Andrologie (1999), 9, n° 3, 449-458

Apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé

R. LEVY

Laboratoire de Biologie de la reproduction, Sce du Pr J L LAURENT, CHU HOPITAL NORD, SAINT ETIENNE

RESUME

La mort cellulaire programmée consiste en une élimination active et régulée de cellules bien identifiées pendant l'embryogenèse et la vie adulte. L'apoptose est une forme particulière de mort cellulaire programmée avec des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques. L'un des buts de la mort cellulaire programmée est d'éliminer les cellules anormales ou superflues afin de maintenir l'homéostasie au sein des tissus. L'épithélium séminifère en renouvellement rapide est une cible de choix pour l'apoptose qui explique le faible rendement de la spermatogenèse et les "générations manquantes ". L'apoptose se manifeste ainsi lors du déclenchement de la spermatogenèse, à la puberté, puis intervient chez l'adulte en régulant et contrôlant la spermatogenèse normale. Un nombre anormalement élevé de cellules germinales apoptotiques peut être observé en cas de spermatogenèse anormale : cryptorchidie, arrêts de maturation, hypospermatogenèse.

La détection de l'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés peut se faire en microscopie électronique, mais la fragmentation de l'ADN déterminée après marquage de type TUNEL demeure la technique de référence la plus utilisée. Quelle est l'origine de cette fragmentation de l'ADN ? Quelles peuvent être les conséquences de l'utilisation d'un spermatozoïde à ADN fragmenté en ICSI ? Quel est l'intérêt de quantifier le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté en AMP ? Nous discuterons ces différents points et proposerons l'analyse d'autres marqueurs d'apoptose dans le sperme éjaculé.

Mots clés : *Apoptose, spermatogenèse, spermatozoïde, fragmentation de l'ADN*

La compréhension des processus de mort cellulaire dans les systèmes en développement s'est considérablement modifiée durant la dernière décennie. On ne parle plus de phénomènes passifs dégénératifs ou de réponse à une agression, mais d'un mécanisme complexe, actif et régulé. A cet égard , la mort cellulaire programmée est comparable à la prolifération ou à la différenciation cellulaire. La question n'est plus désormais de savoir quelle est la cause de la prolifération cellulaire, mais de déterminer les raisons de la persistance (de la non disparition) de certaines cellules.

Jusqu'à ces dix dernières années, le " suicide " cellulaire, mieux connu sous le terme de mort cellulaire programmée ou apoptose, n'avait guère attiré l'attention des chercheurs. C'est aujourd'hui un sujet à la mode, comme le montrent les milliers de publications dans des domaines aussi variés que l'immunologie, la virologie, l'oncologie, la neurologie, la biologie du développement et de la reproduction.

L'épithélium séminifère est constitué d'associations de 3 types de cellules germinales décrites au cours de la spermatogenèse : les spermatogonies (qui se multiplient par mitoses, durée de 27 jours), les spermatocytes I et II (divisions méiotiques de 23 et 1 jours) et les spermatides (spermiogénèse, durée de 23 jours) et des cellules de Sertoli (cellules nourricières). L'évolution théorique de la lignée germinale normale devrait donc permettre l'obtention, à partir d'une spermatogonie Ad de 16 spermatozoïdes au bout de 74 jours. Le rendement réel de la spermatogenèse normale est médiocre, avec bien moins de 16 spermatozoïdes formés à partir d'une sperma-

togonie [25]. La cause de ces "générations manquantes" a longtemps été attribuée à un phénomène de dégénérescence cellulaire [10]. En fait, il s'agit d'une manifestation aujourd'hui reconnue du processus de mort cellulaire programmée ou apoptose [13]. La question de l'existence et du rôle de ce même processus dans le sperme éjaculé reste cependant encore débattue.

I. LE PROCESSUS APOPTOTIQUE

1.Définitions

Le terme de mort cellulaire programmée (MCP) ou mort cellulaire naturelle apparut dans les années soixante pour décrire la dégénérescence séquentielle des muscles inter segmentaires du ver à soie. L'exemple classiquement cité concerne l'élimination active à des moments précis de l'embryogenèse de cellules parfaitement bien identifiées de *C. elegans,* ce type de mort cellulaire résultant de l'activation de gènes de la mort cellulaire.

Le terme d'apoptose, d'origine grecque, fut introduit par Kerr en 1972 [12] en référence à la chute des feuilles en automne, faisant allusion à un phénomène programmé dans le temps. Kerr énonça les caractéristiques morphologiques de cellules en dégénérescence en l'absence de toute pathologie : lobulation de l'enveloppe nucléaire, condensation et dégradation de la chromatine, fragmentation de l'ADN puis fragmentation de la cellule et formation de vésicules membranaires (blebs) qui se détachent et sont alors appelées corps apoptotiques [33]. Au cours de ces différents stades, la membrane cellulaire demeure intacte. Les corps apoptotiques formés sont rapidement phagocytés.

Bien que le phénomène d'apoptose soit décrit dans des tissus en développement et des tissus adultes, les deux termes ne sont pas synonymes. La MCP implique une élimination active et régulée des cellules pendant l'embryogenèse et la vie adulte. L'apoptose est une forme particulière de MCP avec des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques qui permettent de la distinguer de la nécrose (tableaux 1 et 2).

2. Les trois phases du processus apoptotique.

On peut en effet distinguer trois phases au cours du processus apoptotique : une phase d'induction, une phase d'exécution du signal et

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.

APOPTOSE ***Mort cellulaire programmée*** = suicide cellulaire (physiologique)	**NECROSE** ***Mort cellulaire accidentelle*** = agression (pathologique)
Diminution du volume cellulaire de 30%	Gonflement puis lyse de la cellule
Intégrité de la membrane plasmatique longtemps préservée	Perte rapide de l'intégrité membranaire
Condensation et marginalisation de la chromatine	Compaction légère de la chromatine
Corps apoptotiques	Pas de corps apoptotiques
Absence de réaction inflammatoire	Réaction inflammatoire importante
Phagocytose par cellules adjacentes	-
Affecte une cellule unique	Affecte des groupes de cellules voisines
Organites intacts initialement puis condensation	Destruction des mitochondries et lysosomes, pycnose
Perte de contact entre cellules et avec la matrice extra cellulaire	-

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques de l'apoptose et de la nécrose.

APOPTOSE	NECROSE
Induction par des stimuli physiologiques	Induction par stimuli non physiologiques
Processus régulé actif	Processus non régulé, passif
Consommateur d'énergie	Ne nécessite pas d'énergie
Activité transcriptionnelle	Pas d'activité transcriptionnelle
Activité traductionnelle	Pas d'activité traductionnelle
Fragmentation oligonucléosomique ADN (200 paires de bases)	Fragmentation aléatoire de l'ADN

une phase de dégradation. La complexité de la phase d'induction est liée à la diversité des signaux inducteurs (dATP, déplétion en facteurs de croissance, glucocorticoïdes, p53, TNFa, ionophores calciques, irradiation UV, agonistes du récepteur APO-1/Fas entre autres) et de leurs modes d'action.

A la phase d'induction, de durée extrêmement variable, succède la phase d'exécution. Il s'agit d'une étape effectrice commune dont la mitochondrie est l'élément central. En effet, le fait qu'une cellule apparemment saine puisse déclencher sa propre mort évoque l'existence d'une véritable " armoire à poisons " capables d'être activés rapidement. C'est dans l'espace compris entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie que sont stockés dans la cellule en vie les pro-facteurs de mort cellulaire que sont les 3 procaspases et le facteur d'induction de l'apoptose AIF à l'état latent. L'induction du signal apoptotique provoque une diminution du potentiel transmembranaire avec l'ouverture de mégapores et libération de ces différents facteurs. Les caspases passent dans le cytoplasme où elles exercent leur action protéolytique. Le cytochrome c passe dans le cytoplasme où il agit comme cofacteur des caspases. L'AIF passe dans le noyau et induit une fragmentation internucléosomique caractéristique de l'ADN [30]. Les radicaux libres, et les ions calcium participent également à cette phase d'exécution en amplifiant le signal. Ce signal peut être inhibé par les protéines de la famille Bcl-2 ancrées dans la membrane externe des mitochondries. L'activation de la famille des caspases, protéases à cystéine et effecteur principal, ultime, et irréversible déclenche le clivage protéolytique de la PARP, des lamines nucléaires, de l'actine, de la topoisomérase I, de la protéine kinase dépendante de l'ADN entre autres.

Le processus apoptotique s'achève par une phase de dégradation avec fragmentation de la cellule qui a perdu ses connexions intercellulaires en corps apoptotiques puis phagocytose de ces éléments par des cellules compétentes voisines. L'aptitude des cellules à digérer les corps apoptotiques est un phénomène complexe : l'expression par les macrophages d'une glycoprotéine ABC1 (ATP binding cassette) semble être indispensable à cette phagocytose. D'autre part, des modifications à la surface cellulaire accompagnent l'apoptose, permettant la reconnaissance par les macrophages des corps apoptotiques : clivage des acides sialiques terminaux et exposition de saccharides sub terminaux [28], translocation des résidus de phosphatidylserine (PS) depuis la face interne de la membrane plasmique à la surface externe de la cellule en apoptose [6].

3. Contrôle génétique et contrôle social.

Si les protéines effectrices de l'apoptose sont présentes à l'état inactif dans les cellules vivantes sous la forme d'une " armoire à poisons ", leur potentiel " tueur " doit être annihilé dans ces cellules. Raff [22] a ainsi proposé un modèle d'organisation sociale où les cellules sont pré programmées pour s'autodétruire, leur survie dépendant de signaux extérieurs émis en continu par d'autres cellules. Ce contrôle social de la survie ou non des cellules garantit une stabilité dans le nombre de cellules constituant un tissu donné.

Les principaux gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose ont tout d'abord été identifiés grâce aux travaux sur le nématode *C. elegans,* ver constitué de 1091 cellules dont 131 meurent par apoptose. Le programme de mort cellulaire de *C. elegans* fait intervenir au moins 14 gènes : parmi eux, 1 gène anti-apoptotique ced 9 et 2 gènes pro-apoptotiques ced 3 et ced 4 jouent un rôle primordial.

Ces gènes ont des homologues chez les mammifères : Bcl-2 et sa famille pour ced 9, la famille des caspases pour ced 3 et les apoptosis protease-activating factors (APAF) pour ced 4 qui joueraient un rôle de chaperon et catalyseraient l'activation des caspases (tableau 3).

II. APOPTOSE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE NORMALE

L'épithélium séminifère en renouvellement rapide est une cible de choix pour l'apoptose qui explique le faible rendement de la spermatogénèse et les " générations manquantes ".

1. Chez l'adulte = Cibles cellulaires et contrôle hormonal

Les 14 stades décrits par Y. Clermont correspondent à des associations cellulaires de 3 types de cellules germinales au cours de la spermatogenèse du rat, les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides et des cellules de Sertoli (nourricières). Le processus d'apoptose intervient pour maintenir constant le nombre de cellules entrant en méiose (les spermatocytes) et préserver l'homéostasie entre cellules de Sertoli et cellules germinales : près de 75% des spermatogonies A et 20% des cellules entre spermatocytes I et spermatides seraient concernées.

Une apoptose spontanée dans l'épithélium séminal du rat, surtout au stade XIV [12] a pu être observée. L'apoptose peut être induite par différents agents (hyperthermie, cycloheximide, colchicine, cytochalasine, PMA) mais pour certains stades seulement :

les stades I, XII et XIV [3]. Ces résultats suggèrent l'existence d'un contrôle intercellulaire de la mort cellulaire des cellules germinales au cours de la spermatogenèse. L'épithélium séminifère pourrait se révéler être un modèle d'étude *in vivo* des mécanismes en jeu au cours du "contrôle social " de l'apoptose évoqué par Raff. Enfin, il existe des variations selon les ethnies avec une expression plus importante de l'apoptose au cours de la spermatogenèse chez les Chinois.

Un contrôle hormonal de l'apoptose au cours de la spermatogenèse a pu être décrit, avec un rôle important des stéroïdes (testostérone) et des gonadotrophines (FSH). Des phénomènes d'apoptose ont ainsi pu être induits dans 4 situations :

a) rat hypophysectomisé,

b) traitement par antagonistes de la GnRH,

c) déplétion en testostérone [32] et ou FSH, LH,

d) administration d'œstradiol [4].

Fas Récepteur (ou APO-1, CD95) est présent sur les cellules germinales et son ligand, Fas Ligand a pu être détecté sur les cellules de Sertoli. Le système Fas Récepteur – Fas Ligand est un autre élément clé du contrôle de l'apoptose des cellules germinales dans le testicule [14, 15, 21].

Tableau 3 : Principaux éléments du contrôle génétique de l'apoptose

C elegans	Mammifères	Mode d'action
Ced-9	Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bad, Bak.	Régulateurs canaux transmembranaires intracellulaires et de protéines de la transduction du signal apoptotique
Ced-4	Apaf = apoptosis protease activating factor	Activateur de caspases
Ced - 3	ICE (caspase-1), ICH1 (caspase-2), CPP32 caspase-3	Protéase à cystéine (caspases)

2. Au cours du développement pubertaire

Une vague d'apoptose massive des spermatogonies peut être observée au début de la puberté avec un pic d'apoptose chez le rat de 32 jours (1e cycle spermatogénétique). Les principales cibles cellulaires sont les spermatogonies et spermatocytes I au début de la méiose. Ce pic d'apoptose est indispensable pour le déclenchement et la poursuite d'une spermatogenèse normale.

Différents mécanismes ont été décrits, pour lesquels les modèles de souris transgéniques avec proto – oncogènes ont été utilisés [24] :

- Sur - expression de c-myc, avec apoptose accrue des spermatocytes I
- Sur expression de bcl - xL, avec suppression du pic précoce d'apoptose
- Inactivation du récepteur c-kit . Les mutations du locus " W "White spotting (c kit)-locus " Sl " Steel (stem cell factor) affectent, entre autres, la lignée germinale. Il s'agit là d'un second exemple intéressant de dialogue entre cellules germinales (présentant le récepteur, c kit) et cellules de Sertoli (disposant du ligand, stem cell factor) (20 ; 23). Les mâles hétérozygotes sont hypofertiles avec 2 pics d'apoptose plus intenses au début de la spermatogénèse, une diminution des diamètres des tubes séminifères de l'adulte, et une diminution du rapport entre spermatogonies et spermatocytes. Une diminution de l'expression du récepteur c-kit a par ailleurs été observée dans les spermatogonies A de testicules de patients infertiles présentant un arrêt de maturation [7]. Aucune expression du même récepteur c-kit n'a pu être détectée dans les cas où l'on ne retrouve dans les tubes séminifères que des cellules de Sertoli. En revanche, le ligand stem cell factor est normalement exprimé dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli de tous les prélèvements étudiés. Parallèlement, les spermatogonies de type A des patients avec un arrêt de maturation présentaient une augmentation du nombre de cellules à ADN fragmenté.
- Inactivation de bcl-w . Les mâles hétérozygotes sont également stériles avec une vague d'apoptose pré pubertaire normale, mais des tubes séminifères désorganisés chez l'adulte avec un nombre élevé de cellules apoptotiques et aucun spermatozoïde mature.

III. SPERMATOGENESE PATHOLOGIQUE (2 exemples)

1. Cryptorchidie

On observe un arrêt de la spermatogenèse dans le testicule atteint, parfois également dans le testicule controlatéral. On note fréquemment une diminution du volume et du poids du testicule avec augmentation de la fragmentation de l'ADN des cellules testiculaires. Les cellules germinales sont en nombre normal à la naissance, puis disparaissent entre l'âge de 1 - 2 ans. Les cellules cibles sont les spermatocytes puis les spermatides rondes les plus sensibles à l'apoptose.

Etude d'HELSINKI [5]

Sur des biopsies testiculaires effectuées chez des enfants lors du traitement chirurgical d'une cryptorchidie, on note une augmentation significative des spermatogonies apoptotiques (% fragmentation ADN) lorsque la biopsie fait suite à un échec du traitement médical par hCG. par rapport au traitement chirurgical effectué d'emblée.

Lorsque l'on s'intéresse à la fertilité de ces enfants devenus adultes, on observe que les enfants ayant eu un taux de fragmentation de l'ADN des cellules testiculaires élevé ont, à l'âge adulte, un volume testiculaire inférieur et un taux de FSH sérique supérieur, sans aucune différence significative, cependant, sur la qualité du sperme éjaculé.

2. Hypospermatogenèse et arrêt de la spermatogenèse

Dès 1997, Lin et al [16] ont décrit une augmentation des cellules apoptotiques sur des biopsies testiculaires de patients infertiles présentant des aspects d'arrêt de maturation ou des hypo -spermatogenèses. Des biopsies testiculaires de patients candidats à une micro injection et présentant une azoospermie sécrétoire ont été étudiées par Tesarik [31]. Dans les

cas d'arrêt complet de la spermatogenèse au stade de spermatides rondes, une fragmentation massive de l'ADN des spermatocytes I et spermatides rondes a été observée dans 80% des cellules examinées (TUNEL+), avec un marquage extrêmement faible des résidus de phosphatidylserine par annexine V. En cas d'arrêt incomplet avec présence de quelques spermatides allongées, environ 30% des spermatocytes I et 15% des spermatides présentaient une fragmentation d'ADN avec marquage par annexine V clairement détecté dans près de 50% des spermatides allongées examinées. L'association de ces 2 techniques de marquage permet d'établir un pronostic de succès de l'ICSI effectuée avec des spermatides, voire des spermatocytes. L'étude de Tesarik montre clairement que la fragmentation de l'ADN est très fréquente dans les spermatides et spermatocytes de patients avec arrêt complet de la spermiogenèse.

Cette étude est confirmée par un modèle expérimental. La souris homozygote pour la mutation ciblée sur le gène Pplcg aboutit à des mâles stériles produisant exceptionnellement quelques spermatozoïdes. Les spermatides rondes Pplcg -/- obtenues ne parviennent pas à effectuer la transition histones – protamines nécessaire. Les spermatozoïdes et les spermatides rondes Pplcg -/- obtenus après biopsie testiculaire ou ponction de l'épididyme présentent des taux très importants de fragmentation de leur ADN [11].

Or, il n'existe actuellement aucun moyen de différencier une spermatide à ADN fragmenté d'une spermatide indemne. Le risque de micro injecter une spermatide à ADN fragmenté est donc important.

IV. APOPTOSE DANS LE SPERME EJACULE

1. Comment détecter les cellules apoptotiques dans l'éjaculat ?

• 1e étude = Gorczyca [8]

L'étude du sperme de 25 sujets infertiles a permis d'établir une corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes apoptotiques (présentant une fragmentation de leur ADN détectée par technique TUNEL) et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation *in situ* en cytométrie de flux permettent d'envisager le rôle de l'apoptose dans l'élimination des spermatozoïdes anormaux éjaculés comparable à l'élimination des cellules somatiques.

• 2e étude = Baccetti [1]

Les spermatozoïdes matures apoptotiques détectés dans l'éjaculat (TUNEL+) ont des caractéristiques ultrastructurales (en microscopie électronique) identiques à celles des cellules somatiques apoptotiques : chromatine partiellement fragmentée ou condensée à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, rupture partielle ou disparition de la membrane nucléaire, acrosome vide, de forme lobulée, et à distance du noyau, ou absent, ballonisation des mitochondries compactées dans la pièce intermédiaire, axonème enroulé. Outre les spermatozoïdes apoptotiques, des spermatides apoptotiques (jeunes) et des corps apoptotiques, phagocytées par des macrophages, ont été observés.

Des cellules apoptotiques ont pu être observées dans tous les spermes éjaculés mais en pourcentages très variables [1] : donneurs fertiles, 0,1% ; infections du tractus génital, 8% ; SIDA, 3-8% ; varicocèle, 1-10% ; têtes rondes, 10% ; cryptorchidie, 15-20% ; ataxie cérébelleuse, 15-20% ; stérilité inexpliquée, 25% ; séminome testiculaire, 50%.

2. D'où vient la fragmentation de l'ADN dans le spermatozoïde mûr éjaculé ?

Deux théories ont été proposées pour expliquer l'origine des altérations de l'ADN décrites dans le spermatozoïde mûr. La première fait référence à la manière dont la chromatine du spermatozoïde est protégée dans l'espèce humaine et chez les mammifères. Une maturité nucléaire incomplète durant la spermiogenèse avec anomalie au moment de la transition histones - protamines et de la mise en place des protamines a été évoquée [26]. Une corrélation entre pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté et pourcentage de spermatozoïdes à équipement en protamines défectueux (chromomycine A3) a pu être établie. Or les spermatides en élongation présentent de nom-

breuses coupures normales, mais transitoires de leur ADN bi caténaire par une nucléase endogène, l'ADN topo isomérase II, nécessaire à la mise en place des protamines. Une anomalie de constitution ou de fonctionnement de cette topo isomérase II pourrait être incriminée dans la genèse de la fragmentation persistante de l'ADN des spermatozoïdes. La seconde explication attribue les altérations de l'ADN nucléaire du spermatozoïde au phénomène d'apoptose.

L'étude d'autres marqueurs d'apoptose apporte de nouveaux éléments de réponse. L'analyse de l'expression du système Fas à la surface de spermatozoïdes humains éjaculés conclut à une nette différence entre spermes normaux et anormaux : dans la quasi totalité des spermes normaux, moins de 10% des spermatozoïdes seulement sont Fas + alors que dans 58% des échantillons oligozoospermiques, on retrouve plus de 10% des spermatozoïdes exprimant Fas à leur surface. Des résultats similaires ont été obtenus en cas de tératozoospermie ou d'asthénozospermie. Ces résultats confirment l'importance de l'apoptose dans la régulation de la spermatogenèse. La présence de spermatozoïdes éjaculés exprimant Fas à leur surface pourrait indiquer un dysfonctionnement dans le processus apoptotique : le processus apoptotique pourrait ainsi être soit dépassé par la nécessité d'éliminer un nombre excessif de cellules anormales soit être interrompu [27].

Enfin, les radicaux libres interviennent comme inducteurs du processus apoptotique, mais également en amplifiant le signal produit. Les radicaux libres présents dans le sperme peuvent être produits par des leucocytes et par certains spermatozoïdes anormaux présentant un reste cytoplasmique volumineux. Les étapes de préparation du sperme, notamment les centrifugations, peuvent induire la production de radicaux libres nocifs et accroître le pourcentage de spermatozoïdes apoptotiques à ADN fragmenté (TUNEL+). La centrifugation en présence d'anti-oxydants "protecteurs" permettrait de diminuer la production de radicaux libres au cours des étapes de préparation du sperme avant AMP et de protéger l'ADN des spermatozoïdes des lésions induites par les radicaux libres [17].

3. Contrôle hormonal de l'apoptose dans le sperme éjaculé

Un effet positif du traitement par FSH (12 jours 150 UI FSH HP (SC)) sur le nombre de cellules apoptotiques présentes dans le sperme de patients infertiles a pu être observé avec nette amélioration de la qualité des spermatozoïdes éjaculés des 23 patients : amélioration des organelles, acrosome normal, forme du noyau normale, disparition de la marginalisation de la chromatine, mitochondries de forme normale et de disposition hélicoïdale, axonème avec un aspect normal (9 + 2) et 2 bras de dynéine réguliers [2]. Cette amélioration des caractéristiques ultrastructurales des spermatozoïdes examinés induite par FSH suggère un rôle des gonadotrophines, et notamment de la FSH, sur le contrôle de l'apoptose dans les cellules de l'éjaculat.

4. Applications en AMP

Analyse et traitements de sperme : Des cassures des brins d'ADN dans les spermatozoïdes de sujets présentant une oligozoospermie ont été observées avec une fréquence significativement supérieure comparée à des sujets avec un sperme normal. Le pourcentage de cellules à ADN fragmenté est corrélé au degré d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes déterminées selon les critères de Kruger mais n'est pas modifié par les techniques de préparations du sperme telles que les gradients de Percoll ou la migration ascendante ou après congélation-décongélation [9].

ICSI : L'analyse des préparations de spermatozoïdes obtenues après lavage – migration ascendante a permis de noter

a) une corrélation négative entre le taux de spermatozoïdes TUNEL + (sperme traité) et les taux de fécondation en ICSI,

b) une corrélation négative entre le taux de spermatozoïdes TUNEL+ après traitement et le taux de formes mobiles et atypiques dans l'éjaculat. Le pourcentage de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN varie de 0,5 – 75% (15%) [18].

L'étude d'ovocytes non fécondés 20 heures après ICSI a permis de retrouver dans 50% des ovocytes une fragmentation d'ADN : l'origine

de cet ADN fragmenté est spermatique dans 25.8% des cas et ovocytaire dans 24.4% des cas. La micro injection d'un spermatozoïde à ADN fragmenté (non identifiable d'après sa seule morphologie) s'accompagnerait d'une absence de décondensation correcte de la chromatine du spermatozoïde et pourrait expliquer certains échecs de fécondation en ICSI[19].

FIV : L'analyse des préparations de spermatozoïdes recueillis après lavage – migration ascendante note un taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté de 5 à 40% (25% des FIV) [29]. Il existe également

a) une corrélation négative entre taux de spermatozoïdes TUNEL+ (sperme traité) et concentration/ml, mobilité et pourcentage de formes normales (éjaculat),

b) une corrélation négative entre spermatozoïdes TUNEL+ et taux de fécondation et de clivage embryonnaire en FIV.

IV. CONCLUSION

L'intervention de l'apoptose à la puberté, au moment du déclenchement de la spermatogenèse, puis au cours des différentes phases de la spermatogenèse (notamment la méiose) est essentielle : elle permet la mise en route de la formation des gamètes mâles dans le tube séminifère et sa régulation. La détection de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés (technique TUNEL) peut être aisément réalisée en cytométrie de flux et pourrait compléter les paramètres conventionnels caractérisant le pouvoir fécondant du sperme.

Cependant, la quantification de la fragmentation de l'ADN, par exemple en cytométrie de flux, correspond à un instantané à un temps t, qui sous estime l'importance réelle de l'apoptose. De plus, la fragmentation de l'ADN est un phénomène commun aux différents types de mort cellulaires et sa seule détection ne peut être considérée comme un marqueur spécifique d'apoptose. C'est également un phénomène relativement tardif puisque résultant de l'activation des caspases et de l'exécution du signal apoptotique transmis. L'utilisation de marqueurs détectés dès les phases précoces de l'apoptose est une voie particulièrement intéressante. C'est le cas de l'Annexine V qui se lie spécifiquement à la phosphatidylsérine présentée par la cellule apoptotique. C'est également le cas du 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide ou JC-1, permettant l'étude des variations du potentiel de membrane des mitochondries du spermatozoïde, élément clé du processus apoptotique.

REFERENCES

1. BACCETTI B., COLLODEL G., PIOMBONI P. : Apoptosis in human ejaculated sperm cells (Notulae seminologicae 9). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1996, 28 : 587-596.
2. BACCETTI B., STREHLER E., CAPITANI S. et al. : The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (Notulae seminologicae 11). Hum. Reprod. 1997, 12 : 1955-68.
3. BLANCO-RODRIGUEZ J., MARTINEZ-GARCIA C. : In vivo analysis of germ cell apoptosis reveals the existence of stage-specific " social " control of ger cell death in the seminiferous epithelium. Int. J. Androl. 1997, 20 : 373-379.
4. BLANCO-RODRIGUEZ J., MARTINEZ-GARCIA C. : Apoptosis pattern elicited by oestradiol treatment of the seminiferous epithelium of the adult rat. J. Reprod. Fertil. 1997, 110 : 61-70.
5. DUNKEL L., TASKINEN S., HOVATTA O., TILLY JL, WIKSTROM S. : Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. J. Clin. Invest. 1997, 100 : 2341-2346.
6. FADOK V.A., VOELKER D.R., CAMPBELL P.A. et al.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. 1992, 148: 2207-2216.
7. FENG H., SANDLOW J., SPARKS A., SANDRA A., ZHENG L. : Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. Fertil. Steril. 1999, 71 : 85-89.
8. GORCZYCA W., TRAGANOS F., JESIONOWSKA H., DARZYNKIEWICZ Z. : Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells ; an analogy to apoptosis of somatic cells. Exp. Cell Res. 1993, 207 : 202-205.
9. HOST E., LINDENBERG S., KAHN J.A., CHRISTENSEN F. : DNA strand breaks in human sperm cells : a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 1999, 78 : 336-339.
10. JOHNSON L., CHATUVERDI P.K., WILLIAMS J.D.: Missing generations of spermatocytes and spermatids

in seminiferous epithelium contribue to low efficiency of spermatogenesis in humans. Biol. Reprod. 1992, 47 : 1091-1098.

11. JURISICOVA A., LOPES S., MERIANO J., OPPEDISANO L., CASPER R.F., VARMUZA S. : DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cg gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. Hum. Reprod. 1999, 5 : 323-330.

12. KERR J.F.R., WYLLIE A.H., CURRIE A.R. : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer.1972, 26 : 239-257.

13. KERR J.F.R. : Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis : assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. J. Reprod. Fertil. 1992, 95 : 825-830.

14. LEE J., RICHBURG J., YOUNKIN S., BOEKELHEIDE K. The Fas System is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology, 1997, 138 : 2081-2088.

15. LEE J., RICHBURG J., SHIPP E.B..,MEISTRICH M.L., BOEKELHEIDE K. The Fas System, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. Endocrinology 1999, 140 : 852-858.

16. LIN W., LAMB D., WHEELER T., LIPSHULTZ L., KIM E. : In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. Fertil. Steril. 1997, 68 : 1065-1069.

17. LOPES S., JURISICOVA A., SUN J.G., CASPER R.F.: Reactive oxygen species : potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod., 1998, 13 : 896-900.

18. LOPES S., SUN J.G., JURISICOVA A. et al. : DNA fragmentation in spermatozoa : implication for failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Fertil. Steril. 1998, 69 : 528 – 532.

19. LOPES S., JURISICOVA A., CASPER R.F. : Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 1998 13 : 703-708.

20. MANOVA K., HUANG E., ANGELES M. et al. : The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. Dev. Biol.1993, 157 : 85-99.

21. PENTIKAINEN V., ERKKILA K., DUNKEL L. Fas regulates cell apoptosis in the human testis in vitro. Am. J. Physiol. 1999, 276 : E310-316.

22. RAFF M.C. : Social controls on cell survival and cell death. Nature, 1992 : 397-400.

23. ROSSI P., ALBANESI C., GRIMALDI P., GEREMIA R. : Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse sertoli cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991, 176 : 910-914.

24. ROYERE D., GUERIF F., ROCHEREAU DE REVIERS M.T., PANTHIER S., LANSAC J. : L'apoptose dans la gonade mâle. Contracept. Fertil. Sex. 1998, 26 : 517-521.

25. RUSSEL L.D., CLERMONT Y. : Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat. Record. 1977, 187 : 347-366.

26. SAKKAS D., MARIETHOZ E., MANICARDI G., BIZZARO D., BIANCHI P.G., BIANCHI U. : Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev. Reprod. 1999, 4 : 31-37.

27. SAKKAS D., MARIETHOZ E., St JOHN J.C. : Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway. Exp. Cell Res. 1999, 251 : 350-355.

28. SAVILL J., FADOK V., HENSON P., HASLETT C. : Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol. Today 1993, 14 : 131-136.

29. SUN J.G., JURISICOVA A., CASPER R.F. : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : correlation with fertilization in vitro. Biol. Reprod. 1997, 56 : 602-607.

30. SUSIN S. et al. : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999, 397: 441-446.

31. TESARIK J., GRECO E., COHEN-BACRIE P., MENDOZA C. : Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol. Hum. Reprod. 1998, 4 : 757-762.

32. TROIANO L., FAUSTINI FUSTINI M., LOVATO E. et al. : Apoptosis and spermatogenesis : evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994, 202 : 1315-1321.

33. WYLLIE A.H., KERR J.F., CURRIE A.R. : Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol.1980, 68 : 251-306.

ABSTRACT

Apoptosis in spermatogenesis and in ejaculated sperm

R. LEVY

It has become clear in recent years that programmed cell death occurs spontaneously in the cycle of the seminiferous epithelium. Induced germ cell apoptosis occurs at specific stages of the spermatogenic cycle and the existence of supracellular control of germ cell death during spermatogenesis has been documented. If apoptosis is a key phenomenon in the control of sperm production, the existence and role of apoptosis in ejaculated sperm cells remain controversial.

Apoptosis - as determined by DNA fragmentation (TUNEL) and ultrastructural analysis - is abnormally frequent in the sperm cells of the ejaculate of sterile men with classical biochemical and ultrastructural pattern. In this review, we discuss the possible origins of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the consequences of DNA damage if the apoptotic spermatozoa is used for ICSI.

Percentages of DNA fragmentation in human ejaculated sperm are correlated with fertilization rates both after FIV and ICSI. Detection of DNA fragmentation in human sperm could provide additional information about the biochemical integrity of sperm and may be used in future studies for fertilization failures not explained by conventional sperm parameters. However, the analysis of other molecular markers of apoptosis (Fas, Annexine V ...) is necessary to assess the role of apoptosis in human ejaculated sperm cells.

Key words : *Apoptosis - spermatogenesis - sperm - DNA fragmentation*