COMPTE-RENDU DE SYMPOSIUM ET

REVUE DE LA LITTERATURE INTERNATIONALE

avec la collaboration de :

M.BENCHAIB

S.CARREAU

J.C.CZYBA

M.DROSDOWSKY

H.LEJEUNE

R.MIEUSSET

K.OSTROWSKI

S.ROUSSEAUX

B.SELE

433 Symposium international sur la stérilité masculine due à des toubles de la mobilité : facteurs étiologiques et traitements (Serono Symposia)
Revue par R.MIEUSSET

ENDOCRINOLOGIE

437 A propos du rôle des estrogènes dans le tractus génital mâle
R.A.HESS, D.BUNICK, K.H.LEE *et al*
Nature, 390, 509-512, 1997

439 Transcription et traduction du récepteur (RE) b des estrogènes dans le tractus génital mâle des souris ERa KO et sauvages
C.S.ROSENFELD, V.K.GANJAM, J.A.TAYLOR et al. *Endocrinology* 139 : 2982-2987, 1998

440 Variation des produits finaux de la biosynthèse et du métabolisme des androgènes au cours de la différenciation postnatale des cellules de Leydig du rat
R.S.GE, M.P.HARDY
Endocrinology 139 : 3787-3795, 1998

GENETIQUE

440 Le chromosome Y montre qu'Adam était africain
A.GIBBONS
Science 278 : 804-805, 1997

EXPLORATION DE LA FERTILITE

441 Intérêt du test post-coïtal : essai randomisé
S.G.DEI, F.M.HELMERHORST, K.W.BLOEMENKAMP *et al*
BMJ, 317, 502-504, 1998

ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION

443 Naissance de filles normales après tri des spermatozoïdes à l'aide de la méthode MicroSort® et insémination intra-utérine, fécondation in vitro ou microinjection intra-ovocytaire.
E.F.FUGGER, S.H.BLACK, K.HEYVANFAR, J.SCHULMAN
Human Reproduction, 13, 2367-2370, 1998

444 Développement de souris normales à partir d'ovocytes fécondés par des spermatozoïdes lyophilisés
T.WAKAYAMA and R.YANAGIMACHI
Nature biotechnology, 16, 639-641, 1998

445 L'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes va-t-elle entraîner une augmentation de la fréquence des micro-délétions dans la région AZFc du chromosome Y dans les générations futures ?
J.A.M.KREMER, J.H.A.M.THERLINGS, G.BORM et al
Human Reproduction, 13, 2808-2811, 1998

446 La microscopie électronique dans l'estimation de la viabilité des spermatozoïdes cryoconservés
H.RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.HECKWALL
European Microscopy and Analysis, 25-27 mai 1998

Stérilité Masculine et troubles de la Mobilité : Facteurs étiologiques et traitements.

30-31 Janvier 1998 - Paris.

(Revue par R.MIEUSSET)

Les objectifs de ce symposium étaient de faire l'état des récents progrès réalisés lors de troubles majeurs de la mobilité des spermatozoïdes, y compris l'akinétospermie, dans les domaines physiopathologique et thérapeutique.

La première session traitait de
l'ÉTIOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE IMMOBILE.

J.L. Gatti (France) a fait le point sur les **mécanismes et la régulation de la mobilité des spermatozoïdes,** précisant entre autre la présence d'une Heat shock protein (HSP70) au niveau de l'axonème, l'existence d'un complexe régulateur de la dynéine. La kinésine joue un rôle important dans la rotation des deux microtubules centraux. Plus de 200 protéines sont impliquées dans la mobilité flagellaire, mais une mutation portant sur une seule protéine peut affecter la mobilité.

J.G. Alvarez (USA) a traité ensuite la **stratégie métabolique du spermatozoïde humain et son impact sur la mobilité**. Le cycle de Krebs est utilisé par le spermatozoïde épididymaire, il y a passage d'un métabolisme oxydatif à glycolytique après éjaculation. D'autres sources d'ATP sont utilisées par le spermatozoïde. Les mitochondries sont localisées à la pièce intermédiaire avec nécessité d'une diffusion de l'ATP à l'axonème. La stratégie développée par le spermatozoïde pour maintenir sa mobilité est de maximiser la production d'ATP par différents processus.

C. Gagnon (Canada) a ensuite abordé les **facteurs extrinsèques affectant la mobilité des spermatozoïdes**, incluant les facteurs immunologiques, avec les anticorps anti-spermatozoïdes et les cytokines, puis les facteurs cellulaires: les bactéries, dont celles capables de se lier aux spermatozoïdes; les leucocytes et leur produit de sécrétion, les dérivés libres oxydatifs (DLO). En conclusion, si les cytokines ont un effet marginal, les bactéries peuvent altérer la mobilité; le principal DLO est le peroxyde d'hydrogène (H202); l'effet des leucocytes sur la mobilité se fait par l'intermédiaire des DLO contre lesquels le plasma séminal pourrait agir. L'effet direct des leucocytes sur la mobilité reste débattu.

Les relations entre **calcium intracellulaire et mobilité des spermatozoïdes** ont été abordées par *H. Breitbart* (Israël). Prenant en compte le rôle de la membrane (avec ses canaux calcium), la production d'ATP par glycolyse ou respiration mitochondriale, différents modèles expérimentaux semblent indiquer que le calcium intracellulaire est diminué par la calcium-ATPase de la membrane, par les mitochondries, par les échanges sodium/calcium. L'hypothèse de l'acrosome comme lieu de stockage du calcium est évoquée.

J. Cummins (Australie) a fait ensuite une approche originale des **aspects génétiques de l'altération de la mobilité des spermatozoïdes**, partant d'une amphimixie vieille de trois millions d'années, passant par les stratégies reproductives des mâles de différentes

espèces, évoquant la compétition entre les spermes, rappelant que les humains se signalent par une faible compétition spermatique et une stérilité programmée (ménopause), questionnant les raisons qui contribuent au succès reproducteur des hommes (agression, dominance, ...) pour terminer en disant que les humains ne sont pas une espèce féconde, et que l'asthénozoospermie pourrait être une maladie, avoir des causes génétiques ou n'être que l'un des aspects d'un organisme subfertile.

L'**étiologie de la nécrozoospermie** a été traitée par *P. Lecomte* (France). Sa fréquence est estimée entre 0,2 et 0,5% des patients, bien qu'elle ne soit pas systématiquement évaluée. Deux mécanismes sont envisagés, la nécrose et l'apoptose. Les causes possibles relèvent des anomalies de l'épididyme entre autres.

La deuxième session était dévolue aux ***POSSIBILITÉS THÉRAPEUTIQUES***.

P.Jouannet (France) a développé l'**évaluation clinique de la dyskinésie flagellaire**, principalement révélée par un mouvement flagellaire anormal. Le diagnostic repose sur le TPC négatif, l'absence de pénétration dans le mucus, une faible vélocité des spermatozoïdes, des mouvements anormaux dans le mucus. La numération de spermatozoïdes est normale, quelques spermatozoïdes pouvant avoir une mobilité normale. Le diagnostic est confirmé par microscopie électronique. Il existe plusieurs types possibles de dyskinésies flagellaire. Les résultats montrent un plus fort taux de succès par ICSI que par SUZI.

R. Mieusset (France) a résumé les différentes **approches thérapeutiques in-vivo des troubles de la mobilité**. Les traitements utilisés sont évoqués : les thérapies comportementales incluant soit une augmentation de la fréquence éjaculatoire, soit une éjaculation répétée à de courts intervalles, semblent avoir un effet bénéfique. Les antibiotiques sont inefficaces sur la mobilité; mais associés à une thérapie comportementale en cas de leucospermie sans bactériospermie, ils sembleraient réduire la récurrence de la leucospermie. Un traitement par FSH semble sans effet positif. Enfin, en ce qui concerne les anti-oxydants, les résultats sont variables selon les études, mais un effet positif ne peut être actuellement exclu.

S. Hamamah (France) a revu les **méthodes spécifiques et non spécifiques de traitement in-vitro**. Partant du fait qu' «un spermatozoïde propre avec une bonne motilité est nécessaire au succès de l'ICSI» les causes de fausses asthénozoospermies sont rappelées, ainsi que les différentes techniques de séparation du sperme. L'importance d'une définition précise des milieux utilisés, ainsi que des effets des additifs est soulignée, sachant que quel que soit le traitement utilisé, il ne doit induire aucune perte supplémentaire de mobilité. La conclusion est que «l'ICSI n'a pas toutes les réponses, la mobilité des spermatozoïdes doit aussi être améliorée».

La troisième session a abordé l'***ICSI POUR INDICATION D'IMMOBILITÉ DES SPERMATOZOÏDES*** .

J. Cohen (USA) chargé d'aborder l'**identification des spermatozoïdes vivants** a essentiellement traité les problèmes de perte de spermatozoïdes vivants lors des différentes étapes menant du prélèvement à la congélation/décongélation pour utilisation ultérieure. Démonstration animée d'une technique de cryoconservation d'un seul spermatozoïde dans une zone pellucide vide, avec un taux de récupération expérimentale de 50 à 93%. Un problème posé est l'adhérence des spermatozoïdes humains à la zone pellucide vide humaine. Le recours à une zone pellucide d'une espèce animale, si elle ne pose plus de problème d'adhérence des spermatozoïdes, soulève des questions qui rentrent dans le champ de la sécurité biologique.

St. Green (RU) a ensuite rapporté les **différentes procédures utilisées pour injecter des spermatozoïdes immobiles : sélection, milieu de culture, casse du flagelle**. Après avoir envisagé les différentes sources des spermatozoïdes et les différents stades de mobilité, un consensus apparaît sur le fait que l'immobilisation du spermatozoïde est un bénéfice pour réaliser l'ICSI. Les techniques de transfert du spermatozoïde immobile au moyen de systèmes soit aérien (air) soit hydraulique (huile)

sont évoqués, en insistant sur l'importance de la viscosité et la toxicité potentielle de ces milieux.

R. Ron-El (Israël) a traité le problème de la **capacité fécondante de spermatozoïdes décongelés immobiles**. Considérant uniquement les spermatozoïdes obtenus à partir de prélèvements testiculaires pour azoospermie, et dans le cas où aucun spermatozoïde mobile n'a été retrouvé après exploration intensive du sperme, un taux de fécondance de 37% versus 31% a été obtenu pour les spermatozoïdes décongelés mobiles versus immobiles. Mais aucune grossesse viable n'a été obtenue avec les spermatozoïdes décongelés immobiles. Le diagnostic différentiel entre spermatozoïdes vivants et morts, semble avoir été fait sur des critères morphologiques.

H. Tournaye (Belgique) a rapporté les **aspects cliniques de l'ICSI avec spermatozoïdes immobiles**. Les cas d'ICSI réalisés avec 100% de spermatozoïdes immobiles sont rares, moins de 1% de tous les ICSI. Ils sont associés à un échec de fécondation. Des tests diagnostiques plus précis sont nécessaires. Si les spermatozoïdes sont morts ou «vieux», des altérations du génome sont à prendre en compte. L'utilisation du test hyperosmotique pourrait avoir un intérêt pour le diagnostic de vitalité. Si les spermatozoïdes sont morts, il faudrait réaliser un prélèvement testiculaire.

La quatrième session était consacrée aux ***SPERMATOZOÏDES TESTICULAIRES : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES***.

C. Mauduit (France) a revu les **facteurs de croissance dans le développement et la fonction du testicule**. Après avoir mis en place le testicule foetal et adulte, les facteurs endocrines et locaux de la spermatogenèse, le rôle des différents facteurs de croissance (TGF béta, IGFS, NGF, SCF) dans ces processus est détaillé. En conclusion, le système endocrine est le système régulateur principal de la spermatogenèse mais il n'est pas le seul: les facteurs de croissance ont un rôle important, en ajustant l'action du système endocrine.

A. Ogura (Japon) a rapporté les **mécanismes moléculaires de la fécondation dans le cas de cellules spermatiques immatures**. Utilisant différents modèles animaux, et après avoir évoqué les problèmes de recueil et d'identification (morphologique ou chromosomique), les techniques de micro injections (électrofusion, ICSI), d'activation ovocytaire et de congélation des cellules, il est rapporté que les cellules spermatogéniques immatures peuvent être facilement congelées et que l'utilisation de ces cellules a permis l'obtention de petits normaux.

L.D. Russel (USA) a développé la notion d'**apoptose testiculaire**. L'apoptose est probablement un des mécanismes principaux de régulation de la spermatogenèse. De nombreuses études de l'apoptose testiculaire ont été réalisées chez l'animal; le diagnostic d'apoptose pose toutefois problème selon que la définition utilisée est morphologique, biochimique ou physiologique. Une des hypothèses envisagée est que l'apoptose surviendrait pour réguler le nombre de cellules que la cellule de Sertoli peut assumer. Une question supplémentaire est soulevée par le fait que l'apoptose est le propre d'une cellule alors que les cellules germinales existent sous forme de clones.

D. de Rooij (Pays Bas) a traité de l'**expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose dans le testicule**. Le modèle utilisé est l'induction d'une apoptose après irradiation (4Gy). Le facteur de transcription p53 a un rôle important, à la fois après l'infection ou l'altération de l'ADN, mais aussi dans l'initiation de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Mais d'autres facteurs sont impliqués comme TGF béta1 et les familles bCl-2 et Fas.

La session cinq était dévolue au ***RECUEIL DE SPERMATOZOÏDES POUR ICSI***.

G. Tritto (France) a développé l'**intérêt des micro capteurs pour le recueil de spermatozoïdes testiculaires en vue d'ICSI**. Après avoir présenté un modèle multifractal du testicule humain, et rappelé l'apport de l'exploration testiculaire par échographie et Doppler, l'intérêt de l'utilisation de micro capteurs ther-

miques, vasculaires, de pression, d'oxygénation a été montré dans le cas de chirurgie par varicocèle. Cette approche permettrait une meilleure sélection du lieu de prélèvement testiculaire en cas d'azoospermie. Ces micro capteurs vont être complexifiés et miniaturisés dans les prochaines années. Leur utilisation permettra un accès unique à la micro physiologie testiculaire.

S. Silber (USA) a résumé les **méthodes, modalités et sites idéaux pour le recueil de spermatozoïdes testiculaires**, en traitant essentiellement le problème des azoospermies non obstructives. Reprenant ces travaux antérieurs, il a rappelé qu'un nombre minimal (6) de spermatides par coupe de tubule séminifère, était nécessaire pour obtenir une «oligospermie». En cas d'azoospermie non obstructive, quelques endroits du testicule sont susceptibles d'avoir des spermatozoïdes. Les anomalies du chromosome Y (microdélétions) sont envisagées.

P.N. Schlegel (USA) a ensuite abordé les **risques potentiels des ponctions testiculaires multiples**. L'exérèse de tissu testiculaire entraîne une inflammation et une perte de tissu testiculaire. Ceci se traduit par des lésions hypoéchogéniques (échographie) dans 29% des cas de biopsies (7% pour les percutanées); ces effets sont transitoires (6 mois environ). En ce qui concerne la production d'androgènes, chez une courte série de patients (20), il n'y a pas de modification significative du taux de testostérone sérique, mais une tendance notable à la diminution. Enfin, une dévascularisation du tissu peut survenir et les plages biopsiées sont le lieu de cicatrices ultérieures. Il propose une approche se limitant à biopsier des tubules séminifères dans des régions avasculaires du tissu testiculaire.

V. Izard (France) a rapporté la **place de la cytologie per opératoire de la population germinale dans la stratégie du recueil de spermatozoïdes testiculaires**. Diff-Quick fournit une préparation permanente qui permet une coloration rapide en per-opératoire des éléments cellulaires testiculaires recueillis par une empreinte. Cette coloration rend possible une identification simple et fiable des différents éléments cellulaires (histopathologie) et permet de préciser le lieu de prélèvement du tissu testiculaire.

La sixième session était consacrée à la
QUALITÉ DU CONCEPTUS OBTENU PAR ICSI À PARTIR DE SPERMATOZOÏDES TESTICULAIRES.

F. Shenfield (RU) a traité des **problèmes éthiques de la conception assistée**. Rappel de l'article 21 : prohibition de tout gain financier : «aucune partie du corps humain ne peut faire l'objet d'une vente (incluant les ovocytes et les spermatozoïdes)». Problèmes soulevés par la réduction embryonnaire, le fantasme de l'enfant parfait, la réification de l'enfant à venir. Dans le domaine de l'eugénisme sont évoqués la destruction des embryons humains «mal faits», la sélection du sexe pour des raisons non médicales. Enfin, un suivi non intrusif des enfants nés par ICSI serait souhaitable. «On se perd sur la mer des problèmes éthiques».

P.H.Vogt (Allemagne) a présenté les **aspects génétiques de la stérilité masculine**. Le syndrome de Kartagener (1/80 000 individus) comprend situ inversus, bronchectasies, sinusite chronique et spermatozoïdes immobiles (absence de bras de dynéine dans les structure ciliaires) et peut être induit par des mutations dans de multiples gènes. En ce qui concerne le chromosome Y, un facteur azoospermique (AZF) a été retrouvé sur 3 régions différentes.

A. Hazout (France) a revu la **qualité du conceptus obtenu par ICSI à partir de spermatozoïdes testiculaires**. Il rapporte entre autres une absence de différence de qualité du conceptus entre sperme frais et congelé. Il montre dans une série propre portant sur 15 grossesses obtenues par ICSI avec sperme testiculaire (azoospermie sécrétoire) 4 naissances avec malformations.

M. Bonduelle (Belgique) aborde les **problème génétiques et l'ICSI**. 1987 enfants nés par ICSI (étude belge) selon un protocole établi, de 1991 à 1997 (sources du spermatozoïde utilisé variables). Les principaux résultats sont les suivants : 21 mort-nés (1%) ce qui représente deux fois le taux attendu; anomalies des chro-

mosomes sexuels observées chez 4,8% des garçons et 1,5% des filles. Les anomalies autosomiques sont liées à l'âge maternel. Le taux de malformation est de 2,3% . Les malformations les plus fréquentes sont celles du système nerveux central et des systèmes urogénitaux.

Enfin, *R. Edwards* (RU) a terminé ce symposium par une synthèse brillante des **techniques de reproduction assistée 20 ans après,** en partant du dogme de la capacitation en 1956, en parlant ensuite de Louise Brown, pour revenir à l'infertilité masculine («il faut maintenant se tourner vers l'andrologie») avec les microdélétions et puis le centriole, l'oeuf qui tourne, le spermatozoïde qui devient l'organisateur de l'oeuf....

ENDROCRINOLOGIE

A propos du rôle des estrogènes dans le tractus génital mâle

A role for estrogens in the male reproductive system

R.A HESS, D.BUNICK, K.H.LEE, J.BAHR, J.A.TAYLOR, K.S.KORACH, D.B.LUBAHN.

Nature, 1997, Vol 390, 509-512.

Les estrogènes sont depuis longtemps considérés comme des hormones sexuelles typiquement femelles alors que la testostérone, chef de file des androgènes, est l'apanage du mâle; cependant ces hormones sexuelles sont présentes dans les 2 sexes. En conséquence les différences entre mâle et femelle sont d'ordre quantitatif (et liées à l'expression des récepteurs spécifiques) plutôt que qualitatif. Chez le mâle, l'estradiol est présent en quantité faible dans le sang alors que dans le fluide du rete testis la concentration d'E2 atteint 250 pg/ml.

Dans cette étude les auteurs ont démontré sans équivoque que les estrogènes exerçaient un rôle important dans la région de la tête épididymaire en favorisant la réabsorption du fluide entourant les spermatozoïdes. Des souris mâles déficientes en récepteur de type a (ERa) pour les estrogènes (ERKO), sont stériles. Les testicules se développent normalement jusqu'à la puberté avec une spermatogenèse efficace, puis une dégénérescence progressive s'installe suite à l'accumulation de fluide dans le testicule (Lubahn et al., PNAS, 90, 11162, 1993). Cette anomalie engendre une augmentation de la pression dans les tubes séminifères conduisant à la destruction progressive de la lignée germinale et à une infertilité complète des mâles (Eddy et al., 137, 4796, 1996). En fait les régions post-testiculaires (canaux efférents et tête épididymaire) sont riches en ERa, ces derniers seraient mis normalement à contribution dans les phénomènes de réabsorption (environ 90%) du fluide testiculaire ce qui n'est plus le cas chez les ERKO. La preuve expérimentale (ligature des canalicules à différents niveaux) a donc été apportée par ces auteurs. Ils ont bien montré que la réabsorption du liquide au niveau des régions précitées était achevée en 3 heures avec une surface luminale des canalicules diminuée de 82% chez les souris contrôles alors que chez les ERKO cette surface augmente de 46%. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'une concentration estrogéno-dépendante du fluide sortant du testicule associée à la fertilité de la souris mâle.

Commentaires (S. Carreau)

Estrogènes et maturation épididymaire des spermatozoïdes

Dans un travail récent publié par le groupe de Sharpe (Fisher et al., Endocrinology, 139, 3935), l'aquaporine-1 (protéine semble-t-il estrogéno-dépendante) pourrait être impliquée dans les phénomènes de réabsorption du fluide au niveau des canaux efférents chez le rat. En outre, on ne peut pas ignorer l'existence du récepteur ERβ (Hess et al., J Androl, 8,485,1997) dans cette région post-testiculaire et les résultats fondamentaux publiés dans la revue Nature doivent donc être relativisés par rapport au rôle mal connu des couples de récepteur ERa et ERβ.

Chez le rat, l'activité aromatase est tout à fait fonctionnelle dans les cellules germinales et notamment les spermatozoïdes (revue de Carreau et al, Ann Endocrinol, 59, 79, 1998); cependant le gène de l'aromatase n'étant plus transcrit lorsque le spermatozoïde sort du testicule, l'activité aromatase décroit au fur et à mesure que le spermatozoïde se déplace de la tête vers la queue de l'épididyme (Janulis, J Androl, 19, 65, 1998) ce qui corrobore le rôle des estrogènes dans la région des canaux efférents et la tête proximale de l'épididyme.

Le rôle positif de l'estradiol chez le mâle n'est sans doute pas uniquement localisé aux régions post-testiculaires puisque la prolifération des gonocytes est dépendante de l'estradiol (Li et al., Endocrinology,

138, 1289, 1997); par ailleurs des ERβ ont été détectés dans pratiquement toutes les cellules germinales chez le rat (Saunders et al., J Endocrinol.,156, R3, 1998) ce qui laisse supposer des interactions estrogéniques dans ces cellules. D'ailleurs, l'administration d'inhibiteurs de l'aromatase induit une diminution de la spermiogenèse chez le rat tout comme chez le singe (Shetty et al., J Steroid Biochem Molec Biol, 61, 157, 1997).

En conséquence, les estrogènes à un taux physiologique, se révèlent donc être, contrairement à la notion classique, tout à fait essentiels à la reproduction du mâle ce qui nous amène à reconsidérer certaines notions dans la Physiologie de la Reproduction avec non seulement des régulations androgéno-dépendantes mais aussi estrogéno-contrôlées.

Les estrogènes auraient-ils un rôle à jouer dans la spermiogenèse chez l'homme?

Si la FSH et la testostérone sont fondamentalement impliquées dans le développement et la maintenance de la spermatogenèse chez les primates, les estrogènes produits localement jouent sans doute un rôle dans le contrôle de la stéroïdogenèse et pourraient bien être impliqués aussi dans la régulation de la spermatogenèse et de la spermiogenèse à plusieurs niveaux.

Des données rassemblées à partir de la littérature, j'ai extrait quelques informations qui plaident en faveur d'un rôle des estrogènes dans les fonctions de reproduction de l'homme.

Tout d'abord, le fluide du rete testis renferme une concentration en estrogènes plus élevée que celle du sang périphérique (Hendry et al., Br. J. Urol.,55, 785, 1983). Outre les cellules de Leydig, peu de travaux concernent les sites de production d'estrogènes dans le testicule humain; toutefois, la capacité du spermatozoïde humain a métaboliser les stéroïdes a été décrite (Gunasegaram et al., Arch Androl, 40, 59, 1998). Ces résultats sont en accord avec leurs données antérieures (Chew et al , Arch Androl, 30, 165, 1993) rapportant des concentrations endogènes faibles mais mesurables de progestérone, testostérone, et estradiol-17β dans les spermatozoïdes.

Un récepteur aux estrogènes de type β (ERβ) a été cloné dans le testicule humain : son affinité pour l'estradiol et les antiestrogènes est très bonne (Mosselman et al, FEBS Lett, 392, 49, 1996). En outre, le groupe de Gustafsson a finement localisé par hybridation in situ cet ERβ notamment dans les spermatides rondes et à un degré moindre dans les spermatocytes pachytènes (Enmark et al, JCEM, 82, 4258, 1997); aucun signal n'a été détecté dans les cellules somatiques. Dans les spermatozoïdes humains un récepteur aux estrogènes vient d'être démontré (Durkee et al., Am J Obste Gynecol, 178, 1288, 1998). Enfin, la présence de récepteur aux estrogènes et à la progestérone a été rapportée dans les cellules des canaux efférents chez l'homme par Ergün et al (Molec Reprod Dev., 47, 448, 1997).

Toutes ces informations m'amènent à évoquer le travail de Cheng et Boettcher (Fert Steril, 32, 566, 1979) montrant que l'ajout d'estradiol à une suspension de spermatozoïdes humains stimule leur mobilité.

La pathologie apporte de précieuses informations quant au rôle des hormones femelles chez le mâle. Une mutation homozygote inactivant le gène de l'aromatase (Carani et al., N Engl J Med, 337, 91, 1997) provoque une stérilité masculine avec 1 million de spermatozoïdes immobiles /ml de sperme. De plus une mutation du gène codant pour le récepteur à l'estradiol (exon 2 avec un codon stop en 157) a été décrite (Smith et al, N Engl J Med, 331, 1056, 1994); l'étude du spermogramme a révélé une numération en spermatozoïdes correcte associée à une viabilité réduite.

Enfin, compte tenu des données publiées sur la baisse de la concentration et la diminution de la qualité des spermatozoïdes humains (Auger et al., N Engl J Med, 332, 281, 1995), les xénoestrogènes ont été évoqués (Toppari et al., Environ. Health Perspect., 104, 741, 1996).

En somme il apparaît extrêmement important d'envisager et d'étudier de manière approfondie, la participation des estrogènes dans les processus de maturation des spermatozoïdes chez l'homme.

Transcription et traduction du récepteur (RE) b des estrogènes dans le tractus génital mâle des souris ER a KO et sauvages.

Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice.

CHERYL S. ROSENFELD, VENKATASESHU K. GANJAM, JULIA A. TAYLOR, XIAOHUI YUAN, JAMES R.STIEHR, MATTHEW P. HARDY AND DENNIS B. LUBAHN

Department of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia 65211, USA.

Endocrinology 139, 6, 2982-2987, 1998.

Il est connu depuis environ 20 ans que les cellules de Sertoli fabriquent de l'oestradiol (E_2) chez le rat impubère sous l'influence de FSH et que les cellules de Leydig prennent le relais chez l'animal pubère sous l'influence de LH. Plus récemment, on a montré que les spermatozoïdes aussi produisent E_2 et que l'activité aromatase décroît tout au long de l'appareil génital ce qui est en faveur d'une action de E_2 au niveau des canaux efférents et de l'épididyme. La situation s'est récemment compliquée par le fait que l'équipe de Gustafsson a mis en évidence un nouveau récepteur de E_2 appelé ER β par comparaison avec l'ancien récepteur identifié dans les années 60 qui porte maintenant le nom de ER α. Pour étudier la fonction de chacun de ces récepteurs, l'équipe de K.S. Korach a réalisé un KO de ER α et a montré que cette situation entraînait des désordres dans le système reproducteur en particulier du fait de la non réabsorption du fluide testiculaire (au niveau des canaux efférents et de la tête de l'épididyme) entraînant chez le rat adulte de plus de 100 jours, une disparition progressive de l'épithelium germinal. ER α a été localisé dans les cellules de Leydig adultes et embryonnaires ainsi que dans le rete testis, les canaux efférents et plus sporadiquement dans l'épididyme.

Le nouveau récepteur β a été localisé dans de nombreux tissus et en particulier dans les cellules de Leydig du testicule foetal et adulte et dans diverses cellules germinales (spermatogonies intermédiaires de type B, spermatocytes pachytènes du stade III au stade XII ainsi que dans les spermatocytes II (stade XIV).

La présente publication utilise un anticorps anti ERβ ainsi que la technique du RT-PCR pour préciser cette localisation.

Une immunolocalisation positive pour ER β a été trouvée dans les cellules de Leydig de souris WT et ER α KO âgées de 110 jours. Dans ces cellules, l'immunomarquage a été retrouvé dans le cytoplasme et les régions nucléaires et périnucléaires de même que dans les spermatides allongées des souris WT mais pas des ER α KO.

Dans les canaux efférents, un marquage modéré a été mis en évidence dans le cytoplasme des cellules épithéliales ciliées et non ciliées ; de même que dans les cellules épithéliales épididymaires chez les deux souches de souris.

L'amplification par RT PCR de ER β dans les testicules et l'épididyme de souris WT et ER α KO a révélé la présence du produit attendu de 230 bp pour l'amorce N-terminale.

Les amorces C-terminales ont donné naissance à la bande 186 bp dans le testicule et l'épididyme des deux souches de souris. Les spermatides allongées présentent un marquage avec l'anticorps ER β N-terminal. Aucune différence qualitative n'a été détectée dans le mRNA ER β ou la protéine chez les souris ER α KO et WT, ce qui suggère que ER β seul ne peut maintenir une reproduction normale.

Il a donc été démontré des différences dans la localisation de ER β et de ER α dans l'appareil reproducteur du rat et de la souris ainsi que dans différents tissus alors qu'elles sont faibles sur le plan qualitatif entre les souris WT et ER α KO. Il reste beaucoup à faire pour comprendre le rôle des deux récepteurs α et β dans le fonctionnement de l'appareil génital masculin des mammifères. (M.DROSDOWSKY)

Variation des Produits Finaux de la Biosynthèse et du Métabolisme des Androgènes au cours de la Différenciation Postnatale des Cellules de Leydig de Rat.

Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differenciation of rat Leydig cells

REN-SHAN GE and MATTEW P. HARDY

Endocrinology 139: 3787-3795, 1998

Depuis plusieurs années, Matthew HARDY du Population Council s'est attaché à l'étude de la fonction leydigienne du testicule en rapport avec l'âge. Dans sa dernière publication, il étudie la production d'androgènes au cours de la différentiation postnatale des cellules de Leydig souches (progenitor), immatures et adultes.

Il montre que la production de testostérone (T) est 4 et 30 fois plus importante dans les cellules immatures et adultes que dans les cellules souches. Cependant, si on mesure les androgènes totaux (AT), la différence est moins grande du fait de la production de dérivés 5α réduits. La stimulation par LH montre une élévation respective de 2, 6 et 6 fois des AT par rapport aux taux de base dans les 3 catégories (souches, immatures et adultes).

Les métabolites réduits sont aussi différents. L'androstérone (AO) est le principal androgène des cellules souches (72% des AT sous LH). Le 3α DIOL est l'androgène majeur dans les cellules immatures (73% des AT) et enfin T est le produit essentiel dans les cellules adultes (74% des AT).

Ces différences sont la conséquence d'une répartition enzymatique différente : le taux de P450 SLC est bas dans les cellules souches et augmente avec la différenciation. Les 3β HSD et P450 e17 atteignent la moitié de leur taux adulte (et immature) chez les cellules souches.

L'activité 17β HSD est très faible dans les cellules souches et augmente dans les cellules immatures puis adultes.

Les auteurs ont aussi mesuré le taux du mRNA des enzymes. Le mRNA de type I de la 5a réductase est abondant dans les cellules adultes et immatures et indétectable dans les cellules adultes. II n'y a pas de mRNA 5α R de type II. En ce qui concerne la 3α (HSD, le type I est présent en particulier dans les cellules souches et immatures.

Ainsi, la production de T par les cellules de Leydig de différents âges, n'est pas seulement en rapport avec les enzymes de biosynthèse, mais aussi avec celles du métabolisme (5α R, 3α HSD.

La mise en évidence par l'équipe de Fernand LABRIE des isotypes d'enzymes stéroïdogènes donne un éclairage encore plus précis sur la localisation et l'orientation des différentes activités enzymatiques.(M.DROSDOWSKY)

GÉNÉTIQUE

Le chromosome Y montre qu'Adam était africain

Y chromosome shows that Adam was an African

ANN GIBBONS,

Science 1997, vol 278 : 804-805

Commentaires : S. Rousseaux et B. Sèle

Au début des temps, il y eut l'Eve mitochondriale-une femme qui vécut en Afrique il y a 100 000 à 200 000 ans, et qui était l'ancêtre de tous les humains vivants.... Les généticiens ont retracé son identité grâce à l'analyse de l'ADN de la mitochondrie transmis exclusivement de mère en fille. Afin de confirmer cette vue sur les origines de l'humanité, les scientifiques ont pendant longtemps recherché l'équivalent génétique d'Eve, 1'» Adam « dont le chromosome Y était transmis à chaque garçon ou homme vivant. Après presque une decennie de recherches, deux équipes différentes ont trouvé le chemin génétique qui mène à Adam, et il se trouve qu'il mène à la même période et au même endroit où Eve avait vécu. I1 montre même que les hommes vivants actuellement dont le chromosome Y ressemble le plus à celui d'Adam font partie de groupes ethniques du Sud Est de 1'Afrique.

En science, contrairement à ce qui est écrit dans 1'Ancien testament, Eve est arrivée avant Adam. En 1987, Stoneking et d'autres chercheurs de 1'Université de Berkeley (Californie) ont trouvé notre ancêtre mitochondriale, après avoir comparé

et classé sur un arbre phylogénétique les variants de l'ADN mitochondrial trouvés dans le monde (Science, 14 Août 1992, p.873). D'après leur théorie, jusqu'alors non confirmée, cette ancêtre aurait vécu en Afrique il y a quelques 100 000 à 200 000 ans.

La manière la plus directe de tester cette hypothèse était d'analyser les variants (ou polymorphismes) de l'ADN du chromosome Y, qui est transmis de père en fils, indépendamment de l'ADN mitochondrial. En classant ces variants et en les plaçant sur un arbre phylogénétique, on pouvait remonter à l'origine de l'homme (mâle humain) comme on avait retracé celle de la femme. Cependant la mise en place des branches de l'arbre du chromosome Y s'est trouvée être un labeur long et difficile, étant donné le petit nombre de polymorphismes connus sur le chromosome Y. Récemment une nouvelle méthode permettant la détection automatisée de différences subtiles (mutations) dans la séquence d'ADN* a été appliquée avec succès à l'étude du chromosome Y. Grâce à cette méthode, le biochimiste Peter Oefner et le biologiste Peter Underhill aidés par l'équipe de l'Université de Stanford ont trouvé 93 nouveaux polymorphismes sur les chromosomes Y d'hommes venant de différentes parties de la planète. Le classement des polymorphismes sur un arbre phylogénétique a mis en évidence un marqueur très ancien, nommé M42. Dans sa forme ancienne A (comportant une Adénine), ce marqueur n'est trouvé actuellement que dans une faible proportion d'hommes, provenant tous d'Afrique. D'autres données montrent qu'il y a 100 000 à 200 000 ans ce marqueur aurait subi une mutation (Adénine remplacée par une Thymine). Les hommes porteurs du marqueur A seraient restés en Afrique alors que certains africains porteur du marqueur T seraient sortis d'Afrique pour se disperser autour du globe. De nos jours la plupart des africains et tous les hommes des autres continents portent le marqueur T.

Une autre équipe, dirigée par le généticien Michael Hammer de l'Université d'Arizona ont étudié les variants d'une autre région non codante du chromosome Y chez 1544 hommes de la planète. Les auteurs ont analysé 10 groupes de variants (ou haplotypes) dont la fréquence est variable dans différentes populations. L'haplotype 1A semble être le plus ancien car il est retrouvé chez le chimpanzé et seulement dans une faible proportion d'hommes provenant des mêmes régions d'Afrique. Ce variant aurait lui aussi subi un changement il y a 150 000 à 200 000 ans chez l'un des descendants d'Adam.

Ces données tendent à confirmer la localisation temporospatiale de l'origine de l'humanité. Ce n'est qu'un début. Les différentes populations se sont mélangées entre elles, notamment au cours de leurs mouvements migratoires. Par exemple d'autres études suggèrent que certains des descendants d'Adam auraient migré en Asie puis seraient revenus en Afrique porteurs d'une mutation sur le Y survenue en Asie. Il reste encore un long chemin à parcourir pour retracer l'histoire génétique de l'humanité.

* Les deux ADN de deux chromosomes Y à comparer sont amplifiés, dénaturés (séparation des deux brins) puis mélangés et ré-hybridés (réassociation des brins). Si les séquences sont parfaitement complémentaires, les molécules obtenues émettent un seul pic détecté en lumière ultraviolette alors que s'il existe une différence de séquence (même portant sur un seul nucléotide), les molécules émettent deux ou plusieurs pics.

EXPLORATION DE LA FERTILITÉ

Intérêt du test post coïtal : essai randomisé

Effectiveness of the postcoital test : randomised controlled trial

S.GUID DEI, F.M.HELMERHORST, K.W.M.BLOEMENKAMP, F.A.M.HULLANTS, D.E.M.MEERPOEL, M.J.N.C.KEIRSE

University Medical Center, Leiden, Netherlands - Flinders University of South Australia, Adelaide,Australia

BMJ, V.317,22 Août 1998, 502-504

Le test post-coïtal est l'un des examens princeps du bilan d'infertilité. Il est utilisé, par l'immense majorité des praticiens, dans le cadre du bilan. Cette étude nous a précisé l'intérêt du Test Post Coïtal (T.P.C.), dans le cadre des examens de routine, pour apprécier la fertilité des couples.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Sur une période de deux ans, les couples consultant pour bilan d'infertilité étaient inclus dans un protocole de bilan comportant (Groupe A), ou ne compor-

tant pas (Groupe B) de T.P.C. Les autres examens complémentaires étaient laissés à l'appréciation des cliniciens. Les traitements de la stérilité étaient classiques :

- expectative,
- insémination intra-utérine,
- Fécondation *In Vitro*.

RÉSULTATS

444 couples ont été inclus dans ce travail. 227 dans le groupe avec Test T.P.C. et 217 dans le groupe contrôle. Le suivi de ces couples a été complet pendant deux ans. Le T.P.C. a été réalisé pour 146 des 227 couples du Groupe A (64%). Les raisons de l'absence de T.P.C. dans ce groupe ont été :

- 57 grossesses survenues en cours de bilan,
- 9 anovulations,
- 9 occlusions tubaires bilatérales,
- 6 azoospermies.

1 % des couples du Groupe B ont eu un T.P.C.

Le Tableau ci-dessous nous montre le type de prise en charge des couples dans les deux groupes. 22% du Groupe A ont été traités par insémination intra-utérine, contre 17% du Groupe B. 10% des couples du Groupe A et 6% du Groupe B ont été traités par Fécondation *In Vitro*.

Au total, 54% des patientes du premier groupe et 41% du deuxième groupe ont été prises en charge pour un traitement.

Le taux cumulatif de grossesses à 24 mois était de 48 % contre 49 % dans les deux groupes. Les couples du Groupe A, ayant eu un T.P.C., avaient un taux de grossesse significativement plus bas que le Groupe Contrôle (36% versus 49%). 30 patientes avaient un T.P.C. considéré comme normal, et 31% ont obtenu une grossesse contre 34% des 67 qui avaient un test négatif.

DISCUSSION

Les patientes du Groupe A ont eu plus d'investigations au cours de leur bilan d'infertilité et leur prise en charge a été plus importante. Cependant, le taux de grossesse est identique au Groupe Contrôle. Le test après rapport semble conduire à une prise en charge plus agressive, sans effet bénéfique sur le taux de grossesse. Ce test est considéré comme un mauvais facteur prédictif de la fertilité d'un couple.

Commentaires (B. Salle)

La prescription d'un examen para-clinique impose un minimum de réflexion au prescripteur. Pour des raisons cliniques mais aussi économiques, la prescription d'un examen para-clinique devrait être précédé de ce type de réflexion. A la lecture de cet article, il semble difficile de justifier de façon systématique la prescription d'un Test Après Rapport. Ceci va, en effet, dans le sens de l'évolution de la médecine où chaque examen devrait être discuté au cas par cas, afin d'en tirer le maximum d'information.

Nombre (pourcentage) de traitements donnés au groupe d'intervention et au groupe de contrôle

Traitement	Groupe d'Intervention (n=227)	Groupe de contrôle (n=217)
Insémination Intra-Utérine	49 (22)	36 (17)
Irrigation au bicarbonate	3 (1)	1 (0.5)
Fécondation in vitro	22 (10)	14 (6)
Insémination avec donneur	1 (0.4)	1 (0.5)
Induction d'ovulation	42 (19)	35 (16)
Autre traitement	5 (2)	2 (1)
Total	122 (54)	89 (41)*

* $\chi 2$ test=7.21 (df=1; P<0.05).

ASSISTANCE MÉDICALE A LA PROCRÉATION

Naissance de filles normales après tri des spermatozoïdes à l'aide de la méthode de MicroSort® et insémination intra-utérine, fécondation in vitro ou microinjection intra-ovocytaire.

Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insémination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection.

FUGGER E.F., BLACK S.H., HEYVANFAR K., SCHULMAN J.D.

Genetics & IVF institute, Fairfax, VA, and Department of Obstetrics and Gynecology, and Department of Human Genetics, Medical College of Virginia, Richmond, VA, USA.

Human Reproduction, 1998, 13, 2367-2370

L'article décrit l'isolement par cytométrie de flux des spermatozoïdes porteurs de chromosome X après marquage des spermatozoïdes par le fluorochrome bisbenzimide (Hoechst 33342). L'efficacité de l'enrichissement en spermatozoïdes porteurs de chromosome X a été étudiée par "Fluorescence In Situ Hybridation" (FISH) : 85% de spermatozoïdes isolés sont porteurs d'un chromosome X.

Ces spermatozoïdes ont été utilisés dans un but de procréation pour des couples souhaitant une fille, principalement (90,5% des couples de l'étude) pour équilibrer le nombre de garçons et de filles dans leur famille. La méthode de procréation assistée a été soit la FIV ou l'ICSI : 27 couples, 33 cycles, 7 grossesses cliniques (7/33=21,2 % de grossesses cliniques par cycle), soit l'insémination intra-utérine : 92 couples, 208 cycles, 22 grossesses cliniques (22/208=10,6% de grossesses cliniques par cycle). Ainsi, au total, 29 grossesses cliniques ont été obtenues : 11 enfants nés / 9 femmes, 7 fausses couches, 1 GEU, 12 grossesses étaient en cours à la rédaction de l'article.

Parmi les 14 grossesses pour lesquelles le sexe des enfants était déterminé, 13 grossesses ne comportent que des filles soit 92,9% de grossesses ne comportant que des filles. Parmi les 17 enfants (3 grossesses gémellaires) dont le sexe était déterminé, 15 étaient des filles, ainsi 88,2% des enfants sont des filles. (On conclut de ces chiffres qu'une grossesse gémellaire comportait 2 garçons !)

CommentaireS (H. Lejeune)

Il s'agit de la première méthode de tri des spermatozoïdes qui soit convaincante en ce qui concerne son efficacité pour modifier le sex-ratio dans l'espèce humaine. Elle a l'avantage d'être applicable en insémination intra-utérine dans la majorité des cas.

On s'interroge, d'une part, sur les dangers éventuels pour le conceptus de l'utilisation d'un fluorochrome se fixant sur l'ADN et de l'irradiation UV des spermatozoïdes qui seront utilisés pour la procréation. Les arguments avancés en faveur de l'innocuité sont les suivants : le fluorochrome utilisé est qualifié de "vital", il se lie sur l'ADN de manière non-covalente ; il n'a entraîné des mutations du gène de la β-globine qu'à des concentrations nettement plus élevées que celles utilisées pour le tri en cytométrie de flux ; plusieurs centaines d'animaux, de diverses espèces, sont nés après utilisation de ce fluorochrome, ils ont été considérés normaux. L'appréciation du risque réel dans l'espèce humaine n'est toutefois pas possible dans cette étude, l'interprétation du taux de fausses couches (7/29=24%) étant impossible sans groupe témoin. Dans un article précédent, les auteurs avaient montré une efficacité moins bonne de sélection des spermatozoïdes Y (67,4%) que des spermatozoïdes X (86,8%). On notait que, après tri, le taux de disomie pour les gonosomes n'est pas significativement différent par rapport aux échantillons non triés.

Par ailleurs, on se pose des questions éthiques sur l'utilisation de cette procédure de sélection du sexe. Si la justification avancée dans l'introduction et la discussion de l'article, pour le développement d'une telle méthode est d'éviter la survenue des maladies génétiques liées à l'X chez les garçons, on note que dans ce travail, les couples ont été inclus en très grande majorité pour leur désir d'avoir une fille parce qu'ils avaient déjà plusieurs garçons ("family balancing"). Dans les indications génétiques de maladie liée à l'X, les auteurs proposent d'utiliser la méthode pour augmenter les chances d'obtenir des embryons masculins avant diagnostic pré-implantatoire du sexe par FISH sur un blastomère.

Développement de souris normales à partir d'ovocytes fécondés par des spermatozoïdes lyophilisés

Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa

T.WAKAYAMA and R.YANAGIMACHI

Department of Anatomy and Reproductive Biology, University of Hawaii, Honolulu - Department of Veterinary Anatomy, University of Tokyo.

Nature biotechnology, vol. 16, juillet 1998, 639-641

La cryoconservation du sperme, dans l'azote liquide est, à long terme, coûteuse en raison de la nécessité de remplacer constamment l'azote évaporé. Pour cette raison, dès 1949, plusieurs tentatives ont été effectuées pour conserver du sperme déshydraté en vue d'insémination artificielle ou Fécondation *in vitro*. Malgré les succès obtenus dans la conservation des virus, bactéries, levures et spores de champignons, il n'a jamais été possible d'obtenir des résultats convaincants avec des spermatozoïdes.

MÉTHODES

Les spermatozoïdes ont été prélevés dans la portion caudale des épididymes et mis en suspension dans 1ml soit de CZB sans EDTA, soit de DMEM (Sigma), additionnés de 10% de sérum bovin fœtal. Après incubation pendant 30 minutes à 37°5, les 0,3-0,5ml supérieurs de la suspension ont été retirés. Environ 90% des spermatozoïdes étaient activement mobiles (3 à 10 millions/ml). Un aliquot (100ml) a été placé dans une ampoule de 2ml immédiatement plongée dans l'azote liquide. Dix minutes après, les ampoules ont été placées dans un appareil à déshydratation réfrigéré (-50°C) pendant 12 heures. Après remplissage des ampoules par de l'argon, >99% du gaz a été éliminé par une pompe à vide et les ampoules ont été scellées, enveloppées dans un feuille d'aluminium et stockées à la température du laboratoire (environ 25°C) ou à 4°C.

Après ouverture de l'ampoule, la réhydratation est effectuée par addition de 100ml d'eau distillée. Puis 5ml de suspension de spermatozoïdes sont mélangés avec 50ml de Hepes-CZB contenant 12ml de polyvinyl-pyrrolidone. Les spermatozoïdes sont injectés dans des ovocytes dans l'heure qui suit la réhydratation.

Les ICSI sont réalisées par la procédure maintenant classique, après séparation de la tête et du flagelle. Les transferts de morulas ou de blastocystes sont effectués chez des femelles étrangères après 4 jours de culture.

RÉSULTATS

La plupart des œufs injectés ont été fécondés et ont formé des morulas ou des blastocystes. Environ 30% des embryons transférés sont à l'origine de souriceaux normaux qui se sont ensuite développés normalement et se sont révélés normalement fertiles.

La durée maximun de stockage des spermatozoïdes lyophylisés a été de 3 mois à 4°C.

Quelques ampoules ont été utilisées avec succès après un voyage de 3 semaines (Hawaï-Japon) avec des variations de température 5 à 30°C.

DISCUSSION

Il n'est pas nécessaire que les spermatozoïdes soient vivants au sens conventionnel du terme pour être à l'origine d'un développement embryonnaire normal. Dans l'espèce humaine l'ICSI est réalisée avec une tête de spermatozoïde dans laquelle la réaction acrosomique a été produite. Nous démontrons ici que la déshydratation du spermatozoïde, qui entraîne de nombreux dégâts cellulaires, respecte l'organisation des chromosomes au point de permettre une fécondation normale après ICSI. Il semble également que les molécules activatrices de l'ovocyte résistent à la déshydratation.

Nos procédures de déshydratation et de réhydratation pourront sans doute être améliorées.

La première application envisagée est le maintien dans des conditions économiques d'un grand nombre de souches de souris transgéniques.

Commentaires (J.C.Czyba)

La signature de Yamagimachi et le nom de la revue garantissent le sérieux de l'article...Voici donc un nouveau pas franchi. La participation du mâle au processus de la procréation peut se réduire à une pincée de poudre que l'on peut conserver sur une étagère.

Prudemment, les auteurs n'évoquent à aucun moment la possibilité de l'application de la technique à l'espèce humaine et se contentent d'en souligner le grand intérêt économique pour la conservation des souches de souris transgéniques. Cependant, il est amusant de lire, à la fin de l'article, que des remerciements sont adressés au National Institute of Child Health and Human Development qui a financé la recherche.

Bien que les auteurs soulignent la nécessité d'améliorer leur technique il est particulièrement impressionnant de constater que les méthodes mises en œuvre sont relativement simples et permettent d'obtenir de très bons résultats. Qui franchira le pas suivant en lyophilisant des spermatozoïdes humains pour réaliser des ICSI ? La loi française qui interdit l'expérimentation sur l'embryon humain n'interdit pas de dessécher les spermatozoïdes aux titulaires de l'agrément pour " recueil et traitement de sperme en vue d'AMP ".

L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes va-t-elle entraîner une augmentation de la fréquence des micro-délétions dans la région AZFc du chromosome Y, dans les générations futures ?

Does intracytoplasmic sperm injection lead to a rise in the frequency of micro-deletions in the AZFc region of the Y chromosome in future generations ?

J.A.M. KREMER, J.H.A.M. TUERLINGS, G. BORM ET AL.

Hôpital Universitaire de Nijmegen, Pays Bas.

Human Reproduction, 13, 2808-2811, 1998.

L'ICSI permet d'obtenir des grossesses dans des couples où l'homme a un nombre très faible de spermatozoïdes. Des micro-délétions dans la région AZFc du chromosome Y ont été décrites récemment, dans les situations d'oligozoospermie et d'azoospermie. Ces mutations de novo constituent une situation unique : elles sont liées à l'Y et donc limitées à la population masculine ; elles étaient " génétiquement léthales " avant l'ère de l'ICSI, et sont désormais transmissibles.

Un modèle mathématique a été développé pour tenter de répondre à la question posée dans le titre de l'article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le modèle a été établi à l'aide de 2 variables : la fréquence relative des hommes porteurs de la micro-délétion *(f)*, et la fréquence de mutation spontanée *(μ)*.

f = (nombre d'enfants par homme porteur de la micro-délétion) / (nombre d'enfants par homme dans la population générale)

μ = fréquence des hommes présentant une micro-délétion apparue de novo

Avec ce modèle, la fréquence q de l'allèle mutant, au bout d'un nombre infini de générations, est donnée par la formule suivante :

$$q(\infty) = \mu / (\mu+(1-f))$$

- **L'estimation de *f*** a été effectuée en envisageant plusieurs valeurs pour chacune des variables suivantes :

- pourcentage d'hommes avec une micro-délétion qui choisissent l'ICSI : 50% - 75% - 100%
- taux cumulatif des naissances après ICSI : 45% - 60% - 75%
- taux de grossesses multiples (jumeaux) : 10% - 20% - 30%
- pourcentage de couples qui voudront d'autres enfants après un 1er succès : 60% - 80% - 100% pour un 2ème enfant ; 0% - 10% - 20% pour un 3ème enfant.

- **L'estimation de** μ a été effectuée en multipliant la fréquence de micro-délétions dans les oligozoospermies sévères (2 à 10%) par la prévalence de l'oligozoospermie dans la population générale (elle-même estimée par le produit de la prévalence de l'oligospermie dans les couples infertiles : 3%, par la prévalence de l'infertilité : 10 à 15%). Au total, la fréquence estimée de mutation spontanée varie entre 0,6 et 4,5 X 10^{-4} (autour de 1 / 10000). 3 valeurs ont été testées dans le modèle : 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5}.

RÉSULTATS

La fréquence des micro-délétions (q) dans les 10 générations suivantes a été estimée en considérant respectivement 3 valeurs pour f (0,2 ; 0,5 ; 1) et 3 valeurs pour μ (10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}), soit 9 scénarios possibles. La fréquence de q augmente à chaque génération, jusqu'à un plateau, qui correspond à l'atteinte d'un équilibre entre l'apparition de nouvelles mutations et le processus de sélection. Le moment où cet équilibre est atteint dépend de f : plus la valeur de f est élevée, plus le plateau est atteint tardivement.

Avec f = 0,2 et $\mu = 10^{-4}$, le plateau est atteint en 2

générations et $q = 1{,}2 \times 10^{-4}$ (*l'augmentation est négligeable*).

Avec $f = 0{,}5$ et $\mu = 10^{-4}$, le plateau est atteint en 5 générations et $q = 2 \times 10^{-4}$ (*fréquence doublée*).

Avec $f = 0{,}1$ et $\mu = 10^{-4}$, le plateau n'est toujours pas atteint en 10 générations (*la fréquence est multipliée par 10 au bout de 9 générations*).

La valeur de μ a peu d'influence sur la forme des courbes et le moment d'apparition du plateau.

En extrapolant le nombre des générations à l'infini, la fréquence q est seulement doublée si $f = 0{,}5$, alors que si f tend vers 1, q tend également vers 1 (100% des hommes seraient porteurs de la délétion !).

DISCUSSION

Le modèle présenté montre que l'élévation de q reste limitée tant que f reste également limité (X 2 avec l'estimation " moyenne " : $f = 0{,}5$). En revanche, si f tend vers 1, le mécanisme de sélection disparaît et tous les hommes finiront par être porteurs de la délétion au bout d'un grand nombre de générations toutefois. En d'autres termes, tant que l'ICSI n'est pas aussi efficace que la reproduction naturelle, l'impact sera mineur.

Le modèle a quelques limites : il suppose que les valeurs de f et μ demeurent constantes dans toutes les générations, ce qui ne sera certainement pas le cas pour f, qui dépend des " performances " de l'ICSI et qui devrait s'élever dans le futur. De plus, il existe une vraie incertitude concernant le pourcentage d'hommes porteurs de la délétion qui choisissent l'ICSI, ainsi que la fréquence de la mutation spontanée dans la population générale. Enfin, l'étude s'est limitée aux micro-délétions dans la région AZFc du chromosome Y, qui ne sont responsables que d'une petite fraction des infertilités masculines, même si on ne considère que celles d'origine génétique.

Commentaires (J.F. Guerin)

Cette étude répond aux attentes et aux inquiétudes de beaucoup d'andrologues, face à cette situation jusqu'alors inédite : la possibilité de transmettre, grâce à nos techniques d'assistance médicale à la procréation, une mutation jusqu'alors " génétiquement léthale ". La question est bien plus intéressante que celle ayant trait à l'absence de sélection " naturelle " du spermatozoïde fécondant dans la technique d'ICSI, qui effrayait certains il y a encore peu de temps. Les auteurs de l'étude ont eu le mérite de reconnaître eux-mêmes les limites de leur modèle, dues à certaines imprécisions et à des facteurs mal contrôlés ; en revanche, ils ont montré sans ambiguïté que la fréquence de mutations dans les générations futures dépendait étroitement de la fréquence relative des hommes porteurs de la micro-délétion. Comme il est peu vraisemblable qu'on assiste à une élévation du nombre moyen d'enfants par homme " sain " dans la population générale, il reste à espérer ... que l'ICSI ne deviendra pas trop performante ! Sera-t-on amené, au motif de maintenir la fréquence de la micro-délétion dans des valeurs acceptables, à n'autoriser par exemple qu'un seul enfant à ces hommes porteurs ? On naviguerait alors en plein eugénisme, ce qui ne constituerait pas le moindre des paradoxes se rapportant à cette technique de l'ICSI.

La microscopie électronique dans l'estimation de la viabilité des spermatozoïdes cryoconservés.

Electron microscopy in the assessment of cryopreserved spermatozoa viability.

H RODRIGUEZ-MARTINEZ et
H HEKWALL

Département d'Anatomie et d'Histologie, Centre de Biologie de la Reproduction, Université Suédoise des Sciences de l'Agriculture, Uppsala, Suède.

European Microscopy and Analysis, May 1998
25-27

INTRODUCTION

Les spermatozoïdes sont essentiellement des cellules cataboliques dont le rôle est la délivrance du message paternel, contenu dans le matériel génomique hautement condensé, pendant une courte période après avoir été déposés chez la femme. Pour jouer ce rôle de 'transporteur de message', les spermatozoïdes ont une morphologie bien définie et une série d'organites spécialement différenciés afin d'aboutir à la fécondation de l'ovocyte.

Les variations thermiques (e.g. durant le refroidissement, la congélation et le réchauffement) provo-

quent des modifications de composition et de structure dans de nombreux domaines de la membrane plasmique et de ce fait détériorent leur fonction. Par exemple, les procédures de lavage, refroidissement et cryoconservation du sperme destiné à l'insémination artificielle, qui semblent mimer d'une certaine manière le processus de capacitation dans le sens où la membrane est dépossédée de protéines d'enveloppe spécifiques attachées durant l'éjaculation.

De plus, la mobilisation des protéines structurales à l'intérieur de la membrane impose des modifications dans l'arrangement des lipides, avec une tendance de celles-ci à perdre leur parallélisme et à fusionner avec les membranes intracellulaires avoisinantes. La stabilité de l'organisation lipidique dans la membrane spermatique est une condition inhérente pour le maintien des fonctions spermatiques et étant donné que quelques modifications peuvent survenir durant la cryoconservation, les spermatozoïdes déposés chez la femme durant l'insémination artificielle possèdent une vie 'fertile' réduite. Par ailleurs, la congélation et le réchauffement affectent défavorablement les autres membranes dans la cellule, c'est-à-dire celles des mitochondries et de l'acrosome, en plus des structures de l'axonème et même de la chromatine.

La microscopie électronique des spermatozoïdes congelés ou fixés chimiquement fournit des détails des spermatozoïdes éjaculés et cryoconservés : les détails de la surface spermatique peuvent être observés avec un microscope électronique à balayage (SEM) alors que les différents compartiments cellulaires peuvent être observés avec un microscope électronique à transmission (TEM). La présente revue expose brièvement les méthodes disponibles en microscopie électronique afin d'évaluer les modifications morphologiques et chimiques qu'imposent la congélation et la décongélation des spermatozoïdes des animaux domestiques et peuvent affecter leur viabilité, leur potentiel et leur pouvoir fécondant. Une attention particulière sera portée au spermatozoïde de porc, qui a été le modèle pour cette étude.

METHODES

La plupart des méthodes de microscopie électronique décrites dans cet article sont des méthodes de routine, et ainsi disponibles dans plusieurs laboratoires d'ultrastructure. Les études en transmission ont été effectuées sur un microscope Philips CM10 ou Philips TEM 420, ce dernier est alors équipé avec un EDS et un analyseur d'images (LinkAN 10000 Digipad). Les coupes ont été réalisées avec une lame diamant sur un ultramicrotome de Reichter. Les études en balayage ont été faites avec un Jeol SEM 6320F équipé avec un EDS Isis 300.

RESULTATS

Estimation des dégâts membranaires par TEM ou SEM sur des échantillons de sperme fixés chimiquement.

La congélation et la décongélation causent des dommages majeurs au spermatozoïde qui peuvent être mis en évidence par une étude avec un TEM ou un SEM des échantillons fixés avec du glutaraldéhyde afin d'estimer les ruptures du plasmalemme. Les domaines membranaires les plus souvent endommagés sont situés au col et dans la région supra-acrosomale, sous la forme d'une déshydratation survenant lors du refroidissement et de la lente congélation et des ballonnements du plasmalemme sont habituellement observés au cours de la réhydratation de la décongélation.

Immunocytochimie du spermatozoïde en utilisant le TEM et le SEM.

Une méthodologie supplémentaire afin de localiser et d'étudier la distribution des composés chimiques spermatiques au niveau ultrastructural est l'utilisation de l'immunocytochimie avec un marquage à l'or colloïdal, avec ou sans intensification du marquage à l'argent. Un exemple d'utilisation est la localisation des protamines nucléaires sur des coupes ultra-fines, mises en évidence avec des anticorps couplés à l'or colloïdal et étudiés en TEM.

La cryo-microscopie électronique, la valeur des échantillons non contaminés.

La fixation chimique avec des fixateurs de la famille des aldéhydes, bien qu'ils préservent les détails ultra-structuraux, possède l'inconvénient d'ajouter des composés chimiques non présents dans l'échantillon de tissu original et d'induire des artefacts par les liaisons croisées entre les protéines présentes dans le tissu. La cryo-fixation, c'est-à-dire la fixation par congélation rapide, par immersion dans du propane liquide ou par application contre un miroir métallique poli intensément froid, permet la préservation des structures sub-cellulaires dans leur état d'hydratation naturelle, ceci est dû au changement de phase ultra-rapide du contenu aqueux. Cependant, un problème important est que le traitement pour le TEM comprend la suppression de l'eau et sa substitution par d'autres solvants. Cet inconvénient peut être transformé en un outil utile par les procédures de cryosubstitution et l'enrobement dans du plastique. Les cristaux de glace, qu'ils soient globulaires ou cubiques, peuvent être visualisés comme des ombres (enrobement dans le

plastique) sur les coupes de TEM, et leur position intra ou extra-cellulaire déterminée et même quantifiée en utilisant la granulométrie spermatique. Ces mesures granulométriques nous ont permis d'estimer la qualité de la déshydratation d'échantillons de sperme de porcs sous différentes vitesses de congélation et d'évaluer l'utilisation de différents conteneurs avec des propriétés cryobiologiques particulières.

Le cryo-SEM : observation in situ des spermatozoïdes congelés.

L'utilisation d'unités de cryotransfert en microscopie électronique a rendu possible l'observation d'échantillons pleinement hydratés dans un état congelé. Le cryo-SEM nous a permis pour la première fois d'analyser l'ultrastructure des spermatozoïdes de porc dans un état profondément congelé (< -120°C), sans l'introduction d'artefacts dûs aux produits chimiques ou aux changements de température durant la fixation ou le traitement. Une comparaison préliminaire des méthodes utilisées actuellement a montré que la fixation chimique et la cryosubstitution pour l'EM créent de subtils artefacts qui peuvent partiellement masquer les effets délétères de la cryoconservation.

CONCLUSION

Dans cet article, nous avons revu les méthodes d'EM qui fournissent une batterie de techniques utiles à l'examen des changements subtils dans la composition élémentaire, dans la distribution des antigènes, le contenu en eau libre et les dommages du plasmalemme chez le spermatozoïde. D'autres développements dans le cryo-SEM devront permettre la détermination d'autres changements au niveau du plasmalemme où les modifications les plus critiques surviennent, ceux-ci sont causés durant le traitement de la cryoconservation, ils peuvent réduire le pouvoir fécondant du spermatozoïde.

Commentaires (M Benchaib)

La microscopie électronique est un outil puissant pour l'étude ultrastructurale des cellules. Les auteurs soulignent bien la différence existant entre le TEM et le SEM, et comment utiliser les inconvénients du TEM pour les transformer en paramètres exploitables par le chercheur. L'apport du Cryo-SEM est intéressant il permet d'appréhender l'ultrastructure de la cellule au plus proche du vivant. Et ainsi, dans le cas de spermatozoïdes, de mettre en évidence les effets délétères de la congélation sur la membrane. Le pouvoir fécondant du spermatozoïde étant essentiellement d'origine membranaire, il semble donc licite de penser qu'une altération membranaire peut être à l'origine d'une diminution de la fécondance d'une population de spermatozoïdes.

D'autres techniques de visualisation peuvent aussi être utilisées afin de déterminer l'impact de la congélation sur la vitalité du spermatozoïde. Par exemple l'utilisation de colorants vitaux : l'Iodure de Propidium (fluorescence rouge) ne pénètre que dans les cellules dont la membrane a été lésée, alors que l'Hoescht (fluorescence bleue) pénètre dans les cellules vivantes. Ces deux fluorochromes sont alors observés avec un microscope à épifluorescence équipé d'un double filtre. De nombreux fournisseurs proposent des kits basés sur la pénétration préférentielle des fluorochromes afin d'estimer la vitalité d'une population spermatique. Dans ce cas il est vrai que l'information apportée sur l'intégrité membranaire est moins précise que celle fournie par la microscopie électronique.

Une autre manière d'appréhender la structure membranaire est l'utilisation du microscope confocal, en effet celui-ci permet la réalisation de coupes sériées optiques à l'intérieur d'une cellule. Il est nécessaire de posséder des fluorochromes permettant de visualiser la membrane, ou des anticorps couplés à des fluorochromes, afin d'obtenir une image. Les images bien que moins précises que celles obtenues en microscopie électronique fournissent d'autres types d'information : la possibilité d'une reconstruction en trois dimensions afin de mettre en évidence des zones particulières, la réalisation d'un double ou d'un triple marquage afin de mettre en évidence des relations entre différents organites à l'intérieur du spermatozoïde (par exemple coloration de la membrane, du noyau et des mitochondries), le tout assorti d'une reconstruction.

Il existe toute une gamme d'outils microscopiques qui permettent d'aborder la structure membranaire à des degrés différents, et chacun apporte des informations complémentaires. Cependant, il paraît actuellement difficile de pouvoir exploiter ces types de technologie (microscopie électronique ou confocale) en routine hospitalière. Les temps de préparation et de visualisation sont longs et ne permettent pas l'obtention de résultats rapides.