

# La spermatide ronde partenaire de l'ovocyte : autopsie d'un échec

Nada BORGHOL<sup>1</sup>, Ahmed ZIYYAT<sup>2</sup>, Thierry BLACHERE<sup>1</sup>, Annick LEFEVRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM/INRA U 418, Hopital Debrousse, Lyon

<sup>2</sup> Université Paris-Nord, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Bobigny

## RESUME

La spermatide ronde, bien que haploïde comme le spermatozoïde, reste un très improbable partenaire pour l'ovocyte humain : depuis l'introduction de la technique ROSI (pour "ROund SpermAtid Injec-tion») en clinique humaine en 1995, seulement 10 naissances ont été répertoriées malgré le grand nombre de tentatives réalisées. L'analyse dans un modèle animal de l'expression génique au début du développement suivant la microinjection d'une spermatide ouvre la voie à une meilleure compréhension de l'échec de ce mode de fécondation chez l'homme. Nous avons montré que, chez la souris, les profils d'expression des embryons pré-implantatoires étaient différents selon que le génome paternel était apporté par un spermatozoïde ou une spermatide ronde. Par ailleurs, suivant la microinjection d'une spermatide ronde, les gènes exprimés post-méiotiquement dans le gamète mâle sont réprimés à des temps différents au cours du développement, mettant en évidence une reprogrammation du génome de la spermatide par le cytoplasme ovocytaire. Une possible défaillance de cette reprogrammation pour expliquer l'échec du développement dans le cas de spermatides rondes provenant de patients infertiles est discutée.

**Mots clés :** spermatide ronde, ICSI, reprogrammation nucléaire, modifications épigénétiques

## I. INTRODUCTION

Jusqu'en 1992, la seule possibilité de paternité pour un homme présentant une azoospermie pour trouble de la spermatogenèse résidait dans le don de sperme ou l'adoption. L'avènement de l'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) a permis de franchir une première étape dans le traitement de l'infertilité masculine : dans les cas d'oligo-spermie, même sévère, elle permet d'obtenir un taux de grossesse comparable à celui de la FIV avec indication féminine. De plus, dans environ 60% des cas d'azoospermie non obstructive causée par une anomalie testiculaire, que ce soit un blocage de la spermatogenèse, une aplasie germinale, l'atrophie d'un testicule cryptorchide, une azoospermie consécutive à une chimiothérapie ou un syndrome de Klinefelter, un petit nombre de spermatozoïdes est accessible lorsque l'on fait une recherche approfondie avec des micro-biopsies testiculaires multiples. Il reste 40% des cas où aucun spermatozoïde n'est accessible le jour du recueil des ovocytes. Face à cette situation, Edwards et col. [12] ont été les premiers à suggérer que des spermatides pourraient être utilisées pour féconder des ovocytes humains. Les premières fécondations suivies ou non de naissances après microinjection de spermatides ont été réalisées chez le lapin [36]. Ogura et col. [31] et Kimura et col. [22] obtiennent la naissance de souris fertiles des deux sexes après électrofusion ou microinjection des ovocytes de souris par des spermatides rondes. Bien que le taux de réussite soit faible, ces expériences montraient que les spermatides étaient génétiquement aptes à féconder.

Correspondance :

Dr Annick Lefèvre - INSERM/INRA U 418, Hopital Debrousse, 29 rue soeur Bouvier, 69322 Lyon Cedex 05, France - Email lefevre@lyon.inserm.fr

Ces premiers résultats offraient donc de nouvelles perspectives au traitement de l'infertilité causée par un accident de la spermiogenèse. Vanderzwalmen et col. [49] furent les premiers à réaliser la fécondation d'un ovocyte humain par une spermatide allongée obtenue à partir d'une biopsie testiculaire et microinjectée. Tous les embryons obtenus se divisaient pour donner des embryons au stade 4 cellules. Fishel et col. [13] ont ensuite décrit l'implantation de tels embryons après transfert dans l'utérus. Puis la première naissance d'un enfant en bonne santé issu de la microinjection d'une spermatide paternelle a été obtenue par Tezarik et col. [44] confirmant la faisabilité de cette nouvelle approche, ou ROSI (ROund Spermatid Injection), dans le traitement de l'azoospermie non obstructive. Encouragées par ces résultats, d'autres équipes ont introduit la microinjection de spermatides dans le traitement de l'azoospermie, avec des résultats décevants. Depuis 1995, seulement 10 naissances par ROSI ont été répertoriées (Tableau 1). En fait, la qualité des embryons obtenus par ROSI est médiocre, comparée à celle des embryons obtenus par ICSI : leur taux de division est beaucoup plus faible ; leur morphologie est affectée, ils sont majoritairement de classe 3 ; leur progression vers le stade blastocyste est plus lente ; ils n'éclosent pas spontanément et ne s'implantent que rarement (Tableau 2).

Dans tous les cas décrits où la microinjection de spermatides rondes a conduit à des fécondations, puis des naissances, les patients présentaient à un moment de leur histoire des spermatides allongées ou des spermatozoïdes dans leur éjaculat ou dans une biopsie testiculaire réalisée à des fins diagnostiques. Par contre aucune grossesse n'a pu être obtenue lorsque les spermatides rondes sont issues d'un patient chez qui on n'a jamais mis en évidence la présence de spermatozoïdes ou de spermatides allongées dans l'éjaculat ou dans des biopsies testiculaires exploratrices [6, 7, 8, 19, 39, 50]. Il semble donc que les spermatides de ces patients n'ont pas acquis une étape de leur maturation essentielle à la fécondation.

En revanche, l'analyse de tous les cas faisant état de la microinjection de spermatides allongées (n=166) montre que les spermatides plus avancées dans leur développement permettent d'obtenir des taux de fécondation importants (48%) et des taux de division (90%) et de grossesse (28,9%) comparables à ceux obtenus en ICSI [42]. Le même constat a été fait chez le lapin où l'on voit que la fécondance et la capacité à permettre le développement embryonnaire sont plus élevées lorsque l'on utilise des spermatides rondes ayant un acrosome bien formé plutôt que des spermatides à des stades plus précoces de leur développement [38].

Un événement capital pour le développement de l'embryon intervient donc au cours de l'élongation des spermatides.

Or, en dehors des modifications morphologiques évidentes, c'est au cours de cette phase que les spermatides cessent progressivement de transcrire leurs gènes, alors que les histones sont remplacées par les protéines de transition puis par les protamines, pour permettre la condensation de l'ADN. Bien que haploïde, la spermatide ronde transcrit activement de nombreux gènes alors que spermatides allongées et spermatozoïdes sont transcriptionnellement inactifs. Suite à la microinjection d'une spermatide ronde, l'ovocyte est donc confronté à une situation inhabituelle : l'apport massif d'ARNm en provenance du partenaire mâle. Il en découle que le profil d'expression des embryons ICSI ou ROSI doit être différent suivant la fécondation et au début du développement. L'apport massif d'ARNm étrangers dans le cytoplasme ovocytaire est la situation qui prévaut suivant le transfert d'un noyau somatique dans un ovocyte énucléé. Il a été effectivement observé dans ce cas, chez la souris, l'expression anormale d'un certain nombre de gènes dans l'embryon cloné [18].

Normalement, les génomes paternel et maternel sont silencieux lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre au moment de la fécondation. Les chromosomes paternels sont alors décondensés et remodelés, les histones maternelles prenant la place des protamines et l'ADN est activement et rapidement déméthylé [27, 33]. Le génome maternel est, quant à lui, déméthylé passivement au fil des divisions de l'embryon précoce. La reméthylation *de novo* du génome n'intervient qu'après l'implantation [32]. En fait, l'information contenue dans la séquence de l'ADN est complétée par des modifications épigénétiques; celles-ci comprennent notamment la méthylation de l'ADN, l'empreinte parentale, le remodelage de la chromatine par des protéines autres que les histones; toutes ces modifications sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Il y a deux périodes critiques au cours desquelles la reprogrammation épigénétique du génome intervient : l'une pendant la gamétogenèse, l'autre au cours du développement préimplantatoire [32].

Les vagues de déméthylation/reméthylation qui suivent la formation du zygote sont sensées effacer les profils de méthylation spécifiques des gamètes mâle et femelle, à l'exception des gènes soumis à empreinte parentale. Cette re-programmation épigénétique est essentielle pour permettre un développement normal, dans la mesure où elle contrôle l'expression des gènes précoces du zygote, la division cellulaire et le déterminisme cellulaire. Les différences observées entre spermatides rondes et spermatozoïdes au niveau de l'organisation de la chromatine et de l'expression des gènes ont leur projection au niveau épigénétique. Il est donc vraisemblable que l'ovocyte peine à reprogrammer le génome de la spermatide ronde, et que des perturbations d'ordre épigénétique soient à l'origine du faible taux de développement obtenu après la microinjec-

**Tableau 1 : Bilan des résultats obtenus chez l'homme suite à l'injection de spermatozoïdes ronds (ROSI).**

Auteurs	Cycles	MII injectés	embryons 2 PN	embryons divisés à partir de 2 PN	grossesses viables
Tesarik et al. [44, 45]	7	39	14	14	2
Amer et al. [2]	56	610	110	79	0
Antinori et al. [3]	21	150	82	62	3
Vanderzwalmen et al. [50]	32	260	57	49	1
Yamanaka et al. [53]	9	53	34	30	0
Barak et al. [5]	8	37	10	-	1
Bernabeu et al. [8]	8	69	7	7	0
Kahraman et al. [19]	20	199	51	31	0
Al Hasani et al. [1]	4	49	9	-	0
Sousa et al. [41]	50	394	43	43	0
Tesarik et al. [46]	1	6	2	2	0
Choavaratana et al. [9]	1	-	-	-	1
Gianaroli et al. [14]	1	5	2	2	1
Sousa et al. [42]	33	200	31	24	0
Saremi et al. [34]	1	-	-	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>252</b>	<b>2071</b>	<b>452/2071</b>	<b>343/452</b>	<b>10/252</b>
<b>%</b>			<b>21,8</b>	<b>75,8</b>	<b>3,9</b>

MII : ovocytes en métaphase II ; 2 PN : embryons au stade deux pronoyaux.

**Tableau 2 : Qualité des embryons issus d'ICSI et de ROSI.**

	ICSI	ROSI	Auteurs
Taux de fécondation	73,9 %	50 %	Balaban et al. [4]
	69 %	44,9 %	Levrant et al. [25]
		28,7 %	Vicdan et al. [51]
Taux d'embryons classe 1 ou 2	96 %	64,2 %	Levrant et al. [25]
	92,9 %	82,3 %	Vicdan et al. [51]
	ND	20,8 %	Urman et al. [48]
Taux d'arrêt du clivage	8,2 %	40,8 %	Levrant et al. [25]
	28,9 %	64,2 %	Vicdan et al. [51]
Taux de formation de blastocystes	100 %	25 %	Balaban et al. [4]
	ND	7,6 %	Urman et al. [48]
Taux de blastocystes classe 1 ou 2	75,3 %	0 %	Balaban et al. [4]
	45,7 %	14,2 %	Vicdan et al. [51]
	ND	36,3 %	Urman et al. [48]
Taux de grossesse	50 %	0 %	Levrant et al. [25]
	44,8 %	0 %	Vicdan et al. [51]
	ND	0 %	Urman et al. [48]

ND : non défini

tion de spermatides rondes chez l'homme. Cette hypothèse est soutenue par un certain nombre de résultats récents.

Des études chez la souris ont par exemple montré qu'un traitement hormonal des femelles en vue d'obtenir une superovulation ou bien la culture *in vitro* des embryons dans certains milieux induisaient une augmentation du nombre d'embryons 2 cellules présentant un profil de méthylation aberrant, corrélée à une diminution de la capacité à évoluer jusqu'au stade blastocystes [35]. De même, le très faible taux de réussite (0,1 à 3%) des expériences de transfert nucléaire [52, 40] observé dans différentes espèces animales (mouton, vache, cochon, lapin, souris) a été, pour une part, attribué à une re-programmation aberrante du profil de méthylation du génome donneur dans les embryons clonés. En particulier, chez le bovin, le profil de méthylation des blastocystes clonés est comparable à celui des noyaux des cellules de fibroblastes donneuses, et donc très différent de celui des blastocystes normaux [11, 20]. Le parallèle entre ROSI et transfert nucléaire ouvre donc quelques champs expérimentaux pour analyser les mécanismes qui gouvernent la re-programmation du génome de la spermatide ronde pour permettre le développement d'un embryon normal. Par ailleurs, l'importance des risques potentiels liés à une re-programmation épigénétique aberrante du génome mâle justifie pleinement que l'on entreprenne des études approfondies chez l'animal.

## II. MATERIELS ET METHODES

Les souris utilisées sont des souris F1 C57BlxCBA. Des souris femelles sont induites à superovuler par une injection de PMSG (10U) suivie 48 heures après par une injection d'hCG (10U) ; les ovocytes sont recueillis environ 15h après l'injection d'hCG, et libérés des cellules du cumulus par traitement à la hyaluronidase 0,1% puis incubés en milieu M16 sous CO<sub>2</sub> de 1 à 2h. Les spermatozoïdes sont extraits du canal déférent et capacités pendant

1h30, alors que les spermatides rondes sont obtenues par cytométrie en flux couplée à un tri cellulaire [23]. Les ovocytes sont activés par 8% d'alcool et microinjectés par les spermatozoïdes ou les spermatides comme décrit [54]. Les ovocytes microinjectés sont recueillis juste après l'injection (temps 0h) ainsi qu'à différents stades de leur développement embryonnaire : 2 pronoyaux, 2 et 4 cellules. L'analyse de l'expression de Hprt, Ube1y, Ube1x, Smcy, Prm2 et Hsp70.1 a été réalisée par PCR inverse, directement à partir des embryons comme décrit [54].

## III. RESULTATS ET DISCUSSION

Peu d'expériences ont été réalisées chez l'animal depuis les premiers résultats obtenus chez la souris par Ogura et col. [31] et Kimura et col. [22]. La capacité des spermatides rondes à féconder et à supporter le développement embryonnaire varie selon les espèces (Tableau 3). Nous avons montré que chez la souris, qu'ils aient été injectés par une spermatide ou par un spermatozoïde, la survie des ovocytes est comparable (94 et 90% respectivement) de même que le taux de fécondation (44,6 et 46,5% respectivement). Ce taux de fécondation est voisin de celui obtenu après la microinjection de spermatides rondes testiculaires provenant d'hommes atteints d'azoospermie non obstructive [4]. La plupart des embryons issus d'une spermatide (SR) ou d'un spermatozoïde (Spz) se divisent pour donner des embryons au stade 2 (92,5 et 94% respectivement) et 4 cellules (82,5 et 83,3% respectivement). L'évolution jusqu'au stade 4 cellules semble se faire au même rythme dans les deux types d'embryons.

Dans un premier temps, afin d'apprécier quelle incidence la présence des ARNm transcrits dans la spermatide ronde pouvait avoir sur le déroulement du développement embryonnaire post-implantatoire, nous avons analysé dans les deux types d'embryons, Spz ou SR, l'expression de 6 gènes: Hprt, Ube1y, Ube1x, Smcy, Prm2 et Hsp70.1, de la microinjection jusqu'au stade 4 cellules. Hprt (qui code

**Tableau 3 : Bilan de ROSI dans les différentes espèces animales.**

Espèce	taux de fécondation	taux de division	taux de naissance/embryon transféré
Souris [22]	36-37%	-	28%
Rat [17]	-	40%	0,5%
Lapin [37]	85%	-	14%
Bovin [15]	-	35%	-
Porc [21]	-	25%	-
Cynomolgus monkey [30]	48%	21%	1/9 (avorté à J 103)
Rhesus monkey [16]	0%	-	-

l'hypoxanthine ribosyl transférase) est exprimé tout au long du développement, et sert de témoin positif ; Ube1y (qui code l'ubiquitine y) est exprimé par les spermatides rondes puis tardivement après l'implantation de l'embryon ; son homologue Ube1x est exprimé par les spermatides et par les ovocytes. Hsp70.1 (qui code une protéine de choc thermique) et Smcy (qui code un épitope de l'anticorps HY) sont des marqueurs précoces (stade 2 cellules) de l'activation du génome zygotique. L'expression de Prm2 (qui code la protamine 2) est spécifique de la spermatide.

La structure de la chromatine est très différente de la spermatide ronde, qui contient encore des histones, au spermatozoïde dont l'ADN est compacté par les protamines 1 et 2. Les spermatides rondes injectées transcrivent activement ces deux protamines. Normalement, dans les 8 heures suivant la fécondation, les histones remplacent les protamines lors de la formation du pronoyau male [26]. Il apparaît alors essentiel que l'expression des protamines soit réprimée pour que le zygote puisse se développer normalement.

Nous avons effectivement montré (Figure 1) que les transcrits de la protamine 2 sont très abondants au temps 0 et qu'ils ne sont plus détectables dès le stade 2 pronoyaux. Ils ne sont à aucun stade présents dans les embryons Spz. Au contraire, le gène Ube1y qui n'est normalement pas transcrit au cours du développement pré-implantatoire [29], est exprimé dans les embryons SR du temps 0 au stade 2 cellules (Figure 1). Il suit en cela le profil d'expression de son homologue sur le chromosome X, Ube1x, dont les transcrits sont abondamment représentés dans le cytoplasme ovocytaire, avant qu'ils ne disparaissent entre les stades 2 et 4 cellules.

Les gènes Hsp70.1 et Smcy sont exprimés spécifiquement par le zygote Spz au stade 2 cellules, puis l'expression décroît rapidement au stade 4 cellules (Figure 2). Ces résultats concordent avec ceux de Christians et col. [10] et Mitchell et col. [28] respectivement. Par contre, dans les embryons SR, le signal correspondant à Hsp70.1 est beaucoup plus faible au stade 2 cellules, alors que l'expression de Smcy est non seulement plus faible au stade 2 cellules,

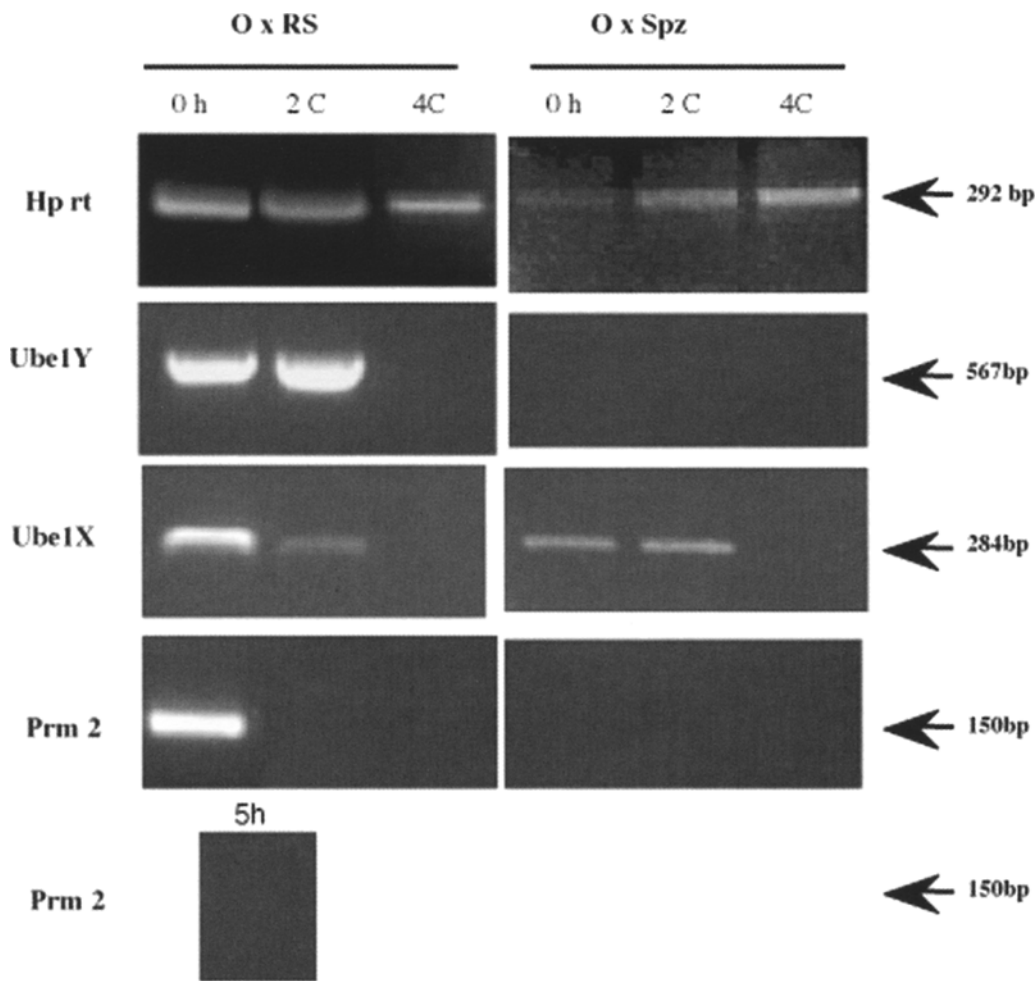
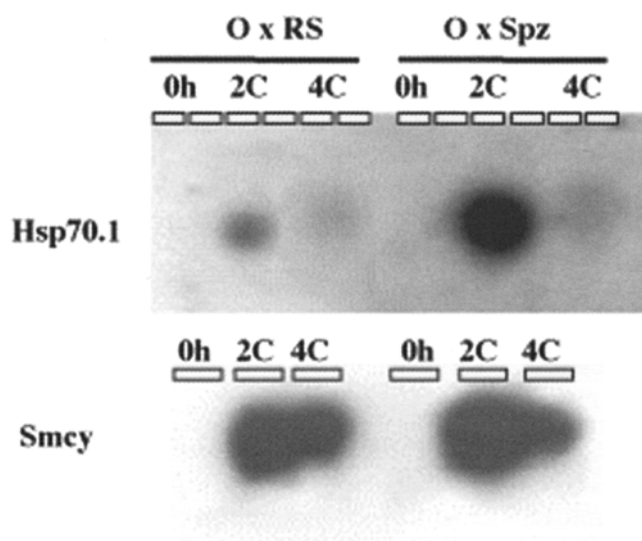


Figure 1 : Profil d'expression des ARNm de Hprt, Ube1y, Ube1x et Prm2 dans des ovocytes à différents temps après injection d'une spermatide ronde (RS) ou d'un spermatozoïde (Spz). Les résultats présentés correspondent à l'ARNm transcrit et amplifié de 10 ovocytes au temps 0, de 5 embryons au stade 2 cellules et de 2,5 embryons au stade 4 cellules [54].



**Figure 2 :** Profil d'expression des ARNm de *Hsp70.1* et *Smcy* dans des ovocytes à différents temps après la microinjection d'une spermatozoïde ou d'un spermatozoïde. Le signal obtenu après hybridation du produit de PCR inverse correspond à 10 ovocytes au temps 0, à 5 embryons au stade 2 cellules, et à 2,5 embryons au stade 4 cellules [54].

mais elle semble se prolonger au stade 4 cellules. Or, on sait que la régulation de *Hsp70.1* au cours du développement pré-implantatoire dépend du degré de maturation de la chromatine [47].

Chez la souris, l'activation du génome zygotique intervient massivement au stade 2 cellules [24]. Ce remodelage de l'expression génique est critique pour le devenir de l'embryon. Or, si l'activation du génome du zygote semble bien prendre place au stade 2 cellules dans les embryons SR, elle apparaît, tout au moins dans le cas des gènes *Smcy* et *Hsp70.1*, beaucoup moins efficace. On voit d'autre part que le profil d'expression génique des embryons SR et Spz est différent, et que l'expression inappropriée des gènes spécifiques de la spermatozoïde est réprimée avec une cinétique dépendant du gène considéré. On peut donc parler de re-programmation du génome de la spermatozoïde. Concernant l'expression de la protamine 2, nous avons observé le même profil d'extinction lorsque les spermatozoïdes étaient injectés dans des ovocytes non activés, ou en cas d'échec de la fécondation après injection de spermatozoïdes. Dans le premier cas, il n'y a pas formation de pronoyaux ; dans le deuxième cas, seul le pronoyau femelle est formé. La capacité à reprogrammer le génome mâle semble donc être une qualité propre du cytoplasme ovocytaire, indépendamment de l'activation de l'ovocyte et de la formation des 2 pronoyaux. Des résultats analogues ont été obtenus chez le bovin montrant que le cytoplasme d'un ovocyte non activé peut reprogrammer le noyau d'une cellule somatique [43].

L'ensemble de ces résultats met en évidence qu'embryons SR et Spz ne sont pas équivalents si l'on s'adresse à leurs transcriptomes, et qu'il n'est donc pas anodin d'utiliser des gamètes immatures pour féconder. Tant les études menées mettant en évidence le lien entre processus néoplasique et dérégulation de la méthylation que les analyses du profil de méthylation des embryons clonés ont souligné l'importance du phénomène épigénétique dans le déroulement normal de la vie. L'analyse approfondie de la re-programmation épigénétique du noyau mâle après injection d'une spermatozoïde est donc une voie importante à explorer pour comprendre les causes d'échec de ce mode de reproduction chez l'homme. En l'absence de résultats chez les primates non humains, le modèle souris, bien qu'imparfait, reste le plus approprié.

## REFERENCES

1. AL-HASANI S., LUDWIG M., PALERMO I. et al. : Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatids from azoospermic patients : results and review. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 97-107.
2. AMER M., SOLIMAN E., EL-SADEK M., MENDOZA C., TESARIK J. : Is complete spermiogenesis failure a good indication for spermatid conception ? *Lancet*, 1997, 350 : 116.
3. ANTINORI S., VERSACI C., DANI G., ANTINORI M., SELMAN H.A. : Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatids into human oocytes. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 554-556.
4. BALABAN B., URMAN B., ISIKLAR A. et al. : Progression to the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermatids. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1377-1382.
5. BARAK Y., KOGOSOWSKI, A., GLDMAN S., SOFFER Y., GONEN Y., TESARIK J. : Pregnancy and birth after transfer of embryos that developed from single-nucleated zygotes obtained by injection of round spermatids into oocytes. *Fertil. Steril.*, 1998, 70 : 67-70.
6. BARROS A., BERNABEU R., TAKAHASHI K. et al. : Intracytoplasmic injection of ejaculate and testicle spermatids. Report on 35 cycles. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 (Abstract Book 1) : 154-155.
7. BARROS A., TAKAHASHI K., BERNABEU R. et al. : Spermatid intracytoplasmic injection : report on 56 cycles. *Fertil. Steril.*, 1998, (Abstract Suppl.) : S441.
8. BERNABEU R., CREMADES N., TAKAHASHI K., SOUSA M. : Successful pregnancy after spermatid injection. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 1898-1900.
9. CHOVARATANA R., SUPPINYOPONG S. CHAIMAHA-PHRUKSA P. : ROSI from TESE the first case in Thailand : a case report. *J. Med. Assoc. Thai.*, 1999, 82 : 938-941.
10. CHRISTIANS E., CAMPION E., THOMPSON E.M., RENARD J.P. : Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development*, 1995, 121 : 113-122.

11. DEAN W., SANTOS F., STOJKOVIC M. et al. : Conservation of methylation reprogramming in mammalian development : aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98 : 13734-13738.
12. EDWARDS R.G., TARIN J.J., DEAN N., HIRSCH A., TAN S.L. : Are spermatid injections into human oocytes now mandatory ? *Hum. Reprod.*, 1994, 9 : 2217-2219.
13. FISHEL S., GREEN S., BICHOP M. : Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 1995, 345 : 641-642.
14. GIANAROLI L., SELMAN H.A., MAGLI M.C., COLPI G., FORTINI D. FERRARETTI A.P. : Birth of a healthy infant after conception with round spermatids isolated from cryopreserved testicular tissue. *Fertil. Steril.*, 1999, 72 : 539-541.
15. GOTO K., KINOSHITA A., NAKANISHI Y., OGAWA K. : Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of *in vitro* derived spermatids into bovine oocytes. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 824-829.
16. HEWITSON L., MARTINOVICH C., SIMERLY C., DOMINKO T., SCHATTE G. : Is round spermatid injection (ROSI) a therapy for male infertility ? ROSI in the Rhesus Monkey is unsuccessful. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : S68.
17. HIRABAYASHI M., KATO M., AOTO T., UEDA M., HOCHI S. : Rescue of infertile transgenic rat lines by intracytoplasmic injection of cryopreserved round spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 62 : 295-299.
18. HUMPHERYS D., EGGAN K., AKUTSU H. et al. : Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99:12889-12894.
19. KAHRAMAN S., POLAT G., SAMLI M. et al. : Multiple pregnancies obtained by testicular spermatid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 104-110.
20. KANG Y.K., KOO D.B., PARK J.S. : Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.*, 2001, 28: 173-177.
21. KIM N.H., SHIN J.S., KIM C., JUN S.H., LEE H.T. CHUNG K.S. : Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei. *Theriogenology*, 1999, 51 : 1441-1449.
22. KIMURA Y., YANAGIMACHI R. : Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 1995, 121 : 2397-2405.
23. LASSALLE B., ZIYYAT A., TESTART J., FINAZ C., LEFEVRE A. : Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 388-394.
24. LATHAM K., GARRELS J., CHANG C. : Quantative analysis of protein synthesis in mouse embryos. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development*, 1991, 112 : 921-932.
25. LEVRAN D., NAHUM H., FARHI J., WEISSMAN A. : Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 443-449.
26. MC CLAY D., CLARK H. : The ability to organize sperm DNA into functional chromatin is acquired during meiotic maturation in murine oocytes. *Dev. Biol.*, 1997, 186 : 73-84.
27. MAYER W., NIVELEAU A., WALTER J., FUNDELE R., HAAF T. : Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403 : 501-502.
28. MITCHELL M.J., WOODS D.R., TUCKER P.K., OPP J.S., BISHOP C.E. : Homology of a candidate spermatogenic gene from the mouse Y chromosome to the ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, 1991, 354 : 483-486.
29. ODORISIO T., MAHADEVAIAH S., MC CARREY J. : Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene *Ube1y* and of the closely related *Ube1x* shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but repressed in pachytene spermatocytes. *Dev. Biol.*, 1996, 180 : 336-343.
30. Ogonuki N., TSUCHIYA H., HIROSE Y., OKADA H., OGURA A., SHANKAI T. : Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.*, 2003, 18 :1273-1280.
31. OGURA A., MATSUDA J., YANAGIMACHI R. : Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91 : 7460-7462.
32. REIK W., DEAN W., WALTER J. : Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293 : 1089-1093.
33. SANTOS F., HENDRICH B., REIK W., DEAN W. : Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.*, 2002, 241 : 172-182.
34. SAREMI A., ESFANDIARI N., SALEHI N., SAREMI M.R. : The first successful pregnancy following injection of testicular round spermatid in Iran. *Arch. Androl.*, 2002, 48 : 315-319.
35. SHI W., HAAF T. : Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 63 : 329-334.
36. SOFIKITIS N.V., MIYAGAWA I., AGAPITOS E. et al. : Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1994, 11 : 335-341.
37. SOFIKITIS N.V., TODA T., MIYAGAWA I., ZAYOS P.M., PASYIANOS P., MASTELOU E. : Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil. Steril.*, 1996, 65 : 176-185.
38. SOFIKITIS N.V., YAMAMOTO Y., ISOYAMA T., MIYAGAWA I. : The early haploid male gamete develops a capacity for fertilization after the coalescence of the proacrosomal granules. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 2713-2719.
39. SOFIKITIS N.V., YAMAMOTO Y., MIYAGAWA I. et al. : Ooplasmic injection of elongated spermatids for the treatment of non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 709-714.
40. SOLTER D. : Mammalian cloning : advances and limitations. *Nat. Rev. Genet.*, 2000, 1 : 199-207.
41. SOUSA M., BARROS A., TAKAHASHI K., OLIVEIRA C., SILVA J., TESARIK J. : Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme.

42. SOUSA M., CREMADES N., SILVA J. et al. : Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 17 : 1800-1810.
43. TANI T., KATO Y., TSUNODA Y. : Direct exposure of chromosomes to non activated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. Biol. Reprod., 2001, 64 : 324-330.
44. TESARIK J., MENDOZA C., TESTART J. : Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes [letter]. N. Engl. J. Med., 1995, 333 : 525-525.
45. TESARIK J., ROLET F., BRAMI C. et al. : Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. Hum. Reprod., 1996, 11 : 780-783.
46. TESARIK J., BAHCEKI M., OZCAN C., GRECO E., MENDOZA C. : Restoration of fertility by in vitro spermatogenesis. Lancet, 1999, 353 : 555-556.
47. THOMPSON E., LEGOUY E., CHRISTIANS E. : Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP70.1 gene expression in the pre-implantation mouse embryo. Development, 1995, 121 : 3425-3437.
48. URMAN B., ALATAS C., AKSOY S. et al. : Transfer at the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermatid injection. Hum. Reprod., 2002, 17 : 741-743.
49. VANDERZWALMEN P., LEJEUNE B., NIJIS M. : Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an *in vitro* fertilization programme. Hum. Reprod., 1995, 10 : 502-503.
50. VANDERZWALMEN P., ZECH H., BIRKENFELD A. et al. : Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue : influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. Hum. Reprod., 1997, 12 : 1203-1213.
51. VICDAN K., ISIK A.Z., DELILBASI L. : Development of blastocyst-stage embryos after round spermatid injection in patients with complete spermiogenesis failure. J. Assist. Reprod. Genet., 2001, 18 : 78-86.
52. WILMUT I., SCHNIEKE A.E., MCWHIR J., KIND A.J., CAMPBELL K.H. : Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385 : 810-813.
53. YAMANAKA K., SOFIKITIS N.V., MIYAGAWA I. et al. : Ooplasmic round spermatid nuclear injection procedures as a experimental treatment for non-obstructive azoospermia. J. Ass. Reprod. Genet., 1997, 14 : 55-62.
54. ZIYYAT A., LEFEVRE A. : Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. Hum. Reprod., 2001, 16 : 1449-1456.

**Round spermatid as a partner for the oocyte: autopsy of a failure**

Nada BORGHOL, Ahmed ZIYYAT, Thierry BLACHERE, Annick LEFEVRE

**Although the round spermatid is haploid like spermatozoa, it remains an unlikely partner for the human oocyte. Only 10 children have been born since introduction of the ROSI (ROund Spermatid Injection) technique into human clinical practice in 1995, despite the large number of attempts. Analysis, in an animal model, of gene expression in the early embryo following microinjection of either spermatozoa or round spermatids provides a better understanding of the reasons for this failure. We have shown, in mice, that embryos from spermatozoa and round spermatids do not exhibit the same gene expression profile up to the 4-cell stage. Male post-meiotically expressed genes were also repressed at various times following fertilization with a round spermatid, demonstrating reprogramming of the male nucleus. This suggests the hypothesis that aberrant epigenetic reprogramming of the male nucleus may contribute to the high incidence of developmental failure when round spermatids from infertile patients are used.**

**Key words:** round spermatid, ICSI, nuclear reprogramming, epigenetic modifications