

# **REVUE DE LA LITTERATURE INTERNATIONALE**

*avec la collaboration de :*

J. BELAISCH

J.C. CZYBA

J.F. GUERIN

S. PILIKIAN

S. ROUSSEAUX

B. SALLE

B. SELE

# Revue de la littérature internationale

---

## SPERMATOGENESE

- 263 **Différenciation méiotique des cellules germinales en culture.** M. RASSOULZADEGAN, BERTINO, J. SAGE, M. JASIN, M. MIYAGAWA, V. VAN HEINIGEN, P. BESMER, F. CUZIN  
*Cell. Vol. 75 : 997-1006, 1993.*
- 265 **Méiose dans les cellules germinales XXY : étude de 543 caryotypes de spermatozoïdes chez un patient porteur d'une mosaïque XY/XXY.** J. COZZI, E. CHEVRET, S. ROUSSEAU, R. PELLETIER, V. BENITZ, H. JALBERT, B. SELE  
*Human Genetics, 93 : 32-34, 1994.*
- 266 **Expression anormale de la protéine 4.1 dans les spermatozoïdes des hommes infertiles atteints de tératospermie.** R. ROUSSEAU-PREVOT, P. LESUR, F. COLLIER, J.M. RIGOT, N. DALLA VENEZIA, P. SAINT POL, J. DELAUNAY, A. GAUTHIER, J. ROUSSEAU  
*Lancet, 343 : 764-765, 1994.*

## SPERMIOLOGIE

- 267 **Induction artificielle de la réaction acrosomique dans les spermatozoïdes humains.** C.M. GEARON, D. MORTIMER, M.G. CHAPMAN, R.G. FORMAN  
*Human Repr. 9, 77-82, 1994.*
- 268 **Sélection et micro-injection de spermatozoïdes humains "acrosome-réagis".** J. PARINAUD, G. VIETTEZ, B. LABAL, G. RICHOLLEY  
*Human Repr. 9, 110-112, 1994.*
- 269 **Relation entre le pouvoir fécondant du sperme et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité.** P.J. CHAN, BC. SU, H. KALUGDAN, D.R. TREDWAY  
*Human Repr. 9 : 279-283, 1994.*

## THERAPEUTIQUE

- 270 **Inadéquation de l'association FSH-testostérone à initier et/ou maintenir la spermatogenèse chez les hommes atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope.** G. SCHAISON, J. YOUNG, M. PHOLSENA, K. NAHOUL, B. COUZINET  
*J.Clin.Endocr.Metab.77, 1545-1549, 1993.*
- 271 **Inefficacité de la kallikréine dans le traitement de la stérilité masculine idiopathique : un essai en double-aveugle, randomisé et avec placebo.** C. KECK, H.M. BEHRE, J. JOCKENHOVEL, E. NIESCHLAG  
*Human Repr. 9 : 325-329, 1994.*
- 272 **La bromocriptine neutralise l'effet inhibiteur des macrophages sur la motilité des spermatozoïdes humains.** A. SCOMMEGNA, S.H.YE, G.S. PRINS  
*Fertil. Steril., Vol.61 : 331-335, 1994.*

# SPERMATOGENESE

## Différenciation méiotique des cellules germinales males en culture

M. RASSOULZADEGAN\*, BERTINO\*, J. SAGE\*, M. JASIN\*\*, K. MIYAGAWA\*\*, V. VAN HEINIGEN\*\*\*, P. BESMER\*\*, F. CUZIN\*.

\*Unité INSERM 273 - Université de Nice.

\*\*Sloan-Kettering Institute - New York. U.S.A.

\*\*\*Medical Research Council, Human Genetics Unit, Western General Hospital - Edinburgh-Ecosse.

Cell. V. 75, 997-1006, 1993.

---

Les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial au cours de la différenciation germinale chez l'homme. Les échanges complexes de signaux entre celles-ci et les cellules germinales sont encore peu connus. Un système de culture permettant la différenciation germinale faciliterait la compréhension des interactions entre cellules germinales et cellules de Sertoli, et, au-delà, des mécanismes moléculaires de la différenciation germinale. Plusieurs lignées cellulaires d'origine testiculaire ont été décrites mais aucune d'entre elles ne permettait l'accomplissement *in vitro* des étapes essentielles de la différenciation germinale : méiose et recombinaisons génétiques, condensation nucléaire et spermiogénèse.

Les auteurs ont établi des lignées cellulaires permanentes à partir du tissu testiculaire de souris transgéniques, exprimant l'antigène T du polyomavirus dans leurs cellules de Sertoli et dans leurs cellules germinales. La lignée 15P-1 a été établie après ensemencement d'une suspension de cellules testiculaires d'un mâle âgé de 6 mois, âge où la fonction testiculaire est encore normale. Les lignées 45T-1 et 68T-1 ont été établies à partir de tumeurs testiculaires se développant chez les mâles âgés de 15 à 20 mois.

Toutes les lignées exprimaient la protéine T du polyomavirus. Elles ont été cultivées dans certains cas pendant plus d'un an sans modification apparente de leurs propriétés.

Une partie des cellules de ces cultures présentaient les caractéristiques cytologiques et ultrastructurales des cellules de Sertoli.

L'étude des transcrits (par Northern blot et RT-PCR<sup>(1)</sup>) de deux gènes normalement exprimés par les cellules de Sertoli des souris adultes, WT1 et Steel<sup>(2)</sup>, a montré qu'ils étaient exprimés dans les trois lignées.

Les lignées cellulaires avaient une capacité de phagocytose *in vitro* (test aux billes de latex) comparable à celle de macrophages en culture primaire (la phagocytose est aussi une propriété des cellules de Sertoli).

Enfin et surtout, les lignées cellulaires ont été testées pour leur capacité à supporter la différenciation de cellules germinales en co-culture.

Les cellules germinales co-cultivées provenaient de souris transgéniques chez lesquelles la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia Coli*, synthétisée sous le contrôle du promoteur Prm-1, s'accumulait dans les spermatides et les spermatozoïdes. Ces cellules germinales à différents stades de différenciation, ont été co-cultivées avec les cellules 15P-1.

La détection histochimique de la  $\beta$ -Galactosidase après un et cinq jours de coculture (J1 et J5) a mis en évidence une augmentation importante des cellules positives (bleues). Les cellules bleues, en agrégats autour des cellules 15P-1, avaient les caractéristiques morphologiques des spermatides et des spermatozoïdes flagellés.

La mesure de la quantité d'ADN/cellule en cytométrie de flux après incorporation d'iodure de propidium, montrait une augmentation de la population cellulaire haploïde entre J1 et J5.

Il s'agissait ensuite de vérifier si l'augmentation des cellules haploïdes entre J1 et J5 provenait uniquement de la maturation de cellules déjà engagées dans la méiose, ou si elle provenait aussi de cellules en divisions préméiotiques. De la thymidine tritiée a été ajoutée pendant les 48 premières heures de coculture. Les cultures étaient fixées 5 jours plus tard et autoradiographiées. Il a été observé une accumulation de grains, non seulement au dessus des noyaux des cellules 15P-1 mais aussi sur un certain nombre de noyaux de cellules germinales, dont quelques uns étaient déjà en cours de compaction nucléaire. Il s'agissait de cellules non encore engagées dans la méiose en début de coculture, ayant incorporé la thymidine tritiée pendant leur synthèse d'ADN (48 première heures de culture), qui étaient ensuite

entrées en méiose et dont certains s'étaient différenciées jusqu'au stade de spermatide.

En co-cultivant les cellules 15P-1 avec des cellules germinales de souris transgéniques mâles Prm-LacZ, soit agés de 7-10 jours (stades préméiotiques seulement), soit agés de 10-12 jours (stades méiotiques tardifs), les auteurs ont montré que les précurseurs immatures ne se différenciaient pas en spermatides allongées ni en spermatozoïdes flagellés pendant les 10 à 12 jours de culture (délai maximum autorisé par les conditions de culture).

L'expression de Prm-1, mesurée soit par l'activité  $\beta$ -galactosidase du transgène Prm-1-LacZ, soit par le dosage en PCR compétitive des transcrits Prm-1, a permis l'identification de la fin de la méiose lors de l'initiation de l'expression de Prm-1. Ce stade est atteint après un temps identique de coculture (environ J4), que les cellules germinales soient prélevées chez des souris de 10 ou de 18 jours. Ceci suggère que dans les testicules de 18 jours, où certaines cellules ont presque achevé leur méiose, seulement les cellules germinales à un stade prémitotique défini établissent une association avec les cellules 15P-1, permettant leur différenciation ultérieure en culture. De plus, d'après la cinétique de l'activation de Prm-1 dans les cocultures avec les cellules germinales préméiotiques (provenant des testicules de souris de 10 jours), la durée de la méiose *in vitro* apparaît comparable à celle *in vivo*.

D'autre part, le franchissement de la méiose a été mis en évidence par la détection des cellules haploïdes par cytométrie en flux (cellules des testicules de 18 jours) ou par cytométrie en image (cellules des testicules jeunes de 9-10 jours).

#### **Commentaires** (S. ROUSSEAU ET B. SELE)

*Il s'agit de la mise au point d'un système de coculture chez la souris permettant la différenciation germinale in vitro.*

*Ce travail est remarquable tant par sa rigueur que par les perspectives nouvelles qu'il ouvre pour l'étude de la gamétogenèse.*

*Jusqu'à présent, aucune lignée cellulaire n'avait été décrite, qui permettait la gamétogenèse in vitro. Les auteurs ont établi une lignée cellulaire, 15P-1, à partir de testicules de souris transgéniques exprimant la protéine du polyomavirus dans l'épithélium séminal. En co-*

*culture, ces cellules s'associent à une fraction des cellules germinales, dont des précurseurs préméiotiques, et autorisent leur maturation en cellules haploïdes différenciées.*

*Les études moléculaires de la lignée apparaissent rigoureusement choisies et menées. La lignée 15P-1 exprime deux gènes, WT1 et Steel, dont l'association est caractéristique des cellules de Sertoli. Afin de mieux cerner leur rôle dans la gamétogenèse, les auteurs ont le projet d'étudier les variations quantitatives de l'expression de ces deux gènes ainsi que l'expression d'autres gènes des cellules de Sertoli différenciées.*

*Comme le font remarquer les auteurs, les conditions de culture pour une différenciation complète des spermatozoïdes sont à optimiser. Il semble paradoxal d'observer qu'en coculture avec 15P-1, les précurseurs diploïdes de testicules immatures peuvent franchir la méiose mais ne peuvent pas progresser plus loin vers la spermiogenèse, comme le font les cellules germinales provenant de testicules matures.*

*Néanmoins, ce système de différenciation est un modèle expérimental qui pourra servir de base à l'analyse des mécanismes moléculaires qui contrôlent la différenciation germinale : régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles, interactions entre cellules germinales et cellules de Sertoli.*

*Des expériences préliminaires mentionnées par les auteurs ont montré que des gènes rapporteurs pouvaient être transfectés par électroporation dans des cellules testiculaires et qu'ils étaient ensuite exprimés en culture. La mesure de l'expression de ces gènes rapporteurs induite par des promoteurs mutés pourrait permettre l'analyse des séquences contrôlant les étapes transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. La transfection de ces cellules avec un ARN antisens permettrait d'analyser la fonction du produit d'un gène donné. De plus, dans ce système de culture in vitro, il semble possible d'identifier les signaux spécifiques impliqués dans la reconnaissance des cellules germinales par les cellules de Sertoli. Par exemple, d'autres résultats préliminaires ont montré que la préincubation des cellules germinales d'un testicule adulte avec un anticorps monoclonal qui bloque le récepteur c-Kit empêchait complètement leur attachement aux cellules 15P-1 dans les cocultures.*

*Ce système de différenciation gamétique in vitro offre la possibilité d'étudier les mécanismes qui sont à l'origine de la diversité génétique, comme par exemple ceux de la recombinaison homologue.*

*Enfin, les auteurs évoquent, dans un avenir lointain, la possibilité d'utiliser ce système de culture cellulaire à des fins de transgénèse. Cette éventualité suppose que les noyaux spermatiques différenciés dans ce système puissent être utilisés pour la fécondation, ce qui n'a pas encore été mis en évidence.*

#### **Notes :**

(1) RT-PCR : Technique associant la transcription inverse des ARN messagers suivie de l'amplification de l'ADN complémentaire de l'un de ces messagers par réaction de polymérisation en chaîne.

(2) WT1, dont la mutation chez l'homme est responsable de la susceptibilité familiale aux tumeurs de Wilms, est transcrit dans le rein embryonnaire et, chez la souris, dans les cellules de Sertoli chez le mâle et les cellules de la granulosa chez la femelle. Steel code pour le ligand d'un récepteur présent dans les spermatogonies.

•••

### **Meiose dans les cellules germinales XXY : étude de 543 caryotypes de spermatozoïdes chez un patient porteur d'une mosaïque XY/XXY**

COZZI J., CHEVRET E., ROUSSEAU S., PELLETIER R., BENITZ V., JALBERT H., SELE B.

*Laboratoire de Biologie de la Reproduction et Cyto-génétique, Faculté de Médecine, 38000 Grenoble*

Human Genetics, 1994, 93: 32-34

---

## **INTRODUCTION**

Les quelques études de méiose concernant des patients Klinefelter montrent un arrêt de méiose dans les rares spermatozoïdes produits. Dans les constitutions mosaïques 46,XY/47,XXY, il est admis que seules les cellules germinales normales peuvent terminer la méiose. Cependant, en raison de l'oligozoospermie sévère généralement associée, le caryotype des spermatozoïdes n'a pu être étudié jusqu'à présent. C'est l'originalité de la présente étude, réalisée en utilisant la technique de pénétration in vitro d'ovocytes de hamster dépellucidés.

## **1. Matériel et Méthodes**

Il s'agit d'un patient de 39 ans, père de 2 enfants, qui s'est présenté comme donneur de sperme. Le caryotype somatique a révélé une mosaïque 46,XY/47,XXY dans la proportion 60/40. Le spermogramme était normal (100 millions de spermatozoïdes/ml, dont 60% mobiles). Le caryotype des spermatozoïdes a été effectué après fécondation hétéro spécifique d'ovocytes de hamster dépellucidés, permettant la décondensation de la chromatine spermatique dans le cytoplasme ovocytaire, rendant ainsi les 23 chromosomes accessibles à l'analyse.

## **2. Résultats**

Sur les 543 analyses chromosomiques effectuées, 53 (10%) étaient anormales, se répartissant en 32 hypo haploïdies (6%), 5 hyper haploïdies (1%) et 15 anomalies structurales (3%). Les 5 hyper haploïdies étaient de formule 24,XY. Le sex ratio n'était pas statistiquement différent de 0,5.

## **3. Discussion**

La fréquence des hyper haploïdies par non disjonction gonosomique est élevée (1%) par rapport à celle observée chez les sujets normaux estimée, en complétant les résultats de la littérature, à moins de 0,1%.

A partir d'arguments solides, les auteurs aboutissent à la conclusion que ces spermatozoïdes de formule 24,XY dérivent pour une grande part de la méiose de spermatozoïdes I de formule 47,XXY ; ce résultat s'opposerait à la théorie communément admise que dans une mosaïque de ce type, seules les cellules 46,XY peuvent achever la méiose.

### **Commentaires (J.F. GUERIN)**

*L'observation a été effectuée chez un homme présentant une mosaïque Klinefelter, mais dont les caractéristiques du sperme sont excellentes. Il serait intéressant d'effectuer le même type d'étude chez un homme également mosaïque, mais avec un % de cellules normales plus faible, et/ou qui présenterait une oligospermie (ce qui constitue une situation plus fréquente). D'autre part, cette observation originale soulève une question: si des spermatozoïdes peuvent dériver de spermatozoïdes 47,XXY, pourquoi l'azoospermie est-elle de règle dans le syndrome de Klinefelter ?*

•••

## **Expression anormale de la protéine 4.1 dans les spermatozoïdes des hommes infertiles atteints de tératospermie.**

R. ROUSSEAU-PREVOST, P. LESUR, F. COLLIER, J.M. RIGOT, N. DALLA VENEZIA, P. SAINT POL, J. DELAUNAY, A. GAUTHIER, J. ROUSSEAU

*Institut de recherches sur le Cancer, Laboratoire d'Analyses Médicales "Liberté" Lille, Service de Gynécologie sociale -CHRU- Lille, Service d'Urologie -CHRU- Lille, CNRS URA 1171-Lyon, CECOS Nord -CHRU- Lille.*

Lancet 343 : 764-765, 1994

---

Cette équipe a étudié la localisation et les isoformes de la protéine 4.1 dans le sperme de 20 patients atteints d'oligo-astheno-tératospermie sévère caractérisée par une proportion élevée (>70%) de spermatozoïdes anormaux. Une anomalie de la localisation de cette protéine, normalement située dans la tête (région acrosomique et sous acrosomique) et parfois dans la pièce intermédiaire, a été observée. Ainsi, dans le cas des spermatozoïdes à tête amorphe, la protéine 4.1 était détectée dans la queue. En outre, alors que dans le cas des spermatozoïdes d'hommes fertiles, le principal composant est d'un poids moléculaire de 82 KDa, il est de 135 KDa chez 4 des 9 hommes présentant un pourcentage élevé de têtes spermatisques amorphes. Fait essentiel, cette isoforme est celle que l'on a observée dans une préparation de cellules germinales contenant des spermatides rondes et des spermatoctes.

L'explication de cette différence entre cellules germinales et spermatozoïdes mûrs tient à ce que la protéine 4.1 reconnue initialement dans le squelette des globules rouges, possède différentes isoformes. Celles-ci sont engendrées par un épissage du transcrit d'un seul gène qui peut s'effectuer selon deux alternatives. Selon que le codon d'initiation (d'amont ou d'aval) est utilisé c'est l'isoforme 135 ou 82 qui est formée.

Au cours de la différenciation spermatique, il y a donc perte d'activité du codon d'initiation d'amont et passage à la forme 82 KDa. Il était connu qu'une telle évolution a lieu au cours de la maturation de la lignée rouge, et certaines anomalies de maturation de globules rouges sont désormais bien expliquées par des défauts d'évolution de la protéine 4.1.

L'évolution qui témoigne normalement de la maturation des cellules spermatisques n'a donc pas lieu dans les cas de sperme tératospermique et si l'on considère que l'isoforme 82 KDa contribue à la stabilisation des membranes spermatisques, son absence expliquerait la morphologie anormale des spermatozoïdes.

### **Commentaires (J.BELAISCH)**

*Un des intérêts de cette observation tient à ce que cette étude a été entreprise sur la constatation due au hasard d'une azoospermie (par arrêt au stade de spermatide) chez un sujet atteint d'elliptocytose, c'est à dire d'une altération de forme des globules rouges. On sait que l'isoforme 82 KDa de la protéine 4.1 interagit avec le complexe spectrine actine, aidant à ancrer le cytosquelette du globule rouge sur la membrane plasmique du globule rouge. Il y a donc maturation parallèle sous une même commande génique des globules rouges et des spermatozoïdes.*

*On entrevoit que l'utilisation par micro injection de spermatozoïdes atteints de cette anomalie puisse donner naissance à un enfant atteint à la fois d'une altération de sa fécondité, mais aussi de défauts somatiques plus ou moins sévères de la lignée rouge.*

*On entre ainsi, de plein pied dans cette forme d'études pré-manipulations spermatisques qui constitueront le futur des études génétiques dans les cas de stérilité masculine sévère autant que dans la spermatologie fondamentale.*

•••

# SPERMIOLOGIE

## Induction artificielle de la réaction acrosomique dans les spermatozoïdes humains

C.M. GEARON, D. MORTIMER, M.G. CHAPMAN,  
R.G. FORMAN

*Department of Obstetrics and Gynaecology,  
Guy's Hospital, Floor ; New Guy's House. London  
SE1 9RT, UK and ; Sydney I.V.F. Pty Ltd, 187  
Macquarie Street, Sydney 2000, Australia.*

Hum. Reprod. Vol. 9, n°1 : 77-82, 1994.

Le spermatozoïde humain doit accomplir la réaction acrosomique (RA) pour traverser la zone pellucide et fusionner avec l'oolemme. Cette réaction est régulée par un programme intrinsèque mais des facteurs externes (composition du milieu, temps de capacitation) peuvent moduler l'expression de ce programme.

*In vitro*, le pourcentage de gamètes mâles qui réagissent spontanément est faible. Néanmoins, en FIV classique, il n'est pas nécessaire d'induire cette réaction, puisque la zone pellucide remplit ce rôle. Toutefois une induction semble nécessaire avec les techniques de microfécondation, où les spermatozoïdes sont injectés au delà de cette barrière.

L'ionophore A23187 augmente significativement le taux de spermatozoïdes réagis, mais il n'est pas utilisé en clinique en raison de sa toxicité. D'autres agents comme le liquide folliculaire (LF) et la pentoxyfilline activent également la RA. Cependant les résultats obtenus rapportés dans la littérature sont très contradictoires à cause des différences dans les conditions expérimentales.

Les auteurs rapportent leurs résultats de l'effet du LF et de la pentoxyfilline sur la RA dans des conditions expérimentales bien définies.

### 1. Matériel et Méthodes

Les LF proviennent des ponctions de follicules pour la FIV. Seuls les liquides où un ovocyte mature, fécondable, a été isolé sont utilisés pour les essais.

Les spermatozoïdes sont ceux de donneurs féconds. Les spermatozoïdes mobiles sélectionnés après cen-

trifugation sur gradients discontinus de Percoll (fractions de 81 et 40.5%), sont capacitées dans un milieu synthétique additionné de sérum albumine humain (10mg/ml).

L'ionophore utilisé est le A23187 et la RA est mise en évidence par la lectine PNA (lectine provenant d'*Arachis hypogaea*) conjuguée à la fluoresceine. Le colorant vital Hoechst 33258 permet de différencier entre une RA physiologique et une dégénérescence post-mortem de l'acrosome. Deux cents cellules sont examinées pour déterminer le pourcentage de RA.

Deux séries d'expériences sont réalisées dans le but :

1°) de déterminer l'effet des différentes concentrations de PNA-FITC (25, 37.5, 45µg/ml) sur la fluorescence des spermatozoïdes réagis en l'absence ou en présence de 10µM A23187.

2°) d'étudier l'effet du LF (25,50,75%) de la pentoxyfilline (2mg/ml) et de l'ionophore (2.5µg/ml) sur la RA des spermatozoïdes capacitées.

### 2. Résultats

1°) Pour la 1ère série d'expériences, les auteurs n'ont pas trouvé de différence dans la fluorescence avec l'augmentation de la concentration du fluorochrome utilisé. Le contact des spermatozoïdes avec 10µM de A23187 pendant 1 heure augmente significativement le taux de réaction acrosomique par rapport aux témoins sans ionophore (61% contre 2%).

2°) Le LF entraîne une augmentation dose dépendante de la RA, le maximum correspondant à 50% de LF dans le milieu de culture. La pentoxyfilline stimule également la réaction cependant l'effet de 2.5µM de A23187 n'est pas significatif.

### 3. Discussion

L'effet du LF sur la RA rapporté dans la littérature est très variable selon les auteurs. Les différences dans les protocoles expérimentaux sont à l'origine de ces discordances. En effet certains chercheurs utilisent le LF tel quel, d'autres, après décomplémentation, processus qui peut inactiver le facteur responsable de la RA bien qu'une étude ait montré l'absence d'effet de la décomplémentation sur la réaction.

De même, il existe des différences dans la composition ionique et protéique des milieux, ainsi que dans les techniques de préparation des sper-

matozoïdes. De plus, l'effet du LF dépend du degré de capacitation des spermatozoïdes, du temps de contact et surtout de la concentration du LF dans le milieu.

Les auteurs pensent qu'une incubation d'une heure, des spermatozoïdes préalablement capacités, dans un milieu contenant 50% de LF ou 1µg/ml de pentoxyfilline, peut être bénéfique dans les cas d'infécondité masculine, en particulier quand une technique de microfécondation (SUZI ou ICSI) est envisagée.

### **Commentaires (S. PILIKIAN)**

*En faisant référence à d'autres études, les auteurs montrent la diversité dans les résultats de RA obtenus selon les conditions d'utilisation du liquide folliculaire.*

*Pour étudier l'influence d'un liquide biologique, sur un phénomène complexe, comme la réaction acrosomique, une sélection rigoureuse de liquide folliculaire de qualité bien déterminée est indispensable. En effet les propriétés du liquide folliculaire sont variables selon son origine : follicules matures ayant donné un ovocyte fécondable, follicule immature, follicule atrétique ou encore kystique. Nous avons nous même remarqué l'effet stimulateur de la réaction acrosomique de liquides issus de follicules matures, seuls valables pour une telle investigation et à l'inverse l'effet délétère sur la mobilité et la survie des spermatozoïdes de liquide folliculaires tout venant.*

*Pour reproduire les conditions physiologiques, il est important d'étudier l'induction de la réaction sur des spermatozoïdes capacités. Deux à 3 heures de capacitation suivie d'une période d'induction par le LF, l'ionophore, ou la pentoxyfilline beaucoup plus courte (environ 1 heure) semblent bien appropriées puisqu'elles n'entraînent pas une diminution significative de la mobilité et de la survie.*

*Pour l'induction de la réaction acrosomique des spermatozoïdes destinés à la microinjection dans l'ovocyte l'utilisation de liquides folliculaires bien sélectionnés serait préférable à celle de produits chimiques*

•••

## **Sélection et micro-injection de spermatozoïdes humains "acrosome-réagis"**

J. PARINAUD, G. VIEITEZ, B. LABAL ET G. RICHAILLEY

*Centre de Fécondation in vitro, CHU La Grave, Toulouse*

Human Reproduction, 1994; 9: 110-112

Les résultats de la micro-injection sous-zonale (SUZI) sont améliorés si on peut élever le taux de réaction acrosomique (RA) dans la population de spermatozoïdes. Or, la plupart des techniques utilisées (incubation dans le liquide folliculaire, électroporation, etc...) ne permettent pas de dépasser un taux de 30% de spermatozoïdes acrosome-réagis (AR+), ce qui justifie l'injection de 5 ou 6 spermatozoïdes dans l'espace vitellin, mais avec un risque élevé de polyspermie. Dans la mesure où la visualisation de la RA implique une fixation préalable, il est impossible d'injecter un spermatozoïde dont on ne connaît pas le statut acrosomique. Les auteurs décrivent une méthode originale de sélection de spermatozoïdes AR+, la technique étant testée dans un système utilisant des ovocytes de hamster.

### **1. Matériel et Méthodes**

Fixation de l'anticorps GB24 à une boîte de culture: du PBS contenant des immuno-globulines anti-souris a été incubé une nuit dans une boîte de culture Falcon, qui a ensuite été lavée plusieurs fois avec du PBS pur, puis incubée 1 heure avec l'anticorps GB24, qui reconnaît des structures de la membrane acrosomique interne (il se fixe donc sélectivement sur les spermatozoïdes AR+).

Sélection des spermatozoïdes AR+: après séparation sur gradient de Percoll, les spermatozoïdes ont été incubés 4 heures dans du BWW contenant 20% de liquide folliculaire, puis 30 minutes dans une boîte Falcon ayant fixé l'anticorps GB24. A la fin de l'incubation, la boîte a été lavée délicatement avec du Tyrode pour éliminer les spermatozoïdes non fixés. Les spermatozoïdes fixés ont été aspirés avec une micropipette, à l'aide d'un micro-manipulateur.

Micro-injection: 1 spermatozoïde unique a été injecté dans l'espace péri-vitellin d'un ovocyte de hamster (technique "SUZI"); ce spermatozoïde avait été soit sélectionné selon la technique décrite (essai), soit simplement centrifugé sur gradient de Percoll (témoin). Dans tous les cas,



on a observé la formation ou non du pronucléus mâle 12 heures plus tard.

## 2. Résultats

3 spermatozoïdes en moyenne étaient attachés par la tête au fond de la boîte de culture à la fin de l'incubation. Le résultat de la fécondation hétérospécifique était le suivant: 24% de pronucléi en ayant injecté 1 spermatozoïde sélectionné, versus 7% pour le groupe non sélectionné ( $p < 0.01$ ).

## 3. Discussion

Cette étude est la 1ère à tester directement le pouvoir fécondant de spermatozoïdes AR+ sélectionnés. Elle demande bien entendu à être validée dans un modèle homo-spécifique, et avec des spermatozoïdes issus de patients hypofertiles.

### Commentaires (J.F. GUERIN)

*Cette étude originale et élégante montre qu'on peut sélectionner des spermatozoïdes réagis tout en conservant leur pouvoir fécondant. Une question se pose: la nécessité d'injecter 5 ou 6 spermatozoïdes dans l'espace périvitellin, voire plus dans certaines situations, est-elle uniquement en relation avec le statut acrosomique ? Certaines observations récentes permettent d'en douter. Aussi, le fait d'injecter 1 spermatozoïde unique permettra à coup sûr d'éviter les polyploïdies mais qu'en sera-t-il du taux de fécondation ?*

•••

## Relation entre le pouvoir fécondant du sperme et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité

CHAN P J , SU B C , KALUGDAN H , TREDWAY D R.

*Andrology and Molecular Biology Laboratories, Departments of Gynecology and Obstetrics, and Physiology and Pharmacology, Loma Linda University school of Medecine, Loma Linda, CA 92350, USA*

Human reproduction vol. 9 n°. 2 : 279-283,1994.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) jouent un rôle important dans le déterminisme des maladies auto immunes. Les antigènes de classe II (HLA II) jouent eux un rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T.

Le but de cette étude est de rechercher une association entre 3 gènes du HLA II (DQA1, DRB1,

DPB1) et les caractéristiques du spermogramme en terme de mobilité et de fécondance.

## 1. Patients et méthodes

41 spermes de couples infertiles ont été étudiés. Après centrifugation sur un gradient percoll à deux couches, le DNA des spermatozoïdes a été extrait et amplifié par PCR ( Perkin Elmer Cetus, Norwalk USA). La PCR a amplifié 242 paires de bases du deuxième exon de la région DQA1, 297 paires de bases du deuxième exon de la région DRB1 et 311 paires de bases du deuxième exon de la région de DPB1. L'eau a été prise comme contrôle négatif.

Les dimensions spermatiques et les caractéristiques vélocimétriques ont été obtenues grâce à un analyseur du mouvement HTM - C. Le pouvoir fécondant des spermes a été évalué par un hamster test selon la technique décrite par Rogers en 1985. L'intégrité des membranes de la tête et du flagelle a été appréciée par l'hypo osmotique swelling test.

## 2. Résultats

Les critères d'activation étaient significativement liés avec HLA DRB1 : si l'allèle était présent, 37% des spermes testés présentaient une hyperactivation diminuée contre 0% en l'absence de l'allèle DRB1. Tableau I

Hyperactivation	critères	n	DRB1	DPB1	DQA1
Bas	< 15%	27	10/27	16/27	20/27
Normaux	>15%	13	0/13	5/13	11/13

Parmi les caractéristiques vélocimétriques numériques et morphologiques des spermes les seules modifications étaient :

- en cas de présence de l'allèle DPB1 une numération et des dimensions de la tête significativement plus basses.

- Par contre la vitesse linéaire des spermes porteur de cet allèle était augmentée.

L'intégrité membranaire n'était pas influencée par les différents HLA. Les tests de fécondance ont montré une nette diminution des capacités en présence de l'allèle DRB1.

### 3. Discussion

Les résultats suggèrent le rôle que peut jouer le groupage HLA dans la spermatogénèse. Les critères d'hyperactivation, et leurs corollaires que sont les tests de fécondance, sont diminués en présence de l'allèle DRB1. Il avait déjà été démontré que les molécules HLA jouent un rôle dans les phénomènes de reconnaissance et d'attachement des SPZ. Les mécanismes de diminution de ces fonctions en présence de certain type HLA restent encore inconnus. On peut imaginer que pendant la spermatogénèse HLA DRB1 diminue la maturation des spermatoctytes et spermatogonies. Ces cellules expriment des molécules du système d'histocompatibilité.

Les autres aspects de l'influence du typage HLA, bien que les différences soit peu importantes par rapport aux critères de l'OMS, sont les modifications numériques et vélocimétriques induites par DPB1. L'allèle DPB1 aurait un effet direct ou indirect sur la synthèse des glycoprotéines membranaires. Une des données intéressantes de ce travail est l'absence d'influence de DQA1 ; qui est connu pour jouer un rôle prépondérant dans bon nombre de maladies auto-immunes. Notamment dans le diabète insulino dépendant où il est connu pour induire une destruction immunitaire des cellules bêta pancréatiques. Il serait intéressant d'explorer l'association éventuelle de cet allèle et la présence d'anticorps anti SPZ.

#### **Commentaires (B. SALLE) :**

*Cet important travail confirme l'importance du déterminisme génétique sur les caractéristiques du spermogramme. L'association de certain groupe HLA et d'autoanticorps mérite d'autres investigations. Ces travaux sont une preuve de plus que la thérapie génique pourrait un jour être utile en andrologie.*

•••

## THERAPEUTIQUE

### **Inadéquation de l'association FSH-Testostérone à initier et/ou maintenir la spermatogénèse chez les hommes atteints d'Hypogonadisme Hypogonadotrope**

G. SCHAISON, J. YOUNG, M. PHOLSENA,  
K. NAHOUL, B. COUZINET

*Service d'Endocrinologie et des maladies de la reproduction, Hôpital de Bicêtre 94275 Le Kremlin-Bicêtre et Fondation de recherche en hormonologie, Fresnes.*

*J. Clin. Endocrinol. Metab, 1993, Vol. 77, n°6, 1545-1549.*

L'efficacité du traitement de l'azoospermie de l'hypogonadisme hypogonadotrophique par l'association hMG-hCG est désormais classique. La mise à la disposition des endocrinologues d'une FSH pure offre la possibilité d'aider à la compréhension du déterminisme hormonal de la spermatogénèse.

#### **1. Matériel et Méthodes**

Dans ce but, l'équipe de G. Schaison, a comparé chez 10 hommes âgés de 23 à 35 ans atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope (et sans antécédents de cryptorchidie, ce qui est une notion fondamentale car cette pathologie rend généralement inefficace le traitement par hMG-hCG et dont 6 ne désiraient que l'accroissement de volume de leurs testicules) sans pulsativité de la LHRH ni tumeur intra-cranienne, les effets de :

- 3 fois/semaine hMG 150iu et hCG 1500iu

- 3 fois/semaine FSH pure 150iu et T enanthate 250mg/semaine

Chaque protocole était administré en premier à 5 hommes. La durée totale de chaque forme de traitement a été de 24 mois. Soit en tout 48 mois.

#### **2. Résultats**

Après 24 mois, confirmant l'ensemble des publications précédentes, une spermatogénèse complète était induite après hMG-hCG (des grossesses s'en sont suivies). Alors qu'en 24 mois, FSH + T étaient incapables de le faire, ni d'ailleurs de faire subir une augmentation de volume aux testicules. Fait plus intéressant

encore, la concentration spermatique a chuté à  $0,03 + 0,1$  M/ml en 3 mois, avec azoospermie au 6ème mois, lorsque la FSH pure + T a remplacé les hMG (l'inverse est écrit par erreur dans le résumé de l'article). Le volume testiculaire est passé à 12 ml dans le groupe hMG-hCG et à 6 seulement dans le 2ème groupe.

Les auteurs ont été jusqu'à mesurer les taux de stéroïdes dans le sperme qui étaient analogues dans les deux formes de traitement. Mais ces valeurs ne représentent pas la T intratesticulaire.

### 3. Discussion

Ainsi, même le maintien d'une spermatogénèse n'est pas possible par l'association FSH pure et T. Ces faits prouvent que la dose de T exogène est loin de déterminer un taux intratesticulaire physiologique et suffisant. Ils démontrent aussi l'incapacité de la seule FSH à promouvoir chez l'homme une spermatogénèse ni totale ni incomplète puisque le volume testiculaire, reflet du développement des tubes, s'est à peine modifié. La dose de T administrée a permis une sexualité normale.

Curieusement le "rasage" a été considéré comme normal, alors que d'ordinaire les H.H. souffrent de leur aspect juvénile et de la pauvreté de leur barbe.

#### *Commentaires (J. BELAISCH)*

*La discussion finale de l'article concernant les implications de ces constatations sur le plan de la contraception masculine, dans le cas où l'on disposerait un jour d'une molécule permettant le freinage absolu des gonadotrophines (ce qui n'est pas le cas avec les agonistes de la LHRH) est particulièrement passionnante. Cet article fait donc un point très précis des mécanismes connus de la spermatogénèse et apporte des preuves définitives dans des domaines précis mais n'a pas permis la découverte de faits nouveaux.*

•••

## **Inefficacité de la Kallikreine dans le traitement de la stérilité masculine idiopathique : un essai en double aveugle, randomisé et avec placebo**

C. KECK, H.M. BEHRE, F. JOCKENHOVEL, E. NIESCHLAG

*Institute of Reproductive Medicine of the University (WHO Collaborating Centre of Human Reproduction), Münster, Allemagne.*

Human Reprod. Vol.9, n°2, 325-329, 1994.

La plupart des hommes infertiles souffrent de stérilité idiopathique dont les causes sont par définition inconnues et dont le diagnostic est un défi permanent pour les andrologues. Cependant la tentation est grande de leur administrer différentes sortes de traitements, souvent sans certitude quant à leur efficacité.

Ainsi, la mestérolone a été utilisée pendant de nombreuses années jusqu'à ce qu'une étude randomisée et en double-aveugle de l'OMS (1989) démontre l'absence de ses effets positifs sur les paramètres du sperme et les taux de grossesse. L'hCG et l'hMG ont été administrés pendant plus de 20 ans jusqu'à ce qu'une étude avec placebo démontre leur totale inefficacité (1987).

La kallikréine est largement prescrite depuis 15 ans, particulièrement lorsque les autres traitements sont sans succès.

### 1. Matériel et Méthodes

*Protocole.* 91 patients ont été inclus en tenant compte des critères suivants : infertilité primaire d'au moins un an, âge de 18 à 40 ans, âge de la partenaire de 18 à 35 ans, numération  $\geq 5 \times 10^6$ /ml, mobilité progressive  $\leq 40\%$ , téatospermie  $\leq 10\%$ , valeurs normales de LH, FSH, prolactine et testostérone, bilan gynécologique normale chez la partenaire.

Les patients ont été traités pendant 12 semaines soit par placebo soit par des comprimés de kallikréine à la dose de 600U.I./jour. Les examens de contrôle ont été effectués après 6 et 12 semaines de traitement.

*Examens pratiqués :* spermogramme, spermocytogramme, analyse de la mobilité par vidéomicrographie assistée par ordinateur (chez 55 patients) pénétration *in vitro* du mucus bovin, dosages hormonaux, marqueurs des glandes annexes.

## 2. Résultats

Le traitement a été en général bien toléré. L'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence significative, quel que soit le paramètre considéré, entre le groupe placebo et le groupe kallikréine.

Au cours de la période d'observation de 6 mois, 4 grossesses ont été enregistrées dans chacun des 2 groupes.

## 3. Discussion

Les études *in vitro* ont montré un effet positif de la kallikréine sur la mobilité et le métabolisme des spermatozoïdes. Certains ont même noté une amélioration du test de pénétration *in vitro* du mucus cervical bovin. Les études précédentes concernant les effets d'un traitement oral par la kallikréine ont apporté des résultats contradictoires ; toutes ces études sont critiquables quant à leurs méthodes.

La présente étude présente toutes les garanties méthodologiques pour que l'on puisse affirmer que la kallikréine, per os à la dose de 600U./jour, est sans effet sur la stérilité masculine idiopathique.

Il a été par ailleurs montré que les effets cardiovasculaires bénéfiques de la kallikréine ne s'observent qu'à la dose de 4.500UI/jour. Aucune étude n'a jamais été entreprise, dans la stérilité masculine, avec de telles doses. De toute façon, le recours à la kallikréine ne repose sur aucune base physiopathologique.

Nous insistons sur la nécessité d'entreprendre des études rigoureuses avant de recourir à un quelconque traitement de l'infertilité masculine idiopathique.

### **Commentaires (J.C. CZYBA)**

*Nous avons rapporté, dans le précédent numéro d'Andrologie, une étude comparable de Glazerman et al. aboutissant à la même conclusion (Fertil. Stéril. 1993, Vol.60, n°6, 1052-1056).*

*La kallikréine n'étant pas à la mode en France, on ne peut que se féliciter d'avoir évité l'erreur commise pendant une quinzaine d'années dans plusieurs autres pays. Nous utilisons en revanche largement des antiestrogènes, des androgènes, de la bromocriptine, de l'arginine, des cures de variocèle, des corticoïdes.*

*Le temps est venu d'insister sur la nécessité d'une évaluation rigoureuse des traitements de l'inferti-*

*lité masculine, avec des méthodes appropriées, quelles qu'en soient la lourdeur et les difficultés. Le bilan gynécologique de la partenaire doit être considéré comme aussi important que le bilan andrologique au moment de l'inclusion dans un protocole de recherche.*

*La stérilité masculine idiopathique constitue malheureusement une situation dans laquelle, faute de mieux, l'andrologue, pour compétent qu'il soit, reste tenté d'administrer l'un ou l'autre des traitements à la mode. Faute de connaître la cause de la non fécondance du sperme, reste l'espoir que certains patients peuvent bénéficier d'un traitement par hasard approprié.*

•••

## **La bromocriptine neutralise l'effet inhibiteur des macrophages sur la motilité des spermatozoïdes humains**

A. SCOMMEGNA, S.H. YE, G.S. PRINS

*Department of Obstetrics and Gynecology, Michael Reese Hospital and University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA.*

*Fertility Sterility, Vol. 61, n°2, 331-335, 1994.*

---

L'hypofertilité associée à l'endométriозe n'est pas encore très bien comprise, mais il a été suggéré que des causes immunologiques pourraient intervenir. Il a été établi que chez les femmes atteintes d'endométriозe, le liquide péritonéal contient une quantité importante de cellules inflammatoires hyperactivées, en particulier des macrophages. Il a été, par ailleurs, montré que les produits solubles des lymphocytes et des macrophages activés affectent les fonctions des spermatozoïdes.

On a récemment découvert l'existence d'interactions entre la Prolatine (PRL) et les cellules immunitaires. Il existe des récepteurs de PRL sur les lymphocytes T et B et les monocytes murins et humains. Le traitement de souris par la bromocriptine supprime la production de gamma-interféron par les T lymphocytes et, par conséquent, l'activation des macrophages ; ceci suggère que la PRL est nécessaire au déclenchement d'une reprise immunitaire normale.

Notre étude a été entreprise pour déterminer si la PRL peut moduler l'influence immunitaire sur l'axe reproducteur. Le modèle choisi est la dégradation de la motilité des spermatozoïdes

humains par les produits solubles de macrophages murins.

### 1. Matériel et méthodes

**Animaux.** Des souris mâles (C<sub>3</sub>H/HEN) âgées de 6 à 8 semaines ont été réparties en 4 groupes.

G-1- Groupe de contrôle.

G-2- Groupe traité par une injection intrapéritonéale de BCG, 4 jours avant le lavage péritonéal, pour obtenir des macrophages activés.

G-3- Groupe traité par un implant sous-cutané de bromocriptine placé 7 jours avant l'injection de BCG.

Il a été démontré que ce protocole supprime la PRL sérique pendant un mois.

G-4- Groupe traité comme G3 + une injection quotidienne de 100µg de PRL de rat pendant les 11 jours précédant le lavage péritonéal.

**Récolte et culture des macrophages.** Après sacrifice des animaux, le péritoine est irrigué par une solution de Hank et environ 3ml de liquide péritonéal est recueilli. Du sang est obtenu par ponction cardiaque.

Après 3 centrifugations du liquide péritonéal les culots sont resuspendus dans du liquide de Ham. L'examen microscopique montre que les cellules prédominantes sont des macrophages avec des grandes vacuoles qui révèlent l'activation. Les macrophages de G1 sont plus petits et ne contiennent pas de vacuoles.

Les suspensions de macrophages sont mises en culture pour obtenir une adhésion des macrophages sur plaque de plastique ; les autres cellules sont éliminées par lavage. Les macrophages fixés sont à nouveau cultivés pendant 88 à 96 heures et le liquide de culture est récolté après centrifugation.

**Préparation du sperme et analyse :** Le sperme est obtenu à partir de donneurs fertiles. Les spermatozoïdes sont recueillis à partir d'un gradient discontinu de Percoll et resuspendus dans du liquide de Ham ; leur concentration finale est ajustée à 60x10<sup>6</sup>/ml.

20µl de chaque échantillon sont incubés à 37°C avec 40µl de liquide de culture de macrophages, de chaque groupe de souris. 40µl de milieu de culture sans macrophage sont mélangés avec 20µl de chaque échantillon de spermatozoïdes pour constituer les témoins.

La mobilité des spermatozoïdes est évaluée 0,2 et 4 heures après le mélange en utilisant un analyseur automatique (Cellsoft).

**Les dosages de prolactine** sont effectués par radio-immuno-assay.

### 2. Résultats

La PRL sérique (31,8 ± 5,8ng/ml chez les témoins G1) est significativement élevée par l'injection de BCG (55,8mg/ml) et significativement abaissée chez les traités par BCG+Bromocriptine (17,7 ± 2ng/ml).

Le tableau ci-dessous montre l'altération significative du % de mobilité progressive par le surnageant de la culture de macrophages activés et la protection qu'exerce le traitement par la bromocriptine

OH	% de mobilité progressive		
	0H	2H	4H
Milieu seul et surnageant de culture de macrophages non activés	73	72	63
Surnageant de macrophages activés	69	52	37
Surnageant d'animaux traités par BCG + bromocriptine	72	57	56
Surnageant d'animaux traités par BCG + bromocriptine + PRL	68	59	35

La vitesse moyenne des spermatozoïdes est altérée de la même façon que leur mobilité progressive. Linéarité et amplitude latérale de déplacement de la tête ne sont modifiées dans aucun groupe.

### 3. Discussion

Ces résultats confirment bien que les produits solubles délivrés par les macrophages activés affectent la mobilité des spermatozoïdes. Les macrophages activés dans le péritoine des femmes souffrant d'endométriose pourraient bien être responsable de l'hypofertilité par leur production de monokines cytotoxiques et en stimulant la prolifération des lymphocytes et la production de lymphokine. La bromocriptine qui réduit de façon importante les taux de PRL circulante neutralise les effets des produits solubles. Nous suggérons que la PRL est nécessaire à l'activation normale des macrophages *in vivo*. Nous proposons le recours à la bromocriptine

ne pour le traitement de l'hypofertilité chez les femmes atteintes d'endométriose.

**Commentaires (J.C. C ZYBA)**

*Ce très intéressant travail, séduisant par sa méthodologie, appelle l'attention sur le rôle des macrophages dans l'hypofertilité féminine liée à l'endométriose et sur le rôle de la prolactine dans l'activation des macrophages. Logiquement, il débouche sur une proposition de traitement par la bromocriptine. La balle est dans le camp des gynécologues.*

*On sait que les macrophages peuvent aussi être activés chez l'homme, en particulier dans les voies spermatiques et les glandes annexes lors de divers processus inflammatoires. Ne pourrait-on rechercher là, la cause de certaines asthénospermies et, de la même façon en proposer le traitement par la bromocriptine?*

• • •