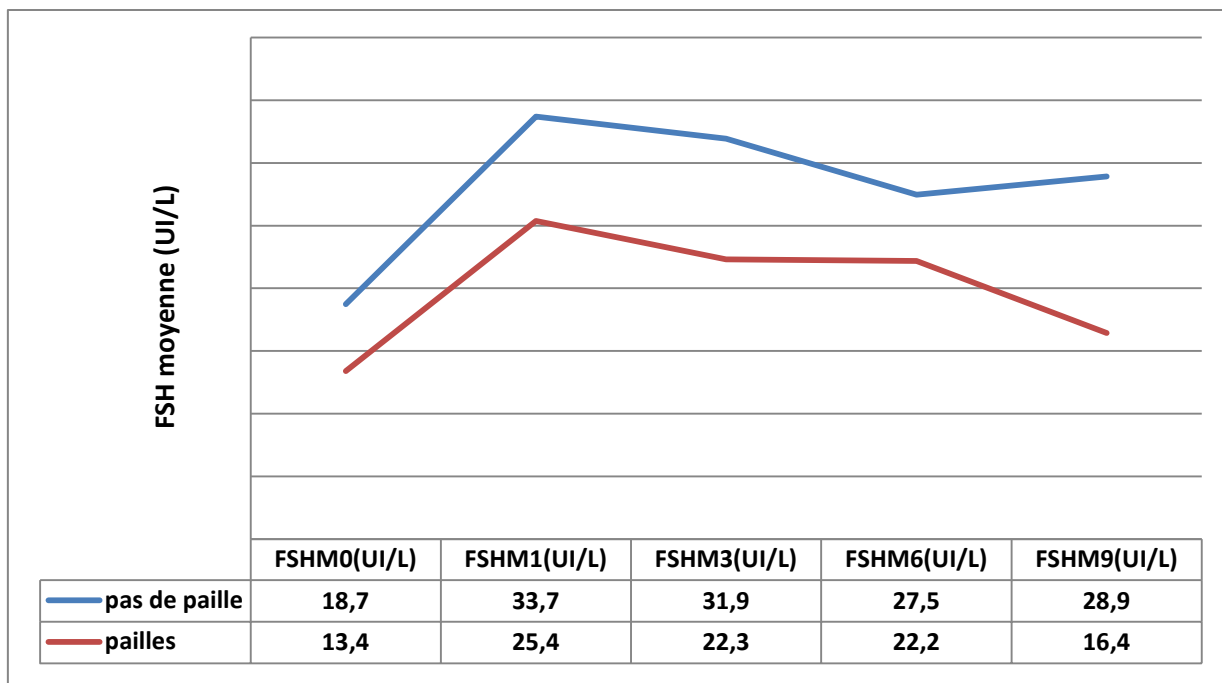


On observe une évolution comparable de la testostérone totale dans les 2 groupes, avec une testostérone totale à peu près équivalente à M0.

Il n'y a pas de différence significative de taux de testostérone totale entre les groupes ayant eu des pailles ou non (**Tableau 6**).

C. FSH moyenne

Figure 25 : Courbes et résultats hormonaux de l'évolution de la FSH moyenne (en UI/L), pour les patients ayant conservé des pailles (n=29), et les patients n'ayant pas conservé de paille (n=40).

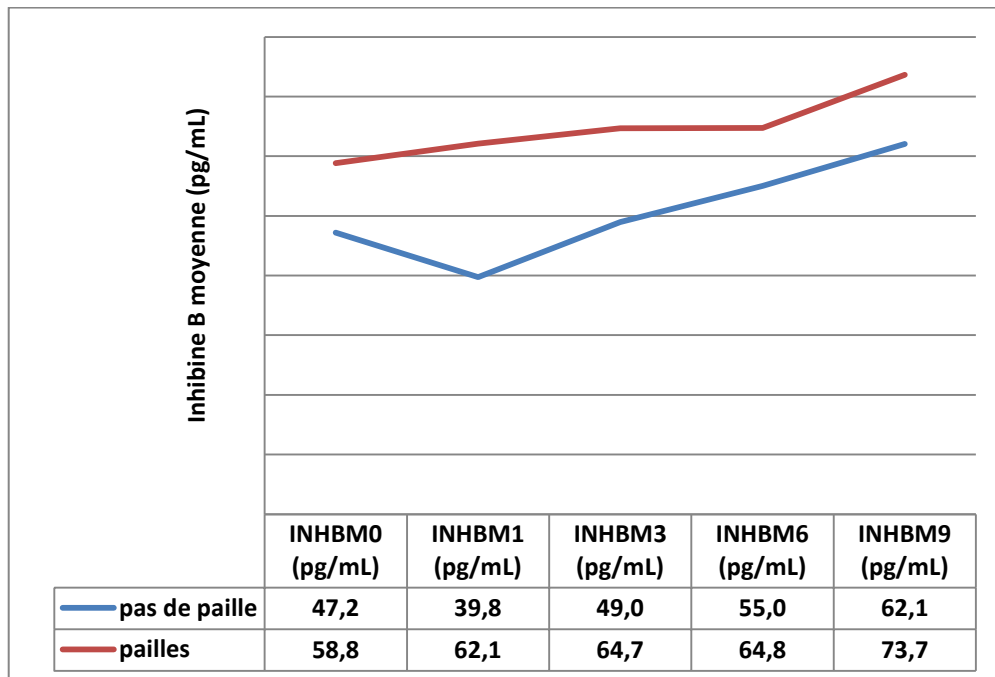


On observe une évolution comparable de la FSH dans les 2 groupes, avec une FSH à M0, M1, et M6 qui n'est pas différente statistiquement.

Cependant on observe au cours de la stimulation une tendance à une FSH inférieure chez les patients ayant eu des pailles, par rapport aux patients n'ayant pas eu de paille, non significative à M1 ($p=0,075$) et à M6 ($p=0,21$), qui devient statistiquement significative à M3 ($p=0,006$) et à M9 ($p=0,05$) (**Tableau 6**).

D. Inhibine B moyenne

Figure 26 : Courbes et résultats hormonaux de l'évolution de l'inhibine B moyenne (en pg/mL), pour les patients ayant conservé des pailles (n=29), et les patients n'ayant pas conservé de paille (n=40).



L'inhibine B moyenne croît progressivement de M0 à M6 puis on observe une impulsion à M9, pour les patients ayant eu des pailles.

Pour ceux n'ayant pas eu de paille, elle diminue de M0 à M1 puis croît progressivement jusque M9, à une valeur inférieure à celle de l'inhibine B moyenne des patients ayant conservé, mais sans différence significative (**Tableau 6**).

DISCUSSION

Lors de ce travail, nous avons tenté d'analyser les indicateurs hormonaux et spermatiques chez des patients présentant une spermatogenèse défailante, à type d'azoospermie ou de cryptozoospermie non obstructives et traités par le citrate de clomiphène. L'objectif de cette stimulation hormonale était d'améliorer la spermatogenèse des patients sélectionnés qui pourrait permettre une autoconservation de sperme éjaculé ou testiculaire, compatible avec une éventuelle utilisation en AMP avec la technique de FIV-ICSI.

Les patients tentaient des autoconservations spermatiques au CECOS à 3, 6, et 9 mois de traitement par le citrate de clomiphène. Dans un second temps, une biopsie testiculaire à visée d'extraction testiculaire de spermatozoïdes, après traitement par le citrate de clomiphène (TESE-2), pouvait être proposée au patient en fonction des résultats des autoconservations spermatiques, du phénotype histologique testiculaire, et des données clinico-biologiques.

- **Réponse hormonale au citrate de clomiphène**

La réponse hormonale observée dans les 3 groupes correspond à ce qui a été décrit dans la littérature sur les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERM) chez l'homme (11,17,46). Nous avons ainsi observé, dès le mois suivant l'introduction du traitement, une forte augmentation de la LH, la testostérone totale et de la FSH.

Cette augmentation était la plus forte en début de traitement, entre M0 et M1, puis restait stable. En effet, la posologie de citrate de clomiphène était ajustée à la consultation M1, en fonction de la tolérance du patient, et de la testostérone totale. Si la testostérone restait basse, la dose était majorée avec prudence. Au contraire, si la testostérone dépassait les 10 ng/mL, la dose était minorée. L'objectif était d'obtenir une testostérone totale proche de 9 ng/mL (valeur normale haute dans notre laboratoire).

L'inhibine B a montré un peu plus d'inertie que la LH, FSH, et que la testostérone totale. Elle a plutôt augmenté à partir de M6. Cela semble cohérent car l'inhibine B est sécrétée par les cellules de Sertoli avec une participation supposée des cellules germinales (47). Ainsi, l'effet du citrate de clomiphène sur l'inhibine B se manifesterait par l'intermédiaire de la LH, FSH et de la testostérone totale au niveau testiculaire, et serait décalé dans le temps. A notre connaissance, il n'existe pas actuellement de données scientifiques sur l'inhibine B et le citrate de clomiphène.

Lorsque l'on compare la réponse hormonale en fonction des groupes ayant eu des pailles ou non, on observe des tendances intéressantes. Il n'y a pas de différence statistiquement significative observée entre les 2 groupes, sur le profil hormonal à M0.

Cependant on constate une tendance à une FSH plus élevée chez les patients n'ayant pas eu de paille que pour ceux ayant eu des pailles. Cette tendance est visible dès M0, sans différence significative entre les 2 groupes. La différence devient significative à M3 et à M9 de la stimulation. Cela confirme que la réponse hormonale à la stimulation est différente entre les groupes ayant conservé des pailles ou non (**Tableau 6, page 67**). Les patients n'ayant pas eu de paille présenteraient ainsi des signes de dysfonction sertolienne, avec une FSH augmentant fort au cours de la stimulation par rapport à ceux ayant eu des pailles, sans reprise de la spermatogenèse toutefois. Cela pourrait donc être interprété, au cours de la stimulation, comme un signe péjoratif, marqueur de l'atteinte du compartiment exocrine testiculaire.

De plus, on constate une tendance à une LH inférieure, se manifestant après plusieurs mois de stimulation à M3 et à M6, chez les patients ayant eu des pailles. Les 2 groupes de patients n'auraient pas les mêmes réponses hormonales à la stimulation par citrate de clomiphène. Cela pourrait s'expliquer par une dysfonction leydigienne chez les patients n'ayant pas eu de paille, par désensibilisation des cellules de Leydig aux gonadotrophines notamment. Ils auraient besoin de plus de LH pour présenter une testostérone similaire. Cela serait donc un stigmate de l'atteinte testiculaire endocrine, qui se manifesterait dès le 3^{ème} mois de stimulation.

Concernant l'inhibine B, nous n'avons pas observé de différence significative entre les 2 groupes au cours de l'étude, ni à M0, ni au cours de la stimulation. Elle

n'apparaît pas comme un bon marqueur prédictif de la réponse au traitement par le citrate de clomiphène chez nos patients. Mais l'inhibine B étant un marqueur de la spermatogenèse (48), il est possible qu'un suivi à plus long terme soit nécessaire pour observer des variations significatives de ce paramètre. Les courbes de réponses hormonales montrent également une certaine inertie avec une réponse qui apparaît à M6-M9 de la stimulation.

Pour les patients n'ayant pas eu de paille, on observe donc une tendance à une FSH et une LH plus élevées que ceux ayant eu des pailles. Ces tendances sont significatives à M3 et M9 pour la FSH. Ainsi, pour ces patients, le bilan biologique montre les stigmates, dès le début de la stimulation, d'une défaillance testiculaire primaire des compartiments leydigien et sertolien. Ce syndrome est décrit dans la littérature et se traduit variablement par une spermatogenèse inexistante (azoospermie) ou inefficace (crypto-azoospermie) et fréquemment par un hypogonadisme clinique et parfois biologique (49–51). Nous observons d'ailleurs chez nos patients, un volume testiculaire total moyen (VTT) diminué à 17,9 mL dans notre population totale (*page 50*), qui n'est pas statistiquement différent entre les groupes ayant eu des pailles (VTT moyen=19,3 mL) et n'ayant pas conservé de paille (VTT moyen=17 mL) ($p=0,15$. **Tableau 6**, *page 67*). Nos patients étant sélectionnés sur des critères d'atteinte spermatique grave, ces résultats ne sont pas surprenants, néanmoins nous observons ces signes d'insuffisance testiculaire de façon plus importante pour le groupe n'ayant pas conservé de paille.

Toutefois, ces résultats hormonaux sont à interpréter avec précaution, car seuls 27 patients sur les 69 patients inclus ont effectué le bilan biologique de suivi à M9. La non significativité de la différence de taux de FSH entre les 2 groupes à M6 pourrait être lié à la taille de l'effectif.

Il faut également prendre en compte, au-delà du profil d'insuffisance testiculaire, les autres traitements médicamenteux pris par nos patients. En effet, le CYP2D6 métabolise un grand nombre de médicaments, notamment les antidépresseurs, les antipsychotiques, les anti-arythmiques, les β -bloquants, les analgésiques opioïdes et les anticancéreux (52,53). Ainsi des traitements médicamenteux communément utilisés peuvent créer des interférences sur le métabolisme du citrate de clomiphène, en augmentant ou diminuant son activité (54). Il serait intéressant de disposer de ces données.

- **Autoconservations spermatiques**

Concernant les autoconservations spermatiques, les patients « cryptozoospermes » semblent être le groupe qui a montré le meilleur taux d'autoconservation. En effet, 22 patients parmi les 33 « cryptozoospermes » (66,6%) ont eu une autoconservation de sperme.

Parmi eux, 13 ont eu des pailles de sperme éjaculé, 6 ont eu des pailles de sperme testiculaire, et 3 patients ont eu des pailles de sperme éjaculé et testiculaire. Ces 3 patients, qui avaient eu une autoconservation de sperme éjaculé, ont augmenté leur stock de pailles avec des pailles testiculaires.

Effectivement, la stimulation ayant donné des 1ers résultats encourageants, il était pertinent de proposer une réintervention testiculaire.

Le groupe « cryptozoospermes », constitué de patients présentant des fluctuations du spermogramme selon les recueils, entre azoospermie et cryptozoospermie plus ou moins sévère, paraissent donc être les meilleurs répondeurs au citrate de clomiphène.

Ces résultats semblent cohérents avec notre hypothèse et le mode d'action du citrate de clomiphène, ces patients présentant de façon variable une spermatogenèse *a minima*. De plus, une méta-analyse de 11 essais randomisés évaluant l'effet des antagonistes des œstrogènes dans l'infertilité masculine idiopathique a démontré l'efficacité du citrate de clomiphène à 50 mg/j chez des patients présentant une oligo-asthéo-tératozoospermie variable et une infertilité de plus d'1 an (OR= 5,06, $p=0,003$) (17). Il a notamment été démontré l'augmentation du nombre de grossesses spontanées, de la numération spermatique, l'amélioration de la mobilité spermatique, mais aussi l'augmentation de la FSH et de la testostérone (17). Ainsi, les patients cryptozoospermes, sur le plan physiopathologique, pourraient s'approcher de patients oligozoospermes extrêmement sévères, ce qui conforte nos résultats.

Cependant tous les patients « cryptozoospermes » n'ont pas pu autoconserver, leurs atteintes de la spermatogenèse étant extrêmement variables.

Concernant les groupes de patients « azoospermes » et « azoospermes virtuels », le taux d'autoconservation spermatique est moins élevé mais l'atteinte de

la spermatogénèse est encore plus sévère, des spermatozoïdes n'ayant jamais été mis en évidence sur les spermogrammes avant stimulation.

Pour le groupe « azoospermes », nous avons ainsi observé des spermatozoïdes sur l'éjaculat pour 4 patients, sans conservation possible étant donné la trop faible numération estimée. En effet, les pailles n'auraient pas été utilisables en FIV-ICSI, étant donné le risque de ne récupérer aucun spermatozoïde vivant après décongélation. Il a en effet été mis en évidence que la congélation de spermatozoïdes aurait un impact négatif sur la vitalité, la motilité et la morphologie spermatique (55). Il aurait également été observé que lorsque les paramètres spermatiques sortent des valeurs de références, la récupération post-décongélation est encore moins bonne (56). Toutefois, lors de la TESE-2, 3 patients ont eu une congélation de pailles de sperme testiculaire. On a donc objectivé une spermatogénèse pour 7 patients (28%), avec une congélation de pailles pour 3 d'entre eux (12%).

Ces résultats ne sont pas concordants avec l'étude d'Alayman Hussein (15), qui a traité 42 patients ANO par citrate de clomiphène pendant 3 à 9 mois.

Cette étude avait retrouvé des spermatozoïdes dans l'éjaculat pour 27 (soit 64,3%) d'entre eux. Pour les 15 patients restant azoospermiques, des spermatozoïdes avaient été retrouvés lors d'une TESE-2, en quantité suffisante pour être utilisés en FIV-ICSI. Cette étude aurait donc permis 100% d'autoconservation spermatique pour ces 42 patients ANO sélectionnés, avec un arrêt de maturation (n=19) ou une hypospermatogénèse (n=23) (15).

Au niveau du profil clinico-biologique des patients ANO de l'étude de Hussein, il faut remarquer que les patients présentaient un VTT moyen de 37 ml (17,9 ml dans notre étude) et une FSH de base moyenne à 7,21 UI/L (16,5 UI/L dans notre étude). Ces éléments apparaissent étonnants pour des patients présentant une atteinte sécrétoire de la spermatogénèse.

Ainsi, il est possible que les paramètres d'inclusion de nos patients, en termes d'atteinte testiculaire, soient différents de ceux de l'étude d'Hussein (15).

Au niveau du phénotype histologique, 23 parmi les 42 patients ANO de cette étude présentaient une hypospermatogénèse (57,2%), alors que dans notre étude, nous avons inclus 3 phénotypes histologiques d'hypospermatogénèse (soit 6% des

patients ayant eu une TESE-1), qui est le phénotype histologique le moins défavorable.

De plus dans notre étude, nos patients présentaient une hypospermatogenèse incomplète très sévère avec une diminution importante du nombre de cellules germinales et une non-différenciation en stade mature de spermatide allongée/spermatozoïde.

L'étude d'Alayman Hussein a probablement inclus des patients ANO qui présentaient une hypospermatogenèse moins sévère, et donc de meilleure qualité.

- **Autoconservations spermatiques et phénotype histologique**

Ainsi le phénotype histologique est un élément déterminant dans l'évaluation de nos patients. Le phénotype histologique retenu était défini par le type histologique prédominant lors de la TESE-1.

Nous avons ainsi observé des phénotypes purs pour 27 patients (63% des TESE-1) sur l'analyse histo-pathologique de la TESE-1.

Parmi ces 27 patients, 13 présentaient un arrêt de maturation pur dont 2 patients ont eu des pailles congelées (15,4% d'autoconservation spermatique).

Pour les 3 patients qui présentaient un phénotype d'hypospermatogenèse, 1 patient a suffisamment répondu au traitement pour autoconserver.

Les 11 patients pour lesquels un SCOS avait été identifié sur la TESE-1 n'ont pas autoconservé de paille. Ces patients avaient été inclus car des spermatozoïdes avaient été visualisés lors de la TESE-1, sans conservation réalisable, pour 6 d'entre eux. Pour les 5 autres, des arguments clinico-biologiques favorables, tels qu'un volume testiculaire normal, une FSH basse et une inhibine B élevée, laissaient envisager une potentielle réponse au traitement.

Cependant, les résultats de cette étude nous montreraient qu'une analyse histologique qui met en évidence un SCOS serait péjorative, même en présence de signes cliniques favorables (inhibine B élevée, FSH basse et VTT conservé).

Par ailleurs, on constate que pour les 16 patients ayant présenté un phénotype histologique mixte à la TESE-1 (27% des TESE-1), une part de SCOS est constamment présente, associée soit à un arrêt de maturation (31%), soit à une hypospermatogenèse (69%).

Mais dans les cas présentant 2 types histologiques dominants, le pronostic du SCOS est bien meilleur, car partiel. Les patients pour lesquels l'histologie montrait un SCOS associé à une hypospermatogenèse ont mieux répondu au traitement (54% d'autoconservation spermatique) que ceux pour lesquels l'histologie montrait un SCOS associé à un arrêt de maturation (20% d'autoconservation spermatique).

Ces résultats d'autoconservation spermatique en fonction du phénotype histologique semblent cohérents avec l'étude de Su et al (57). Cette étude retrouve une bonne prédiction du phénotype histologique prédominant lors d'une biopsie testiculaire avant de réaliser une TESE. Elle retrouve en effet plus d'extraction dans les hypospermatogenèses suivies des arrêts de maturation puis des SCOS (57).

- **Résultats des tentatives en AMP**

Concernant les résultats en AMP, au total, 14 tentatives en AMP ont été fructueuses pour 13 couples, avec la naissance de 15 enfants. Il y aura toutefois eu 11 échecs.

En effet, au-delà de l'aspect quantitatif des pailles, il ne faut pas négliger l'aspect qualitatif de l'extraction spermatique, chez des patients qui ont une atteinte extrêmement sévère de la spermatogenèse.

Leur défaillance testiculaire potentielle pourrait avoir un impact négatif sur la qualité de la spermatogenèse, même ré-initiée ou améliorée par la stimulation. Un impact négatif direct sur la fragmentation de l'ADN spermatique et des anomalies de condensation de la chromatine ont été décrits chez les patients présentant des spermatogenèses altérées (58). Il est d'ailleurs observé, pour ces extractions difficiles, une moins bonne résistance des spermatozoïdes à la congélation et la décongélation.

De même la « sur-stimulation » de tubes séminifères défaillants pourrait engendrer des anomalies épi-génétiques, ce qui pourraient expliquer certains échecs en AMP (59).

De plus, il a été observé dans la littérature qu'une recherche longue et approfondie de spermatozoïde, sur sperme testiculaire pour des ANO, ou éjaculé pour des cryptozoospermes, mène à des altérations morphologiques et cinétiques des spermatozoïdes (60). Il y aurait ainsi, pour ces patients ANO ou

cryptozoospermes, une diminution progressive des taux de fécondation, parallèle à l'augmentation de la durée de la recherche de spermatozoïde (60). De même, le taux de grossesse diminue avec un temps de recherche qui s'allonge, pour les spermatozoïdes chirurgicaux (60).

Cependant une autre étude aurait montré que, pour des patients cryptozoospermes sévères, l'utilisation de sperme testiculaire, en cas de très mauvais paramètres de sperme éjaculé, donnerait de meilleurs taux de fécondation et de grossesses que l'utilisation du sperme éjaculé (28).

Leur effectif est faible (16 couples) mais ces données semblent en accord avec le fait que, quelle que soit l'origine du sperme, éjaculé ou testiculaire, il faut privilégier le sperme de meilleure qualité (28). En effet cela permettra une technique moins longue et moins délétère pour l'intégrité des spermatozoïdes.

C'est dans cet objectif que nos patients « cryptozoospermes » ont, pour la plupart, été inclus. Le but était d'améliorer la qualité de leur autoconservation spermatique, et de permettre une faisabilité technique sur sperme éjaculé, avec des meilleurs paramètres spermatiques. La finalité étant la tentative en AMP.

Concernant les résultats en AMP, il est nécessaire de prendre également en compte la part féminine pour pouvoir interpréter les causes probables d'un succès ou d'un échec de tentative.

Les chances de réussite sont conditionnées à 50% par la partenaire, c'est pourquoi il est indispensable de prendre en compte les paramètres féminins. Une bonne qualité ovocytaire permet en effet de compenser et réparer des anomalies spermatiques, même si l'ovocyte ne peut pas tout réparer. Ainsi la qualité et le développement embryonnaire, puis ensuite les chances d'implantation sont fortement conditionnées par la qualité ovocytaire (61), au-delà de la qualité de l'autoconservation spermatique (62).

Dans notre étude, les conjointes des patients qui ont conservé des pailles avaient en moyenne 30 ± 3 ans (26-37 ans), pour les couples ayant eu des enfants.

Pour les couples ayant eu des échecs et pas d'enfant en AMP, les conjointes avaient en moyenne 31 ± 4 ans (25-38 ans). On ne retrouve pas de différence significative d'âge entre ces groupes ($p = 1,0$).

A priori, les succès et échecs de tentatives en AMP ne seraient pas imputables à une différence d'âge des conjointes.

Les issues de tentatives en AMP seraient plutôt liées à une association de plusieurs facteurs, d'origine masculine, de par la qualité des pailles et la qualité intrinsèque des spermatozoïdes, mais également d'origine féminine, de par la qualité ovocytaire, la réserve ovarienne, et les éventuelles comorbidités associées.

- **Points forts de l'étude**

Les points forts de notre étude sont le suivi prospectif, prolongé 9 à 12 mois, de 69 patients présentant des critères stricts d'inclusion.

Ce suivi était mono-centrique, les patients ont donc été suivis et opérés selon les mêmes modes opératoires, avec un suivi biologique dans le même laboratoire pour les bilans.

Les TESE-2 ont été réalisées par le même laboratoire que les TESE-1, avec les mêmes procédures, et la même compétence technique.

De même, toutes les analyses histologiques des biopsies testiculaires ont été réalisées par la même personne. Elles étaient par ailleurs réalisées en aveugle des résultats d'autoconservation et d'extraction testiculaire. Cela nous permet de nous affranchir de la variabilité de l'analyse inter-opérateur d'un examen délicat.

L'analyse génétique du polymorphisme génétique du CYP2D6 a permis de dépister 90% des personnes mutées pour le CYP2D6.

- **Points faibles et limitations de l'étude :**

Un point faible de notre étude pourrait être un effectif de patients trop faible pour atteindre une représentativité statistique suffisante. Ces résultats sont donc préliminaires.

De plus, en termes de données, nous ne disposons pas du phénotype histologique pour 24 patients cryptozoospermes, qui n'avaient pas eu de biopsie testiculaire exploratoire avant la mise en place du traitement par citrate de clomiphène. Quelques données étaient également manquantes dans le suivi hormonal, principalement à M9 avec 27/69 patients ayant effectué le bilan à M9.

D'autres données très informatives sont également manquantes concernant la superposition entre l'autoconservation et la durée du traitement, les fichiers du CECOS n'étant pas informatisés, il était difficile de compiler ces données supplémentaires.

Par ailleurs, le dépistage génétique du CYP2D6 étudie les 3 principales mutations connues, dépistant 90% des personnes mutées. Il existerait donc un risque théorique que 10% des mutés passent inaperçus dans notre étude, car ils auraient des mutations plus rares. Ils apparaîtraient alors comme des patients non répondeurs. Mais ces patients seraient en fait déficitaires en CYP2D6, et ne métaboliseraient pas correctement le citrate de clomiphène, qui n'agirait pas chez eux.

- **Perspectives**

Cette étude a montré des résultats positifs dans les 3 groupes de patients traités. Il apparaît cependant chez les « azoospermes », qui présentent l'atteinte la plus sévère de la spermatogenèse, que les pailles ont été réalisées exclusivement lors de la TESE-2 pour les 3 patients qui en ont bénéficié.

Au vu de ces résultats, peut-être faudrait-il amener la TESE-2 systématiquement dès l'inclusion dans le protocole, pour les patients azoospermes ? Toutefois 2 patients « azoospermes virtuels » ont eu des pailles sur sperme éjaculé, ce qui justifie pleinement de maintenir le suivi spermatique au CECOS, spécifiquement pour ce groupe de patients azoospermes.

Il faut néanmoins préciser que ce suivi est très lourd pour le patient, l'équipe du CECOS, et les équipes médicales et biologiques impliquées dans le protocole et lors des tentatives en AMP.

Afin de nous assurer d'administrer le citrate de clomiphène aux patients répondeurs, nous étudions le CYP2D6.

Cependant il pourrait être judicieux, dans cette cohorte de patients infertiles, d'envisager un screening génétique plus large, étudiant les causes génétiques de stérilité masculine connues actuellement, telles que la recherche de mutations du récepteur aux androgènes, qui pourrait expliquer une insensibilité au citrate de clomiphène.

De même, le phénotypage d'autres cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme du citrate de clomiphène, voir même l'étude du métabolisme via les métabolites urinaires du citrate de clomiphène pourraient permettre de comprendre beaucoup plus finement la réponse ou la non réponse de certains patients au traitement.

Il semble indispensable d'améliorer le recueil de données des patients, en particulier sur le plan temporel, pour pouvoir exploiter au maximum les résultats. L'objectif est celui de répondre à une demande, souvent douloureuse, et de proposer une prise en charge optimale pour le patient et adaptée au couple.

CONCLUSION

Le traitement par citrate de clomiphène, peu coûteux, d'utilisation assez aisée avec une prise orale journalière et montrant peu d'effets secondaires semble une option pour stimuler la spermatogenèse chez l'homme présentant des altérations sévères de la spermatogenèse.

Ce travail est préliminaire mais laisse envisager une réponse hormonale et spermatique dans les 3 groupes. Nous avons en effet observé 12% d'autoconservation dans le groupe « azoospermes », 36,4% dans le groupe « azoospermes virtuels », et 66,7% dans le groupe « cryptozoospermes ».

Au final dans notre étude 28,6% des patients ont eu des pailles de sperme éjaculé et 48,2% des patients ayant eu une TESE-2 ont eu des pailles de sperme testiculaire.

Ce traitement apparaît donc intéressant chez ces patients pour lesquels aucune solution thérapeutique de référence n'a encore été proposée.

Il convient toutefois de poursuivre l'étude et de recueillir les issues de tentatives en AMP sur une cohorte de patients plus importante et présentant des critères d'inclusion stricts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* juin 2007;22(6):1506-12.
2. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod.* juill 1991;6(6):811-6.
3. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril.* nov 2008;90(5 Suppl):S74-77.
4. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 4 juill 1992;340(8810):17-8.
5. Sokol RZ, Steiner BS, Bustillo M, Petersen G, Swerdloff RS. A controlled comparison of the efficacy of clomiphene citrate in male infertility. *Fertil Steril.* mai 1988;49(5):865-70.
6. Paulson DF, Wacksman J. Clomiphene citrate in the management of male infertility. *J Urol.* janv 1976;115(1):73-6.
7. Schellen TM. Clomiphene treatment in male infertility. *Int J Fertil.* 1982;27(3):136-45.
8. Ross LS, Kandel GL, Prinz LM, Auletta F. Clomiphene treatment of the idiopathic hypofertile male: high-dose, alternate-day therapy. *Fertil Steril.* juin 1980;33(6):618-23.
9. Carpi A, Sabanegh E, Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* avr 2009;91(4):963-70.
10. Fontenot GK, Wiehle RD, Podolski JS. Differential effects of isomers of clomiphene citrate on reproductive tissues in male mice. *BJU Int.* févr 2016;117(2):344-50.
11. Whitten SJ, Nangia AK, Kolettis PN. Select patients with hypogonadotropic hypogonadism may respond to treatment with clomiphene citrate. *Fertil Steril.* déc 2006;86(6):1664-8.
12. Dickey RP, Holtkamp DE. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Hum Reprod Update.* déc 1996;2(6):483-506.
13. Mürdter TE, Kerb R, Turpeinen M, Schroth W, Ganchev B, Böhmer GM, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 determines oestrogen receptor activity of the major infertility drug clomiphene via its active metabolites. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2012;21(5):1145-54.
14. Moss JL, Crosnoe LE, Kim ED. Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertil Steril.* juin 2013;99(7):1814-20.

15. Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Niederberger C. Clomiphene administration for cases of nonobstructive azoospermia: a multicenter study. *J Androl.* déc 2005;26(6):787-791-793.
16. Ghanem H, Shaeer O, El-Segini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 1 mai 2010;93(7):2232-5.
17. Chua ME, Escusa KG, Luna S, Tapia LC, Dofitas B, Morales M. Revisiting oestrogen antagonists (clomiphene or tamoxifen) as medical empiric therapy for idiopathic male infertility: a meta-analysis. *Andrology.* sept 2013;1(5):749-57.
18. Dabaja AA, Schlegel PN. Medical treatment of male infertility. *Transl Androl Urol.* mars 2014;3(1):9-16.
19. Bertrand-Delepine J, Leroy C, Rigot JM, Catteau- Jonard S, Dewailly D, Robin G. Stimulation of spermatogenesis : for whom? Why? How? *Gynecologie Obstétrique. Fertil* juin 2016 (sous presse).
20. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* mai 2014;29:66-75.
21. Schlatt S, Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol.* mai 2014;29:2-16.
22. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol.* mai 2010;205(2):117-31.
23. Mermelstein PG, Micevych PE. Nervous system physiology regulated by membrane estrogen receptors. *Rev Neurosci.* 2008;19(6):413-24.
24. Weiser MJ, Foradori CD, Handa RJ. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev.* mars 2008;57(2):309-20.
25. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* juin 2010;16(3):231-45.
26. Auger J, Jouannet P, Eustache F. Another look at human sperm morphology. *Hum Reprod.* janv 2016;31(1):10-23.
27. Koscinski I, Wittemer C, Lefebvre-Khalil V, Marcelli F, Defossez A, Rigot JM. Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryopreservation programme. *Hum Reprod.* oct 2007;22(10):2679-84.
28. Bendikson KA, Neri QV, Takeuchi T, Toschi M, Schlegel PN, Rosenwaks Z, et al. The Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection Using Occasional Spermatozoa in the Ejaculate of Men With Spermatogenic Failure. *J Urol.* sept 2008;180(3):1060-4.

29. Hauser R, Bibi G, Yogev L, Carmon A, Azem F, Botchan A, et al. Virtual azoospermia and cryptozoospermia--fresh/frozen testicular or ejaculate sperm for better IVF outcome? *J Androl.* oct 2011;32(5):484-90.
30. Huyghe E, Izard V, Rigot J-M, Pariente J-L, Tostain J, les membres du Comité d'andrologie de l'association française d'urologie (CCAFU). [Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines]. *Prog Urol.* févr 2008;18(2):95-101.
31. Bourcigaux N, Christin-Maître S. [Hormonal evaluation in infertile men]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* mai 2008;36(5):551-6.
32. Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers M-C, Marcelli F, Rigot J-M, et al. [Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis]. *Ann Pathol.* juin 2010;30(3):182-95.
33. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* sept 1994;62(3):639-41.
34. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* juin 1995;10(6):1457-60.
35. Kahraman S, Ozgür S, Alataş C, Aksoy S, Taşdemir M, Nuhoğlu A, et al. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod.* avr 1996;11(4):756-60.
36. Nijs MM, Van Der Elst JC. Biological aspects of testicular sperm extraction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* sept 2000;92(1):1-6.
37. Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, et al. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia--is it necessary? *Hum Reprod.* nov 1998;13(11):3081-5.
38. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Høie-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod.* janv 2007;22(1):2-16.
39. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Use of clomiphene citrate in infertile women: a committee opinion. *Fertil Steril.* août 2013;100(2):341-8.
40. Ji M, Kim K-R, Lee W, Choe W, Chun S, Min W-K. Genetic Polymorphism of CYP2D6 and Clomiphene Concentrations in Infertile Patients with Ovulatory Dysfunction Treated with Clomiphene Citrate. *J Korean Med Sci.* févr 2016;31(2):310-4.
41. Tostain J, Rossi D, Martin PM. [Physiology of androgens in adult men]. *Prog Urol.* nov 2004;14(5):639-60.

42. Bernhardt R, Urlacher VB. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(14):6185-203.
43. Ghobadi C, Gregory A, Crewe HK, Rostami-Hodjegan A, Lennard MS. CYP2D6 is primarily responsible for the metabolism of clomiphene. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(2):101-5.
44. Wang D, Poi MJ, Sun X, Gaedigk A, Leeder JS, Sadee W. Common CYP2D6 polymorphisms affecting alternative splicing and transcription: long-range haplotypes with two regulatory variants modulate CYP2D6 activity. *Hum Mol Genet.* 1 janv 2014;23(1):268-78.
45. Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, et al. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics.* juin 1996;6(3):193-201.
46. Tsourdi E, Kourtis A, Farmakiotis D, Katsikis I, Salmas M, Panidis D. The effect of selective estrogen receptor modulator administration on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in men with idiopathic oligozoospermia. *Fertil Steril.* avr 2009;91(4 Suppl):1427-30.
47. Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol.* nov 2001;145(5):561-71.
48. Barbotin A-L, Ballot C, Sigala J, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, et al. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol.* juin 2015;172(6):669-76.
49. Madbouly K, Al-Hooti Q, Albkri A, Ragheb S, Alghamdi K, Al-Jasser A. Clinical, endocrinological and histopathological patterns of infertile Saudi men subjected to testicular biopsy: A retrospective study from a single center. *Urol Ann.* sept 2012;4(3):166-71.
50. Lardone MC, Piottante A, Valdevenito R, Ebensperger M, Castro A. Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. *Andrologia.* déc 2013;45(6):379-85.
51. Andersson A-M, Jørgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2004;89(7):3161-7.
52. Wolf CR, Smith G. *Pharmacogenetics.* Br Med Bull. 1999;55(2):366-86.
53. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 testing in the clinical setting. *Mol Diagn Ther.* juin 2013;17(3):165-84.
54. Powers JL, Buys SS, Fletcher D, Melis R, Johnson-Davis K, Lyon E, et al. Multi-gene and Drug Interaction Approach for Tamoxifen Metabolite Patterns Reveals Possible Involvement of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB1. *J Clin Pharmacol.* 20 mai 2016;

55. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* mars 2002;17(3):704-9.
56. Degl'Innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Fino MG, et al. Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertil Steril.* déc 2013;100(6):1555-1563-3.
57. Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol.* janv 1999;161(1):112-6.
58. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril.* nov 2009;92(5):1638-45.
59. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 30 avr 2016;
60. Palermo GD, Neri QV, Schlegel PN, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in extreme cases of male infertility. *PloS One.* 2014;9(12):e113671.
61. Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, et al. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand.* févr 2001;80(2):169-74.
62. Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saïas-Magnan J, Melin M-C, Berthaut I, et al. The Semen Quality of 1158 Men With Testicular Cancer at the Time of Cryopreservation: Results of the French National CECOS Network. *J Androl.* 12 nov 2012;33(6):1394-401.

AUTEUR : Nom : CARLIER- LOOF Prénom : Valentine

Date de Soutenance : 21 juin 2016

Titre de la Thèse : La stimulation de la spermatogenèse par le citrate de clomiphène dans l'azoospermie et la cryptozoospermie : autoconservations et grossesses.

Thèse - Médecine - Lille 2016

Cadre de classement : Biologie de la Reproduction

DES + spécialité : DES de Biologie médicale – Spécialisation Biologie de la Reproduction Humaine

Mots-clés : azoospermie, cryptozoospermie, stimulation, citrate de clomiphène, autoconservations, TESE

Résumé :

Contexte : Depuis 1992, la FIV-ICSI a révolutionné la prise en charge des infertilités d'origine masculine, amenant un regain d'intérêt pour certains traitements tels que le citrate de clomiphène. Ce traitement était utilisé dans les années 1980 dans les infertilités masculines idiopathiques.

Méthode : Nous avons réalisé un suivi prospectif de 69 patients présentant des altérations sévères de la spermatogenèse pendant 9 à 12 mois. Ces patients ont été divisés en 3 groupes : « azoospermes » (n=25), « azoospermes virtuels » (n=11) et « cryptozoospermes » (n=33). Ils ont reçu un traitement par citrate de clomiphène et ont bénéficié d'un suivi clinique, biologique et spermatique pendant le traitement, à M0, M1, M3, M6 et M9.

Résultats : Trois/25 patients « azoospermes » (12%) ont autoconservé du sperme testiculaire. Deux couples ont fait des tentatives en AMP et ont eu 2 enfants.

Quatre/11 patients « azoospermes virtuels » ont eu des pailles (36,4%): 2 sur sperme éjaculé et 2 sur sperme testiculaire. Trois couples ont fait des tentatives en AMP, et 1 couple a eu 1 enfant.

Vingt-deux/33 patients « cryptozoospermes » ont eu des pailles (66,7%). Puis 19 couples ont fait des tentatives en AMP et 12 enfants sont nés pour 10 couples.

Au total, 15 enfants sont nés pour 13 couples.

Conclusion : Les 3 groupes de patients, qui présentaient des atteintes sévères de la spermatogenèse ont répondu au traitement par citrate de clomiphène. Les meilleurs répondeurs sont les cryptozoospermes. Quelques patients azoospermes ont répondu toutefois, ce qui conforte l'idée d'évaluer plus finement l'intérêt du citrate de clomiphène chez un nombre plus important de patients présentant des critères stricts d'inclusion.

Composition du Jury :

Président : Pr F. Broly

Asseseurs : Pr T. Brousseau, Pr S. Catteau-Jonard, Dr J-M. Rigot, Dr V. Mitchell, Dr B. Ducrocq