

Indications d'une étude méiotique dans l'infertilité masculine

M.R. GUICHAOUA, J.M. LUCIANI

Laboratoire de Cytologie et Biologie de la Reproduction, Maternité de la Belle de Mai, Marseille

RESUME

L'indication d'une exploration méiotique est rarement posée au cours de l'investigation d'une infertilité masculine. Or un certain nombre de mutations qui affectent le déroulement de la spermatogenèse se manifestent par des images caractéristiques lors de l'étude cytogénétique de la méiose alors que l'histologie testiculaire ne montre aucun aspect spécifique de ce type de pathologie. Dans le cas des infertilités à caryotype somatique anormal l'investigation méiotique a pour but d'étudier les mécanismes responsables de l'arrêt de la maturation des cellules germinales, et conduira à une meilleure connaissance de la spermatogenèse normale. L'étude de la méiose, outre la technique cytogénétique, fait aussi appel aux techniques de microscopie électronique et de biologie moléculaire.

Nous pensons donc qu'il faut accorder une plus large place à l'étude de la méiose dans le bilan d'une infertilité masculine, lorsque l'indication d'une étude histopathologique testiculaire a été posée.

Mots-clés : Biopsie testiculaire, techniques méiotiques, mutations méiotiques, anomalies chromosomiques, spermatogenèse.

INTRODUCTION

La biopsie testiculaire, utilisée depuis une quarantaine d'années dans le bilan des

infertilités masculines sévères, a généralement pour seul but l'étude histopathologique du fragment biopsié sans préjuger de l'étiologie des anomalies observées. Il est très rare que le clinicien pose l'indication d'une étude de la méiose. Nous allons tenter de montrer dans cet article l'intérêt que peut présenter, chez certains patients, l'analyse détaillée de cette étape si particulière de la spermatogenèse. Lorsque l'indication de biopsie testiculaire a été posée, il serait dommage de ne pas discuter l'éventualité d'une étude méiotique associée, sachant que la quantité du matériel nécessaire à cette étude est infime puisque 2 mm³ environ de tissu testiculaire suffisent.

1. Rappel physiopathologique de la méiose

La méiose normale comprend deux divisions cellulaires successives (Figure 1) :

- La première, la plus longue et la plus complexe, voit se réaliser les appariements des chromosomes homologues paternels et maternels afin d'échanger une partie de leur génome. Ces échanges, appelés phénomènes de "recombinaison génétique" assurent une partie du brassage de l'information génétique indispensable à la diversité des individus d'une même espèce. Appariements et recombinaison génétique se déroulent au cours de la prophase de la première division méiotique et nécessitent l'intervention de nombreuses protéines de structure et enzymatiques.

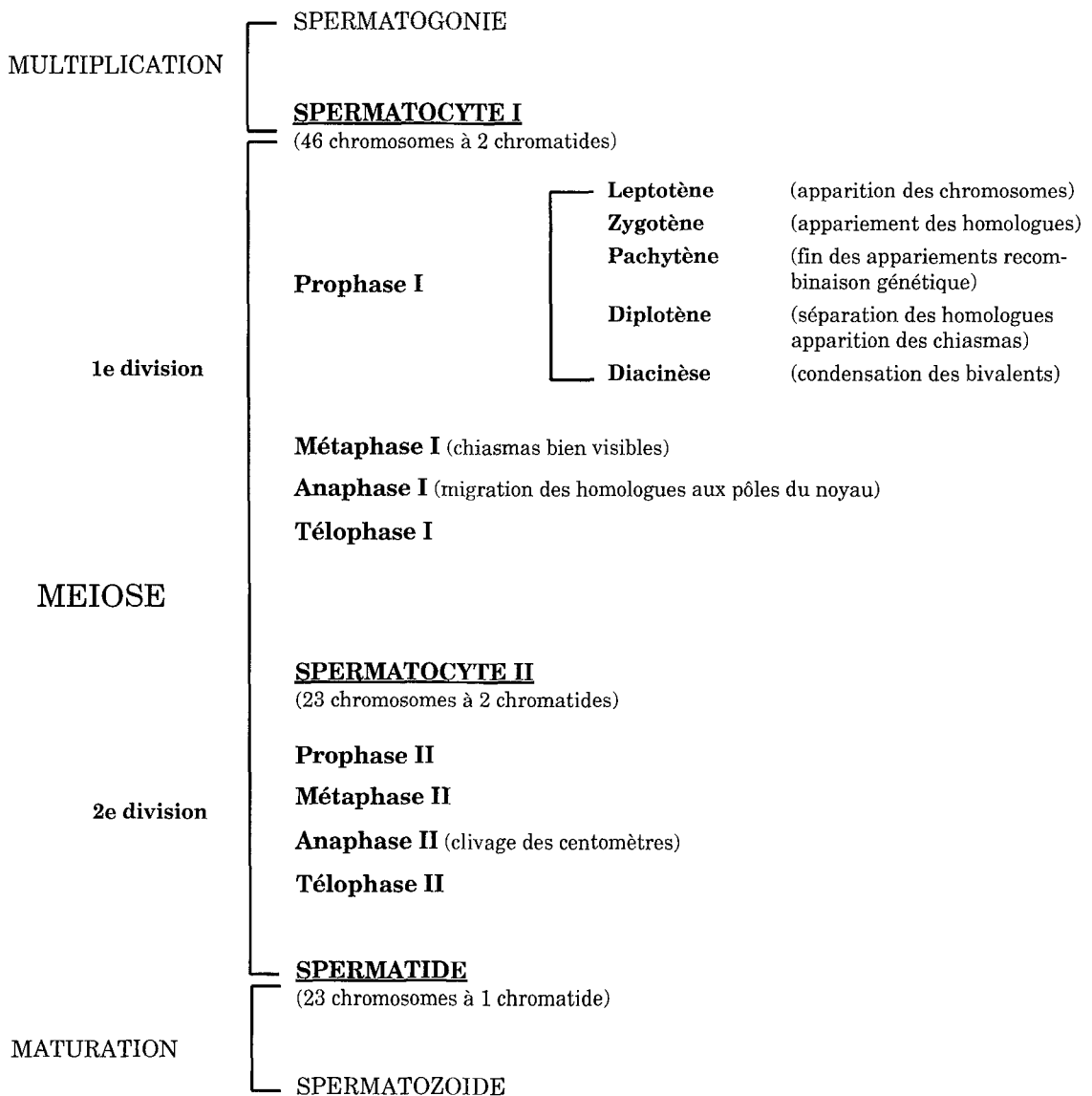


Figure 1 : Schéma général de la méiose spermatocytaire.

L'existence de mutations au niveau de gènes qui codent pour les protéines nécessaires à l'appariement ou à la recombinaison, est généralement responsable d'une altération sévère de la structure des chromosomes aux stades ultérieurs, et d'un arrêt de la spermatogénèse aux stades métaphase I ou métaphase II.

Les chiasmata, témoins des échanges entre chromosomes homologues, sont parfaitement individualisés au cours de la métaphase I, et

sont nécessaires à la ségrégation normale des chromosomes dans les deux cellules filles.

Lors de l'anaphase de la première division méiotique, la ségrégation au hasard des chromosomes homologues réalise la deuxième forme de brassage de l'information génétique. Toute altération de ce processus sera responsable de la fabrication de gamètes déséquilibrés et d'anomalies chromosomiques chez l'embryon, mais la spermatogénèse n'est pas altérée.

Au cours de la méiose masculine, les chromosomes sexuels ont un comportement particulier : ils sont inactivés et condensés sous la forme d'une vésicule sexuelle au cours des stades zygotène et pachytène. A l'intérieur de la vésicule sexuelle, les chromosomes X et Y sont appariés sur une courte distance au niveau de leurs bras courts ; cette région d'homologie correspond à la région pseudo-autosomale des chromosomes sexuels, elle est normalement le siège d'un événement recombinaison génétique qui se manifestera à la métaphase I par la présence d'un chiasma entre l'X et l'Y, et la formation d'un bivalent XY. La plus grande partie des chromosomes X et Y, non appariée, ne présente pas d'homologie et est appelée la "région différentielle de l'X et de l'Y". Il a été proposé par LYFSCHYTZ et LINDSLEY [1] que tout facteur interférant avec l'inactivation du chromosome X au cours de la prophase de la première division méiotique, pouvait être responsable d'une atteinte sévère de la spermatogénèse qui se manifestera par une oligo-asthénospermie. L'hypothèse inverse de l'extension de l'inactivation de l'X aux autosomes, ayant les mêmes conséquences sur la spermatogénèse, a aussi été proposée par ces mêmes auteurs.

- La deuxième division méiotique ressemble à une mitose normale avec clivage des centromères ; elle n'est cependant pas précédée d'une synthèse d'ADN et elle se produit dans une cellule dont chaque chromosome est en un seul exemplaire. Des phénomènes de non-disjonction peuvent encore se produire lors de l'anaphase II, responsables comme précédemment de la formation de gamètes déséquilibrés.

2. Les techniques méiotiques

Plusieurs techniques sont actuellement à notre disposition pour l'étude de la méiose. Dans la majorité des cas, ces techniques sont réalisées sur des fragments testiculaires prélevés par biopsie au cours d'anes-thésie générale. Cependant, l'équipe d'Egozcue à Barcelone a obtenu des résultats satisfaisants après isolement des cellules

germinales dans le sperme, mais les résultats sont beaucoup plus aléatoires.

a) Les techniques les plus simples et les moins coûteuses sont les techniques cytogénétiques [2, 3]

Elles donnent d'excellents résultats pour l'étude de tous les stades de la méiose compris entre le leptotène et la métaphase II. Elles utilisent un choc hypotonique plus ou moins prolongé au chlorure de potassium (quelques minutes pour les métaphases I et II, plusieurs heures pour les autres stades, en particulier le stade pachytène) et une fixation longue au méthanol-acide acétique. Lorsque le laboratoire est situé à distance du lieu de prélèvement, il est possible de faire voyager les fragments testiculaires dans le milieu de fixation après avoir réalisé le choc hypotonique sur place.

Ces techniques apportent des résultats particulièrement intéressants sur le nombre, l'appariement et le degré de condensation des chromosomes normaux, ainsi que sur le comportement des chromosomes anormaux aux cours de la méiose.

b) Les techniques de microscopie électronique [4] sont plus longues à réaliser et nécessitent un investissement financier beaucoup plus lourd. Elles sont particulièrement adaptées à l'étude des appariements en visualisant les structures protéiques (complexes synaptonémaux) qui lient entre eux les chromosomes homologues. Elles permettent aussi de visualiser les chromosomes X et Y dans la vésicule sexuelle. Les techniques sont : la microscopie électronique conventionnelle sur coupes ultrafines après fixation à la glutaraldéhyde et au tetroxide d'osmium ; la reconstruction tridimensionnelle à partir de coupes sériées et la technique de spreading qui utilise la tension superficielle de l'eau pour étaler les chromosomes méiotiques.

c) Les techniques de biologie moléculaire prennent de plus en plus de place dans l'étude de la méiose :

- l'identification des gènes qui interviennent dans le déroulement des événements parfaitement ordonnés qui constituent la méiose appartient au domaine de la recherche.
- l'étude de la transcription de ces gènes par hybridation *in situ* sur coupes à congélation, ou sur gels de polyacrylamide, permettra prochainement de relier une anomalie morphologique à une atteinte génétique.

d) Evaluation du coût des techniques méiotiques

Les examens ne figurant pas à la nomenclature, nous évaluons l'étude cytogénétique de la méiose à 1.350 francs, et la microscopie électronique, comme celle du spermatozoïde, à 3.500 francs.

3. Les indications et les résultats de l'étude de la méiose

a) Exploration des stérilités sécrétoires à caryotype somatique normal

L'étude méiotique est réalisée dans un but diagnostique, elle permet de mettre en évidence des aspects chromosomiques particuliers regroupés sous le terme d'"anomalies méiotiques pures" [5, 6, 7].

Cette pathologie doit être suspectée chez des hommes infertiles présentant une azoospermie ou une oligospermie sévère, souvent associée à une asthénospermie importante. **L'examen clinique** est normal, les patients ne présentent pas de troubles de la différenciation sexuelle, la FSH et les caractères sexuels secondaires sont normaux, de même que le volume testiculaire et le caryotype. **L'interrogatoire** peut retrouver une consanguinité parentale et/ou une notion de stérilité familiale. **L'histologie testiculaire** ne montre pas d'image spécifique de cette affection qui se manifeste par un arrêt partiel ou total de la maturation des cellules germinales aux stades de spermatocyte I surtout, et de spermatocyte II.

Les études méiotiques, peu nombreuses montrent des aspects caractéristiques (Figure 2) :

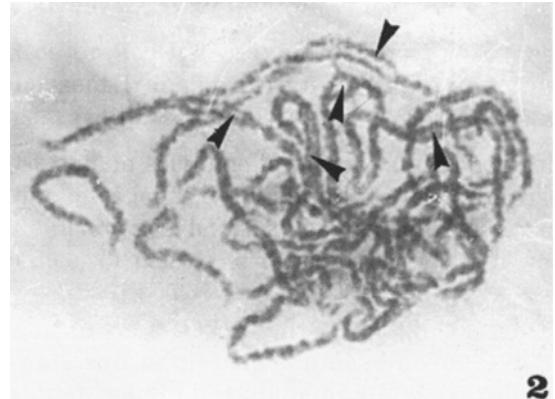


Figure 2 : Spermatocyte I au stade pachytène chez un patient présentant une anomalie méiotique pure. Ses bivalents sont décondensés avec de nombreux asynapsis (flèches) ; noter l'absence de vésicule sexuelle.

- au stade pachytène on observe une décondensation importante des bivalents qui deviennent identiques à ceux observés normalement dans les noyaux d'ovocytes au même stade, une disparition de la vésicule sexuelle et des images d'asynapsis (défauts d'appariement) qui peuvent intéresser un ou plusieurs, voire la totalité des bivalents d'un noyau.
- à la diacinèse-métaphase I, il y a une diminution drastique du nombre des chiasmats avec formation de longues structures chromosomiques et d'univalents ; parfois s'associe à ces images une fragmentation des bivalents. Ces anomalies sont le plus souvent, mais non nécessairement, associées à un arrêt de la méiose. Pour cette raison, des métaphases II, bien que rares, peuvent s'observer. La majorité d'entre elles sont polyploïdes, témoignant de la malségrégation des chromosomes au cours de l'anaphase I, directement liée aux anomalies chiasmatisques.

Toutes les anomalies décrites peuvent affecter la totalité des bivalents d'une cellule, mais pas obligatoirement toutes les cellules

de l'épithélium germinale, ce qui explique l'existence d'oligospermie à côté des azoospermies.

La fréquence des anomalies méiotiques pures est difficile à établir étant donné le petit nombre d'études méiotiques réalisés jusqu'à présent dans cette population.

A partir de ces études cytogénétiques de la méiose, une tentative de classification des anomalies méiotiques pures peut être ébauchée :

- celles qui altèrent les gènes intervenant dans l'appariement et la condensation des chromosomes (protéines des complexes synaptonémaux), dans lesquelles sont présentes toutes les lésions que nous avons décrites aux stades pachytènes, métaphases I et II.
- celles qui altèrent les phénomènes de recombinaison génétique avec des images normales au stade pachytène et des anomalies à partir de la diacinèse-métaphase I.
- Un aspect particulier de ces anomalies méiotiques pures est représenté par la dissociation précoce de l'X et de l'Y qui se manifeste à la métaphase I par un pourcentage élevé (>30%) d'univalents X et Y. Elle est la conséquence de l'absence spécifique du chiasma situé au niveau des bras courts des chromosomes X et Y.

b) Les stérilités sécrétoires à caryotype somatique anormal [8]

Dans ce cas, la cause de l'infertilité est connue et l'étude méiotique aura pour but de tenter de décrypter les mécanismes responsables de l'arrêt de la spermatogénèse. A partir de 10 études cytogénétiques réalisées dans des populations d'hommes infertiles, la fréquence des anomalies chromosomiques a été estimée à 5,32 %. Les anomalies chromosomiques qui altèrent spécifiquement la capacité de la gonade à produire des gamètes, sans autre atteinte majeure du phénotype, sont les anomalies des chromosomes sexuels et les remaniements équilibrés des autosomes. Dans ce dernier cas, il

est bien connu que la même anomalie autosomique peut retentir de façon très variable sur la lignée germinale mâle, de l'OATS extrême au spermogramme dont les paramètres sont situés dans les limites des valeurs normales. A partir des études méiotiques réalisées chez les hommes infertiles porteurs d'anomalies chromosomiques, deux hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer l'arrêt de la spermatogénèse. La première, basée sur l'observation d'une association spécifique entre les autosomes remaniés et les chromosomes sexuels au cours de la prophase de la première division méiotique suggère l'importance de l'intégrité et de l'inactivation de la vésicule sexuelle pendant cette étape de la méiose (Figure 3). La deuxième hypothèse, formulée à partir de la mise en évidence d'un asynapsis plus ou moins étendu entre les chromosomes transloqués et leurs homologues normaux, toujours au cours de la prophase I, postule que l'anomalie de l'appariement méiotique pourrait conduire à une défaillance profonde de la spermatogénèse. Cependant, aucun travail n'a démontré jusqu'à présent que ces aspects morphologiques étaient la cause de la mort de la cellule germinale mâle. D'autres hypothèses, tenant compte des lésions du tissu somatique de la gonade [9], en particulier de la cellule de Sertoli [10], ont été proposées.

4. Place de l'étude méiotique dans la stratégie du clinicien

Nous pensons qu'il faut accorder une plus large place à l'étude de la méiose dans le bilan d'une infertilité masculine. Nous avons vu que seule cette étude permet de poser le diagnostic de mutation méiotique. Dans ce cadre, TEMPLADO [7] estime que "l'étude méiotique est indiquée chez tout patient infertile présentant une anomalie du spermogramme quand toutes les étiologies possibles sont éliminées".

En ce qui concerne les anomalies chromosomiques, l'étude de la méiose permettra d'une part de mieux comprendre les mécanismes qui concourent à la mort de la cellu-

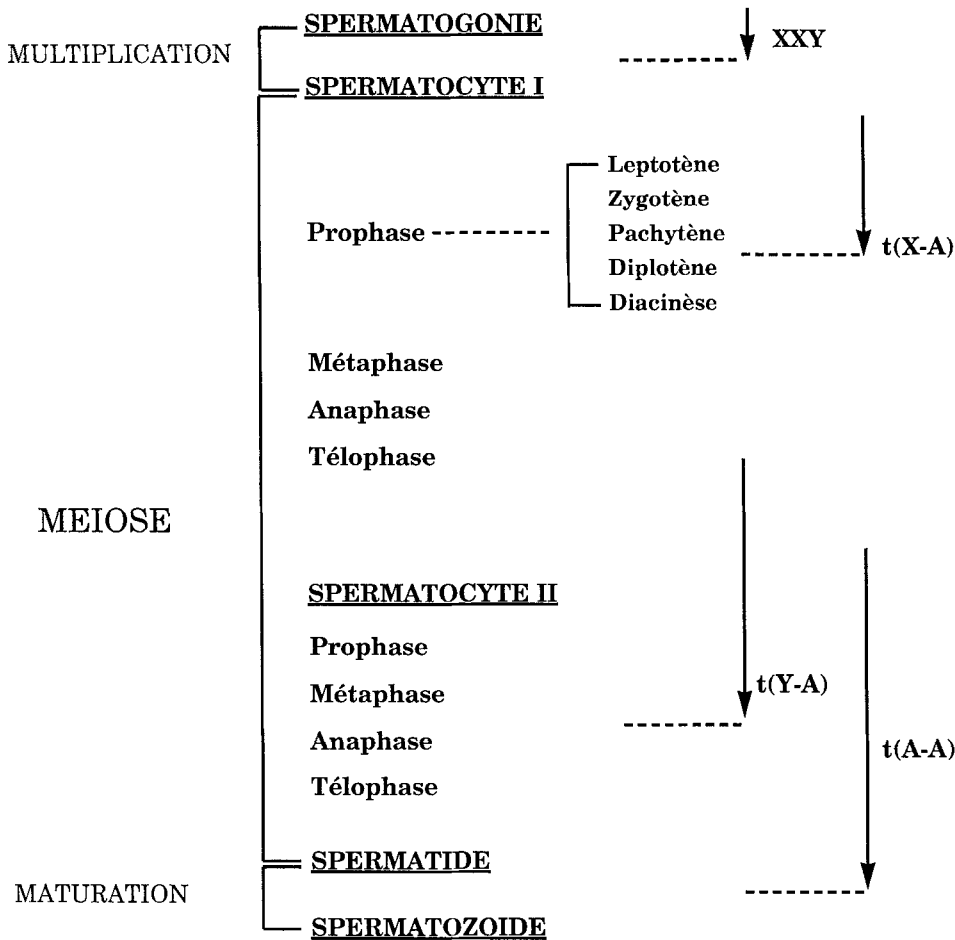


Figure 3 : Les différents stades d'arrêt de la spermatogénèse en fonction du caryotype somatique correspondent aux niveaux atteints par les flèches le blocage cellulaire est d'autant plus précoce que la vésicule sexuelle (VS) est plus altérée : XXY = absence de VS ; $t(X-A)$ = VS anormale ou absente ; $t(Y-A)$ = le fragment d'Y transloqué est inclus dans la VS ; $t(A-A)$ = association figure de translocation - VS.

le germinale, aucune des hypothèses avancées jusqu'à présent n'ayant été prouvées. D'autre part, la connaissance de ces mécanismes qui altèrent la méiose et le déroulement de la spermatogénèse conduira à une meilleure compréhension des événements très complexes qui constituent la spermatogénèse normale. Enfin il ne faut pas négliger les retombées cliniques des connaissances fondamentales, qui peuvent se manifester des années après la découverte initiale.

L'étude méiotique doit donc être couplée à l'histologie testiculaire dont les indica-

tions sont de plus en plus fréquemment posées chez les patients dans le but d'apprécier l'état de la spermatogénèse et de rechercher la présence de spermatozoïdes dans les tubes séminifères en cas d'oligospermie majeure. En effet, des travaux récents [11, 12, 13] ont montré que des spermatozoïdes testiculaires pouvaient être féconds non seulement lorsqu'ils sont injectés sous la pellucide ou directement dans le cytoplasme de l'ovocyte, mais aussi avec les techniques standard de fécondation *in vitro*.

REFERENCES

1. LIFSCHYTZ, E., AND LINDSLEY, D.L. : The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1972, 69, n°1 : 182-186.
2. LUCIANI, J.M., CAPODANO-VAGNER, A.M., DEVICTOR-VUILLET, M. : Techniques d'analyse de la méiose chez l'homme. Biol. Génét. Paris, L'Expansion, 1972 : 41-53.
3. LUCIANI, J.M., GUICHAOUA, M.R., MORAZZANI, M.R. : Complete pachytene chromomere karyotypes of human spermatocyte bivalents. Hum. Genet., 1984, 66 : 267-271.
4. GUICHAOUA, M.R., DE LANVERVIN, A., CATALDO, C., DELAFONTAINE, D., ALASIA, C., FRATERNO, M., TERRIOU, P., STAHL, A., LUCIANI, J.M. : Three dimensional reconstruction of human pachytene spermatocyte nuclei of a 17;21 reciprocal translocation carrier : study of XY-autosome relationships. Hum. Genet., 1991, 87 : 709-715.
5. BAKER, B.S., CARPENTER, A.T.C., ESPOSITO, R.E., SANDLER, L. : The genetic control of meiosis. Ann. Rev. Genet., 10 : 53-134.
6. TEMPLADO, C., MARINA, S., EGOZCUE, J. : Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. Andrologia, 1976, 8, (4) ; 285-289.
7. TEMPLADO, C., VIDAL, F., MARINA, S., POMEROL, J.M., EGOZCUE, J. : A new meiotic mutation : Desynapsis of individual bivalents. Hum. Genet., 1981 ; 59 : 345-348.
8. GUICHAOUA, M.R., DELAFONTAINE, D., NOEL, B., LUCIANI, J.M. : L'infertilité masculine d'origine chromosomique. Contracept. Fertil. Sex., 1993, Vol 21, n°2 : 113-121.
9. SETTERFIELD, L.A., MAHADEVAIAH, S., MITTWOCH, U. : Pachytene pairing in relation to sperm and oocyte numbers in male-fertile reciprocal translocation in the mouse. Cytogenet. Cell. Genet., 1988, 49 : 293-299.
10. VIGUIE, F., TERQUEM, A., ROMANI, F., DADOUNE, J.P. : Abnormalities of meiosis and Sertoli cell junctions in a man with a translocation Y autosome. Biol. cell., 1982, 45 : 172a.
11. PALAMO, G., JORIS, H., DEURSEY, P., VAN STEIRTEGHEM, A.C. : Pregnancies after intra cytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. Lancet, 1992, 340 : 17-18.
12. SCHOYSMAN, S., VANDERZWALMEN, P., NIJS, M., SEGAL-BERTIN, G., VAN DE CASSEYE, M. : Successful fertilization by testicular spermatozoa in an *in vitro* fertilization programme. Human Reprod., 1993, 8 : 1339-1340.
13. HIRSH, A., MONTGOMERY, J., MOHAN, P., MILLS, C., BEKIR, J., TAN, S.L. : Fertilisation by testicular sperm with standard IVF techniques. Lancet, 1993, 342 : 1237-1238.

ABSTRACT

Meiotic investigation in male infertility

M.R. GUICHAOUA, J.M. LUCIANI

Meiotic investigation is rare in male infertility. Now, some mutations affecting spermatogenesis exhibit characteristic cytogenetic figures, whereas testicular histology does not show specific aspects of this pathology. In male infertility with abnormal somatic karyotype, the aim of meiotic survey is to find the mechanisms inducing spermatogenic failure, and thus to lead to a better understanding of normal spermatogenesis. In addition to cytogenetic techniques, meiosis is also investigated by electron microscopy and molecular biology.

Also, we think that a larger place must be granted to meiotic study in male infertility evaluation when the indication of testicular histopathology was settled.

Key words : Infertility, Testicular biopsy, Meiotic techniques, Meiotic mutations, Chromosomal anomaly, Spermatogenesis.