REVUE DE LA LITTERATURE INTERNATIONALE

avec la collaboration de :

J. BELAISCH

M. BUVAT-HERBAUT

J.C. CZYBA

F. GIULIANO

H. LEJEUNE

B. SALLE

Revue de la littérature internationale

SPERMIOLOGIE

531 Avec quelle fréquence les hommes fertiles doivent-ils avoir des relations sexuelles pour obtenir une conception ?
I.T. KASPA, Y. MAOR, D. LEVRAN, M. YONISH, S. MASCHIACH, J. DOR
Fertil. Steril. 62 : 370-375, 1994.

PROCREATIONS MEDICALEMENT ASSISTEES

532 Naissance de nouveau-nés normaux après électro-fusion d'ovocytes de souris avec des spermatides rondes.
A. OGURA, J. MATSUDA, R. YAGANIMACHI
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V.14, 7460-7462, 1994.

ENDOCRINOLOGIE

534 Régulation des caractéristiques du sperme par la dihydrotestostérone chez les hommes présentant un pseudohermaphrodisme par déficit en 5α-réductase de type 2.
L.Q. CAI, C.M. FRATIANI, T. GAUTHIER, J. IMPERADO-MCGINLEY
J. Clin. Endocrinol. Metab.79, 409-414, 1994.

536 Les cellules de la lignée spermatogénétique internalisent l'ABP sertolienne : étude en microscopie électronique chez le rat.
H. GERARD, A. GERARD, A. EN NYA, F. FELDEN, J.L. GUEANT
Endocrinology, 134, n°3, 1515-1527, 1994.

IMMUNOLOGIE

538 Neutralisation des anticorps antispermatiques dans le sérum de femmes fertiles par des anticorps anti-idiotypiques.
R.K. NAZ, K. AHMAD, A.C. MENGE
J. Clin. Invest., 92, 2331-2338, 1993.

SEXOLOGIE

541 6ème réunion mondiale sur l'impuissance
International Journal on Impotence Research, V 6, suppl. 1, Sept. 1994.

542 Programme d'auto-injection intra-caverneuse : analyse des résultats et complications.
R. VALDEVENITO, A. MELMAN
International Journal on Impotence Research, V 6, 81-91, 1994.

SPERMIOLOGIE

Avec quelle fréquence les hommes fertiles doivent-ils avoir des relations sexuelles pour obtenir une conception

KASPA I.T., MAOR Y., LEVRAN D., YONISH M., MASHIACH S., DOR J.

Infertility and IVF Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Sheba Medical Center, Tel Aviv University, Tel Hashomer, Israel.

Fertil Steril 62 : 370-375, 1994

1. Conditions de l'étude

576 hommes consultant une unité de traitement de l'infertilité et de FIV. Les patients fournissent le produit de deux éjaculations rapprochées. Soit dans les premières 4 heures (une ou quatre heures) suivant la première éjaculation, soit 24 heures après cette première éjaculation. La première éjaculation était précédée de 3 jours d'abstinence.

2. Mesures

Nombre total de spermatozoïdes mobiles dans le premier et le deuxième éjaculat.

Les patients étaient divisés en normospermiques, oligospermiques (<20M/ml ou <40M/éjaculat total), asthénospermiques (<40% de mobilité) et oligoasthénospermiques. 38 ont été exclus parce que le volume du sperme était inférieur à 1ml ou supérieur à 7ml, ou la mobilité <10 %.

Les résultats de ce travail sont assez difficiles à schématiser.

Première notion essentielle : chez 359 hommes normospermiques, le nombre total de spermatozoïdes mobiles (NTSM) a diminué significativement de 98 Millions (M) dans le premier éjaculat à 42 M dans le second, produit 24 heures plus tard.

Dans le groupe asthénospermique (24 heures d'écart entre 2 éjaculats) sur 81 sujets, ce NTSM ne se modifie pas significativement : 24 contre 30M.

Dans les deux groupes oligospermiques (1 et 4 heures d'intervalle entre les deux éjaculats : n = 27 et 24 heures d'intervalle : n = 45), le NTSM est de 6 contre 3,6 et de 13 contre 10.

Enfin, dans les deux groupes d'oligoasthénospermiques (1 et 4 h n = 23 et 24 heures n = 41) le nombre total s'est élevé significativement passant de 3,2 à 8 et de 4 à 4 (sic).

En conséquence, en poolant les éjaculats, le nombre total des spermatozoïdes mobiles s'est donc accru de 49 % pour les normospermiques, 95 % pour les asthénospermiques, 67 et 75 % pour les oligospermiques, enfin 233 et 139 pour les oligo-asthénospermiques.

La conclusion des auteurs est que les rapports rapprochés en période ovulatoire ou l'utilisation de 2 éjaculats séquentiels peuvent accroître le potentiel reproductif des hommes infertiles. De même pour une FIV et les Inséminations intra utérines la réunion des deux éjaculats peut être envisagée.

Commentaires *(J. BELAISCH)*

Les auteurs ont tiré toutes sortes de conclusions physiopathologiques de ces résultats dont ils déclarent avoir été les premiers à les démontrer sur un grand nombre d'examens. L'observation d'un meilleur sperme lors d'une deuxième éjaculation rapprochée, notée fréquemment chez des hommes infertiles, avait été rapportée à la réunion franco-anglaise de la Société Française pour l'Etude de la Fertilité en 1976, par Fari et coll.

Les auteurs de l'article observent qu'il est classique (et donc confirmé) de dire que chez le sujet normospermique, la deuxième éjaculation est plus pauvre en spermatozoïdes mobiles que la première. On avait extrapolé ces résultats aux hommes infertiles sans preuves. Leur travail démontre qu'il n'en est pas ainsi.

Peut être l'amélioration observée chez certains hommes, témoigne-t-elle d'une participation d'un transport épididymaire défectueux à certaines oligo et asthénospermies.

Le travail classique de Johnson et Varner avait montré que le transit épididymaire est 3 fois plus long chez les sujets oligospermiques que chez les normospermiques.

En ce qui concerne l'asthénospermie, l'amélioration constatée suggère une altération de la mobilité lors du passage de l'épididyme si celui ce est trop long (confirmant une observation de Kretser dans certaines pathologies axonémales). Pour les auteurs, un facteur inhibiteur de la mobilité pourrait exister dans certains épididymes et il

pourrait se trouver à une plus faible concentration dans le plasma séminal de la 2ème éjaculation par rapport à la première.

Quoi qu'il en soit, la conséquence logique de cette observation est que l'on peut proposer aux couples d'avoir un rapport par jour lors de la période de l'ovulation, voire 2, ce qui pourrait être un moyen peu coûteux d'accroître le taux de grossesse mais qui reste à démontrer.

En ce qui concerne les inséminations intra utérines et FIV, il n'est pas illogique, lorsque le premier éjaculat ne paraît pas favorable, de demander une deuxième éjaculation au patient grâce à laquelle, en poolant les deux éjaculations obtenues à 4 ou 24H d'intervalles, on pourrait obtenir un nombre beaucoup plus satisfaisant de spermatozoïdes. Cela pourrait peut être supprimer quelques cas d'annulation de certains cycles.

Référence :

JOHNSON L., VARNER D.D. : Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. Biol. Reprod. 8, 71-73, 1988.

•••

PROCREATIONS MEDICALEMENT ASSISTEES

Naissance de nouveau-nés normaux après électro-fusion d'ovocytes de souris avec des spermatides rondes

A. OGURA*, J. MATSUDA*, R. YANAGIMACHI**

** Department of Veterinary Science, Japan's National Institute of Health, Shinjuku-ku, Tokyo, Japon. ** Department of Anatomy and Reproductive Biology, University of Hawaii School of Medicine, Honolulu, HI 96 822*

Proc. Natl Acad. Sci. USA, V.91, 7460-7462, Août 1992.

Puisque le noyau des spermatides contient un stock haploïde de chromosomes, on peut imaginer que la fécondation est réalisable à la suite de l'introduction directe d'un tel noyau dans le cytoplasme d'un ovocyte mûr. Nous avons déjà montré, chez le hamster et chez la souris, que l'incorporation d'un noyau de spermatide, par micoinjection ou électrofusion, dans le cytoplasme ovocytaire, est suivie d'une replication d'ADN et de syngamie [1, 2].

Dans ce travail nous montrons que des ovocytes de souris ainsi fécondés ont été à l'origine d'individus normaux des deux sexes.

1. Matériel et méthodes

Préparation des spermatides et des ovocytes. Les cellules ont été prélevées chez des souris aux yeux noirs et à pelage noir. Spermatides et ovocytes ont été prélevés et traités suivant les méthodes que nous avons antérieurement décrites [1, 2].

Activation des ovocytes et électrofusion avec les spermatides ont été réalisées suivant les procédés que nous avons déjà décrits [1, 2].

Transfert des embryons. Des femelles albinos ont été saillies par des mâles vasectomisés. 12 heures après le coït nous avons transféré de 11 à 30 embryons à deux cellules dans l'ampoule de chaque oviducte à l'aide d'une micropipette insérée à travers l'infundibulum.

2. Résultats

50 ovocytes ont été examinés 5 heures après l'application du pulse de fusion ; tous avaient

expulsé un 2ème globule polaire. 30 % des œufs contenaient un grand pronucleus femelle et un petit pronucleus mâle.

475 œufs ont été incubés pendant 20 heures ; 451 d'entre eux (95 %) se sont segmentés (2 cellules). Le taux de segmentation est comparable à celui qui est obtenu par électrostimulation des ovocytes sans injection de spermatides.

346" embryons" à 2 cellules ont été transférés chez 6 femelles pseudogestantes. 3 de ces 6 femelles ont donné naissance à 6 petits dont 4 ont survécu : 2 mâles et 2 femelles aux yeux et au pelage noirs.

Références

1. OGURA A., YANAGIMACHI R. (1993) : *Biol. Reprod.*, 48, 219-225.

2. OGURA A., YANAGIMACHI R., UUSUIN. (1993) : *Zygote*, 1, 1-8.

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

Je serais tenté d'écrire : voila qui se passe de commentaires.

Le lecteur voudra bien se reporter à la lettre à la rédaction de l'équipe bruxelloise qui fait état, dans l'espèce humaine, de l'obtention d'un embryon par micro-injection d'une spermatide dans le cytoplasme d'un ovocyte (page 523 de ce même numéro).

La publication de Atsuo Ogura et al. démontre de façon élégante et définitive qu'il est possible chez la souris, d'obtenir la formation d'individus normaux à partir du génome paternel contenu dans le noyau d'une jeune spermatide, c'est à dire peu après la fin de la méiose.

Cette expérimentation suggère fortement que la différenciation cellulaire au cours de la spermiogénèse et la maturation épididymaire des spermatozoïdes n'ont pour finalité que de rendre les spermatozoïdes aptes à effectuer leur transit dans les voies génitales féminines et à franchir les barrières péri-ovocytaires.

La voie est donc maintenant largement ouverte qui mène à la pratique de la micro-injection de spermatides dans un programme de FIVETE lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir des spermatozoïdes épididymaires mais que la spermatogenèse évolue cependant jusqu'à la formation de spermatides.

Il est évident que nous allons rapidement assister à l'apparition et à la multiplication de demandes de la part de ceux qui n'ont pas d'autre solution pour transmettre un génome issu de leurs propres méioses. Parallèlement nous allons sans doute assister à un regain d'activité des équipes d'assistance médicale à la procréation. Le lecteur, en se reportant, toujours dans le même numéro à l'article L 152-6 de la loi bioéthique (page 514) comprendra que le législateur est très favorable à toute nouvelle technologie susceptible de permettre" la procréation médicalement assistée à l'intérieur du couple" et d'éviter ainsi" l'assistance médicale avec tiers donneur".

Dans un autre registre, le travail de A. Ogura et al pose le problème de savoir si, dans un programme de FIV, par micro — injection du gamète mâle dans l'ovocyte, il n'est pas plus logique d'utiliser une spermatide plutôt qu'un spermatozoïde. On sait que le succès de l'ICSI est lié à la réussite de manœuvres visant à débarrasser le spermatozoïde de certains attributs acquis lors de la spermiogénèse et de la maturation épididymaire : l'acrosome en provoquant la réaction acrosomique ; la mobilité, en cassant le flagelle en arrière de la tête. La chromatine de la spermatide étant moins condensée que celle du spermatozoïde, la nécessaire décondensation intra-ovocytaire devrait en être facilitée.

•••

ENDOCRINOLOGIE

Régulation des caractéristiques du sperme par la dihydrotestostérone chez les hommes présentant un pseudohermaphrodisme par déficit en 5α-réductase de type 2

CAI LQ, FRATIANNI CM, GAUTHIER T, IMPERADO-MCGINLEY J.

Department of Medicine, Division of Endocrinology, Cornell University Medical College, New York, New York 10021 & the Robert Reid Cabral Children's Hospital, Santo Domingo, Dominican Republic.

J Clin Endocrinol Metab. 1994 ; 79 : 409-414.

La production du sperme est un phénomène androgénodépendant. Plusieurs travaux ont démontré que la testostérone (T) joue un rôle important dans la spermatogénèse. Il n'est toutefois pas clairement établi si l'action de la T sur la spermatogénèse est directe ou nécessite sa 5α-réduction préalable en dihydrotestostérone (DHT). Deux gènes codant pour 2 isoformes de la 5α-réductase ont été identifié et clonés. En république dominicaine, plus de 45 sujets d'une famille nombreuse avec consanguinité présentent un déficit congénital en 5α-réductase en raison d'une mutation ponctuelle du gène de la 5α-réductase de type 2. L'enzyme mutée a une activité résiduelle qui n'est que de 5 % de celle de l'enzyme normale. Cette situation particulière permet d'évaluer dans un modèle pathologique humain le rôle de la dihydrotestostérone sur la spermatogénèse.

1. Sujets et méthodes

Neuf sujets masculins, entre 20 et 30 ans, présentant un pseudohermaphrodisme par déficit en 5α-réductase de type 2, ont été étudiés. Sept d'entre aux appartenaient à la famille dominicaine. Ils présentaient un hypospadias perinéoscrotal avec cavité pseudovaginale et absence de prostate palpable. Six sujets avaient les deux testicules en position scrotale, 1 sujet présentait des testicules rétractiles bilatéraux et 2 sujets présentaient une cryptorchidie inguinale unilatérale. Tous les sujets vivaient comme des hommes et avaient demandé une correction de leur hypospadias.

Les échantillons de sperme ont été obtenus par masturbation dans un flacon à large ouverture, après 3 jours d'abstinence sexuelle. Des biopsies testiculaires ont été réalisées chez 4 sujets au moment de la correction chirurgicale de l'hypospadias. T et DHT ont été mesurées dans le sérum par dosage radio-immunologique après chromatographie. Le "prostate specific antigen" (PSA) a été dosé par méthode immunoradiométrique.

2. Résultats

Pour tous les sujets le volume de l'éjaculat est diminué : m ± SEM = 0,4 ± 0,1 ml [<0,05-1ml]. Une augmentation de la viscosité est trouvée pour 6 des 7 échantillons étudiés. La liquéfaction n'a pas eu lieu pour les 8 patients étudiés. Les 4 échantillons étudiés contenaient du fructose. Avant l'intervention de correction de l'hypospadias, 1 patient avait une concentration (321 x 10^6/ml), une numération totale de spermatozoïdes (48,2 x 10^6/éjaculat), une mobilité (56 %), une morphologie (71 % de formes typiques) normales. Les autres patients présentaient soit une azoospermie (3 cas), soit une oligo-asthénospermie (5 cas, dont 3 cas < 1 x 10^6/éjaculât). Cinq patients ont eu une nouvelle étude du sperme après correction chirurgicale de l'hypospadias. Pour l'un des patients, la numération s'est notablement améliorée passant de 2 à 108 x 10^6/ml (1 à 16,2 x 10^6/éjaculat). Après correction chirurgicale de l'hypospadias le volume est resté bas (m±SEM = 0,3 ± 0,1 ml), la viscosité est restée élevée, par contre la liquéfaction s'est normalisée pour les 5 patients étudiés.

Les biopsies testiculaires, réalisées chez 4 sujets, ont montré des altérations des tubes séminifères plus ou moins sévères, sans qu'une relation ne puisse être établie avec les données du spermogramme. Le volume testiculaire varie de 25 à 13 ml pour les testicules en position scrotale et entre 12 et 8 pour les testicules inguinaux ou rétractiles. Comme décrit précédemment, la T est augmentée (32,5 ± 1,6 nmol/l ; N : 10,4-33,0), la DHT diminuée (0,83 ± 0,14 nmol/l ; N : 1,03-2,41), résultant en une augmentation du rapport T/DHT (45 ± 6 ; N : 8-17). Le PSA était indétectable chez tous les patients.

3. Discussion

Le spermogramme de sujets présentant un pseudohermaphrodisme par déficit congénital en 5α-réductase est caractérisé par un volume nettement diminué. Ceci est en accord avec le fait que

la prostate est rudimentaire et que les vésicules séminales sont de petite taille. L'absence de développement de la prostate explique que le PSA soit indétectable. Ces éléments sont en faveur du rôle de la DHT dans le développement de la prostate et des vésicules séminales, comme démontré chez l'animal. L'hypothèse d'une réduction de volume uniquement liée aux difficultés de prélèvement du fait de l'hypospadias perinéoscrotal, ne peut pas être retenue puisque la correction de l'hypospadias ne modifie pas le volume de l'éjaculat. La présence de fructose dans l'éjaculat élimine une obstruction des canaux éjaculateurs. L'augmentation de la viscosité peut être rapprochée de l'absence de PSA qui est une serine protéase impliquée dans la protéolyse de la séminogéline. Toutefois, la normalisation de la liquéfaction après correction de l'hypospadias reste difficile à expliquer. La mobilité des spermatozoïdes est diminuée dans tous les échantillons sauf un. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'asthénospermie : l'hyperviscosité, l'altération des fonctions des vésicules séminales, et l'altération du tube séminifère par la cryptorchidie ou la descente testiculaire retardée. L'histologie testiculaire est variable avec différents degrés d'arrêt de maturation et de sclérose du tube séminifère. Constatations histologiques et spermogrammes n'apparaissent pas en bon accord chez les sujets étudiés. Il est étonnant que 8 patients sur 9 présentent une oligo ou une azoospermie alors que pour 6 patients les testicules étaient en position intrascrotale. Comme, dans le déficit congénital en 5α-réductase, la descente testiculaire peut n'avoir lieu qu'à la puberté, les altérations de la spermatogénèse peuvent fort bien être en rapport avec cette descente testiculaire tardive. Dans cette étude 2 patients avaient des concentrations de spermatozoïdes normales l'un avant, l'autre après la chirurgie. Deux autres sujets décrit précédemment dans la littérature avaient des numérations de spermatozoïdes normales, l'un avec une histologie testiculaire normale.

4. Conclusion

Cette étude montre qu'il est possible d'observer une concentration et une numération totale de spermatozoïdes normales chez un sujet présentant un déficit congénital en 5α-réductase de type 2 et une descente bilatérale des testicules. Bien qu'il soit difficile d'éliminer un rôle de la DHT sur la spermatogénèse, ces cas suggèrent que la DHT n'a pas un rôle majeur sur la spermatogénèse. Les constatations les plus importantes sont une diminution du volume de l'éjaculat avec une viscosité élevée. Le déficit en DHT, affecte surtout la différenciation et le développement de la prostate ainsi que la croissance et les fonctions des vésicules séminales.

***Commentaire** (H. LEJEUNE)*

Cette étude donne une description des caractéristiques du sperme dans une situation clinique rare, le déficit congénital en 5α-réductase de type 2. Ce déficit de l'enzyme de conversion de la T en DHT, qui a fait l'objet d'une revue récente [1], est caractérisé par une absence de développement des structures dérivant du sinus uro-génital, une absence de virilisation des organes génitaux externes, responsable d'un pseudohermaphrodisme masculin, mais par contre un développement normal des structures dérivant des canaux de Wolff. A la puberté, l'activation de l'axe gonadotrope provoque une augmentation de la production de T, assurant l'apparition des caractères sexuels secondaires masculins. Cette pathologie rare représente une situation privilégiée permettant d'étudier quelles sont, dans l'espèce humaine, les structures dont le développement nécessite la transformation de la T en DHT. Les auteurs utilisent ici ce principe pour tenter d'analyser l'effet différentiel de la T et de la DHT sur la spermatogénèse dans l'espèce humaine. Les résultats de l'analyse du spermogramme sont très variables d'un sujet à l'autre. La caractéristique faisant l'unité est la diminution du volume de l'éjaculat, ce qui n'est guère étonnant compte tenu de l'absence de développement de la prostate. On entrevoit que les causes d'anomalie du spermogramme sont multiples et intriquées :

1) *trouble du recueil du fait des malformations des organes génitaux externes,*
2) *anomalies de l'élaboration du sperme lors de l'éjaculation, en raison de l'absence de développement de la prostate, de l'absence de sécrétion prostatique.*
3) *trouble de la spermatogénèse lié à l'anomalie de migration des testicules, situés au niveau du canal inguinal ou dans les formations labio-scrotales et dont la descente ne se complète souvent qu'à la puberté, enfin.*
4) *le rôle éventuel de la DHT sur la spermatogénèse. Les auteurs montrent que l'analyse de ce dernier point est rendu difficile par la coexistence des autres mécanismes d'altération sperme.*

L'existence de quelques cas avec caractéristiques satisfaisantes des spermatozoïdes représente fina-

lement un contre-exemple, montrant qu'une transformation normale de la T en DHT par la 5a-réductase de type 2, n'est pas indispensable à une spermatogénèse suffisante pour permettre d'observer des caractéristiques assez satisfaisantes des spermatozoïdes dans l'éjaculat. On notera que la DHT circulante n'est pas nulle chez ces sujets, en raison de l'activité résiduelle de la 5a-réductase de type 2 et du fonctionnement normal de la 5α-réductase de type 1 convertissant la testostérone elle même sécrétée de manière supérieure à la normale du fait de la stimulation par l'axe gonadotrope. Le fait que dans le déficit congénital en 5α-réductase 2 une spermatogénèse soit possible, n'élimine pas un rôle de la DHT en physiologie. A concentration égale, la DHT est plus efficace que la T pour maintenir la spermatogénèse chez le rat [2], ce qui s'explique par le fait que T et DHT agissent par l'intermédiaire du même récepteur aux androgènes et que l'affinité de la liaison au récepteur est plus élevée pour la DHT que pour la T.

En somme si l'on peut reprocher à cette publication un titre un peu trompeur, elle présente des données intéressantes sur une pathologie rare et offre à notre réflexion l'intrication des phénomènes concourant à l'élaboration du sperme.

Références :

1. *WILSON JD, GRIFFIN JE, RUSSELL DW. : Steroid 5a-reductase 2 deficiency. Endocrine Rev. 1993 ; 14 : 577-593.*
2. *CHEN H, CHANDRASHEKAR V, ZIRKIN BR. : Can spermatogenesis be maintened quantitatively in intact adult ats with exogenously administred dihydrotestosterone. J Androl. 1994 ; 15 : 132-138.*

•••

Les cellules de la lignée spermatogénétique internalisent l'ABP sertolienne : Etude en microscopie électronique chez le rat

H. GERARD*, A. GERARD*, A. EN NYA*, F. FELDEN**, J.L. GUEANT**.

** Laboratoire d'Histologie-Embryologie II, Faculté de Médecine de Nancy I ; ** Laboratoire de Biochimie nutritionnelle, INSERM U308, Faculté de Médecine de Nancy I - 54505 Vandœuvre les Nancy Cedex.*

Endocrinology, 134, n°3 : 1515-1527, 1994.

1. Introduction

Dans les tubes séminifères, les cellules de la lignée germinale sont isolées du sang circulant par la barrière hémotesticulaire et ne sont en contact qu'avec les cellules de Sertoli. L'une des principales fonctions des cellules de Sertoli est d'assurer le transport des substances nutritives aux cellules germinales et d'excréter des facteurs paracrines régulant la spermatogenèse. Potentiellement, chaque protéine excrétée au pôle adluminal de la cellule de Sertoli est susceptible de jouer un rôle dans le déroulement de la spermatogenèse.

Depuis que l'on a établi que le transport d'androgènes aux cellules germinales n'est pas indispensable à leur maturation, on a supposé que l'androgen-binding-protein (ABP) sert au transport des androgènes à travers les voies spermatiques.

Cependant, on a identifié sur les spermatocytes de rat des sites de liaison de l'APB et mis en évidence, à l'aide d'anticorps anti ABP, la présence d'ABP dans le cytoplasme des spermatocytes et des spermatides.

Nous avons recherché dans cette étude à montrer que les cellules spermatogénétiques du rat étaient capables au moins de fixer et peut-être d'internaliser l'ABP.

2. Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé des jeunes rats adultes Wistar. Après sacrifice les testicules ont été disséqués et les cellules de la lignée germinale ont été isolées après homogénisation, filtration et centrifugations ; d'autre part, pour étude *in situ*, des tubes séminifères ont été isolés par microdissection et ouverts longitudinalement pour exposer les cellules au milieu, ou ligaturés à leurs 2 extrémités pour isoler la lumière du tube du milieu.

Pour l'immunocytochimie les cellules isolées ont été étalées sur des lames de verre recouvertes de gélatine. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps monoclonal primaire anti clathrine, puis avec l'anticorps anti IgG de chèvre marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine.

Des extraits testiculaires ont été préparés par homogénisation, centrifugations, dissolution et dialyse. De l'ABP a été couplée à la Δ6-testostérone tritiée, à partir d'extraits testiculaires par la méthode de Taylor. Les cellules germinales

isolées et *in situ* ont été incubées en présence de la testostérone marquée. Les échantillons traités ont été étudiés en microscopie électronique après autoradiographie, pour localisation et quantification des grains d'argent.

3. Résultats

Les cellules germinales contiennent, à tous les stades de la différenciation, les structures en relation avec l'endocytose. Endosomes et corps multivésiculaires sont plus abondants dans les spermatides allongées et dans les corps résiduels.

Les grains d'argents sont présents en grande quantité dans les spermatozoïdes et les spermatides, qu'il s'agisse de cellules isolées ou *in situ*.

Après 15 minutes d'incubation, 10 % des grains sont localisés sur la membrane cellulaire, 90 % sont à l'intérieur, dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le cytoplasme, la plupart des grains sont associées avec l'appareil d'endocytose.

4. Discussion

Les cellules de la lignée germinale du rat sont donc bien capables de capter par endocytose le complexe ABP-testostérone, soit directement à partir d'une phase fluide, soit à partir des cellules de Sertoli.

Cette internalisation est significativement réduite après préincubation avec de l'ABP non marquée ou de l'EDTA. D'autre part, le marquage de la surface concerne principalement les vésicules et les dépressions doublées de clathrine. Il est donc probable que l'ABP se fixe à un récepteur.

Le maximum de marquage nucléaire correspond aux stades cellulaires les plus jeunes (VII et VIII) qui sont les plus nettement testostérone dépendants. Reste cependant posé le problème du mécanisme d'action puisque, jusqu'à présent, on n'a jamais mis en évidence de récepteurs de la testostérone dans les cellules germinales.

L'accumulation d'ABP dans le cytoplasme des stades plus tardifs est d'interprétation difficile mais soulève l'hypothèse d'une rétroaction sur les cellules de Sertoli qui phagocytent les corps résiduels.

Nos observations sur les tubes ligaturés montrent, d'autre part, que les cellules de Sertoli sont capables de capter l'ABP par leur pôle basal et de la transférer aux cellules germinales. Ce phénomène avait déjà été décrit pour la transferrine.

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

Ce travail, conduit avec une méthodologie rigoureuse, apporte la démonstration définitive que les cellules de la lignée germinale du rat sont capables de capter par endocytose l'ABP produite par les cellules de Sertoli.

Le rôle exact du complexe ABP-testostérone sur la lignée germinale reste cependant à élucider.

La récupération, par les cellules de Sertoli, d'une quantité notable d'ABP par la phagocytose des corps résiduels pose le problème intéressant de l'intervention possible de l'ABP, en rétroaction, sur le fonctionnement des cellules de Sertoli et, par là même, sur la régulation de la spermatogenèse.

L'extrapolation des résultats à l'espèce humaine serait imprudente. Notons que la loi bioéthique rend très difficile la recherche sur le testicule humain :" Art. L671-9- Aucun prélèvement à des fins scientifiques autres que celles ayant pour but de rechercher les causes du décès ne peut être effectué sans le consentement du défunt exprimé directement ou par le témoignage de sa famille...

•••

IMMUNOLOGIE

Neutralisation des anticorps antispermatiques dans le sérum de femmes fertiles par des anticorps anti-idiotypiques

R.K. NAZ*, K. AHMAD*, A.C. MENGE**.

** Reproductive Immunology and Molecular Biology Labs. Department of Obstetrics and Gynecology. The Albert Einstein College of Medicine Bronx, New York 10461 ; ** Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109.*

J. of Clin. Invest. 92, 2 331 - 2 338, 1993.

L'équipe de Naz a déjà rapporté plusieurs travaux à propos d'un antigène (Fertilization Antigene : FA-1) qui joue un rôle dans la fertilité humaine. FA-1 est un antigène spermatique situé sur la membrane des spermatozoïdes. Le sérum de patientes infertiles réagit de façon spécifique avec FA-1, indiquant un rôle important de ces anticorps dans les stérilités d'origine immunologique.

L'étude de Naz vise à montrer la présence d'un anticorps anti-idiotypique (ab-2, ou Fab's) dirigé contre un anticorps antispermatozoïde (ab-1, ou Fab'). L'anticorps anti-idiotype se lie avec l'anticorps anti FA-1 et neutralise. L'objectif principal est de comprendre pourquoi les femmes fertiles, qui sont régulièrement exposées aux spermatozoïdes, ont des taux d'anticorps antispermatozoïde indétectables.

1. Matériel et méthode

Trois types de patientes ont été incluses dans cette étude.

24 jeunes femmes en bonne santé et ayant déjà accouché d'un enfant vivant. Les sérums de ces patientes n'avaient pas d'anticorps antispermatozoïde (AC AS) par les différentes méthodes de détection :

technique d'agglutination spermatique, (SAT)
technique d'immobilisation spermatique, (SIT)
et test indirect aux immuno-billes. (IBT)

23 patientes infertiles dont les sérums ont montré la présence par les techniques citées plus haut d'anticorps antispermatozoïde (IBT > 50 %, SAT > 1/2 048, SIT > 1/64.)

Le groupe témoin était composé de 20 sérums de jeunes femmes vierges.

L'antigène FA-1 a été purifié selon les techniques précédemment décrites par l'équipe de Naz. L'anticorps anti FA-1 (Fab') a été obtenu par injection d'hybridome sécrétant l'anticorps anti FA-1 à des souris BALB/c. L'obtention d'anticorps anti-idiotypique témoin a été obtenu par injection à des lapins de l'anticorps monoclonal anti FA-1 (Rb ab-2).

2. Préparation de l'anticorps anti-idiotypique (Fab's)

La préparation de cet anticorps a été réalisée par la technique décrite par Nisonoff. La recherche de l'anticorps anti-idiotypique a été réalisée dans le sérum des trois groupes de patientes, ainsi que dans le sérum des lapins préalablement immunisés par l'anticorps anti F.A. - 1 (Rb ab-2)

L'affinité de Fab's contre l'anticorps anti FA-1 a été confirmée selon la technique d'immuno-affinité sur colonne.

La mise en évidence de l'anticorps anti-idiotypique a été réalisée par une technique ELISA. Les puits d'une microplaque étaient coatés avec l'antigène FA-1 ou l'anticorps anti FA-1 (Fab') ou l'anticorps anti FA-1 contrôle, et incubés avec le Fab's des femmes fertiles, infertiles ou vierges. Le contrôle des techniques ELISA était réalisé avec des puits de microplaques non coatés.

La technique de Western blot a été réalisée selon la méthode décrite par Towbin, pour caractériser l'anticorps anti-idiotypique Fab's.

La confirmation de la présence de l'anticorps anti-idiotypique Fab's chez les femmes fertiles a été réalisée par la technique d'immuno-précipitation compétitive par inhibition de liaison entre ab-2 avec anticorps anti FA-1 Fab' et l'antigène FA-1.

3. Test de pénétration spermatique :

Les tests de pénétration spermatique d'ovocytes de hamster dépellucidés ont été réalisés avec du sperme capacité. Le sperme à la concentration de 5 10^6/ml était incubé une heure à 37° avec les solutions tests contenant l'anticorps anti FA-1 Fab'. La solution était ensuite incubée trois heures à 37° avec 10 à 20 ovocytes de hamsters obtenu par superovulation.

Les ovocytes étaient ensuite lavés, colorés par une solution d'acridine orange (0,2 %) et le pour-

centage était déterminé par la présence de tête spermatique fluorescente dans le cytoplasme ovocytaire. Ce test a été répété deux à 5 fois avec des sérums de trois femmes fertiles, de deux patientes infertiles, et d'une patiente vierge.

IB test :

Un IB test indirect a été réalisé selon la technique décrite par Bronson. Fab's de femme infertile ou de femme fertile était incubé avec des spermatozoïdes mobiles sans anticorps. Après incubation d'une heure à 37° les spermatozoïdes étaient lavés, resuspendus dans du PBS contenant 0,1 % de BSA pour réaction avec les immunobilles. Une réaction était notée positive si une bille ou plus était liée à un spermatozoïde et si plus de 10 % des spermatozoïdes mobiles étaient agglutinés.

Afin de confirmer que les réactions observées dans le test de pénétration spermatique IB Test étaient dues à la présence dans le sérum de femmes fertiles de l'anticorps anti-idiotypique Fab's, il a été réalisé une immunopurification de Fab's dans ces sérums. Les sérums de femmes fertiles ou infertiles étaient incubés une nuit à 4°C avec soit l'anticorps anti FA-1 Fab' ou l'anticorps contrôle anti FA-1. Après dialyse, l'action des anticorps anti-idiotypiques Fab's était explorée par neutralisation des effets des anticorps anti FA-1 Fab' par le test de pénétration spermatique et par inhibition des liaisons spermatiques des anticorps antispermatozoïdes à l'IB Test.

4. Résultats

L'antigène FA1 de cette étude montrait une bande en 49 - 51 kD. Fab's purifié de sérum des trois groupes de patientes, l'anticorps anticorps FA-1 de lapin (Rb ab-2) et les anticorps contrôles montraient tous une simple bande en 40 - 40 kD.

Les ELISA réalisés avec antigène anti FA-1 étaient négatifs lorsque l'anticorps utilisé était l'anticorps Fab' s de femme fertile ou vierge (aucun sérum ne réagissait avec l'antigène FA-1) alors que 70 % des Fab' s des femmes infertiles réagissaient positivement avec l'antigène FA-1. A l'opposé, 71 % des Fab' s de femmes fertiles montraient une réaction fortement positive lorsque l'ELISA était réalisé avec l'anticorps anti FA-1 Fab's. La même réaction avec les Fab' s de femmes fertiles était positive que dans 13 % des cas (3/23). Aucun des 12 sérums de femmes non exposées aux spermatozoïdes ne réagissait avec l'anticorps anti FA-1 Fab'.

La présence de l'anticorps anti-idiotypique chez les femmes fertiles a été confirmée par Western blot. L'anticorps anti FA-1 Fab' réagit spécifiquement avec une bande correspondant à une immunoglobuline G. Le Western blot réalisé avec des sérums de femmes infertiles montrait aussi une bande correspondant à une immunoglobuline G. Néanmoins, l'intensité de la réaction était nettement plus élevée avec l'immunoglobuline G de femmes fertiles. Les Western blot réalisés avec les sérums de femmes vierges, non exposées aux spermatozoïdes ne montrent pas de bande d'arrêt correspondant à l'immunoglobuline G des patientes fertiles : elles n'ont pas de Fab's dans leur sérum.

Les effets biologiques de Fab' s de 4 femmes fertiles ont été mis en évidence par les tests de pénétration spermatique. L'anticorps anti-idiotypique Fab' s de 3 femmes fertiles qui montrait une réaction positive avec l'antigène Fa-1 en ELISA a révélé une neutralisation significative de l'activité des anticorps anti Fa-1 Fab' sur des tests de pénétration d'ovocyte de hamster. Les Fab's isolés à partir de sérum de femme infertile ont eu des effets additifs : au lieu de neutraliser les effets des anticorps anti Fa-1 Fab', ils diminuent de façon non significative les taux de pénétration spermatique par rapport au test utilisant uniquement l'anticorps anti FA-1. L'anticorps anti-idiotype Fab's de deux femmes vierges ne neutralisait pas l'anticorps anti FA-1 Fab'.

L'anticorps anti-idiotypique ab-2 présent dans le sérum de 4 femmes fertiles était capable de neutraliser la réaction de l'IB Test, à concurrence de 100 % l'activité agglutinante des spermatozoïdes à partir de sérum de 8 femmes infertiles. Néanmoins, il existait de larges variations dans la capacité neutralisante parmi les Fab' s des différentes femmes fertiles. L'incubation de Fab' s provenant de femmes infertiles avec d'autres Fab's d'autres femmes infertiles montrait un effet additif au niveau de l'agglutination des spermatozoïdes plutôt qu'un effet neutralisant.

5. Discussion

La présence d'un anticorps anti-idiotypique a été confirmé par les différentes expérimentations chez les femmes fertiles. L'absence ou la présence à des taux bas d'anticorps ab-2 chez les femmes infertiles suggère que cet anticorps joue un rôle important dans les infertilités inexpliquées. Les anticorps trouvés dans le tractus génital féminin dépendent à la fois du système immunitaire local (plutôt Iga) et du système

immunitaire systémique (plutôt IgG et IgM). Le liquide folliculaire contient à peu près le même type d'anticorps et aux mêmes concentrations que le sérum. Les sécrétions cervicales et tubaires contiennent approximativement la même quantité d'IgA et IgG alors qu'au niveau utérin la sécrétion d'IgG est dominante.

***Commentaires** (B. SALLE)*

L'énorme travail de Naz est une confirmation supplémentaire de la théorie évoquée pour la première fois par Jerne de l'immunomodulation. A notre connaissance, c'est la première fois que la théorie de Jerne est appliquée en reproduction humaine. Pour Jerne notre statut immunitaire serait le résultat d'un équilibre entre réaction idiotypique et réaction anti-idiotypique. L'immunité anti-idiotypique est suspectée de jouer un rôle important dans la régulation des réponses d'auto-immunité. La maladie auto-immune serait une résultante de la diminution de la réaction anti-idiotypique. La thérapeutique anti-idiotypique a été proposée comme traitement, avec plus ou moins de succès, des maladies auto-immunes comme le lupus erythémateux disséminé ou la poly-arthrite rhumatoïde.

Les femmes fertiles, exposées quotidiennement aux spermatozoïdes, développent des anticorps antispermatozoïdes. Les anticorps antispermatozoïdes sont immédiatement neutralisés par des anticorps anti anticorps spermatozoïdes. Dans les infertilités féminines d'origine immunologique, il y aurait un déséquilibre entre la réponse immunitaire et anti-immunitaire :

- *soit absence de réponse anti-idiotypique,*
- *soit réaction idiotypique exagérée supérieure à la réaction anti-idiotypique.*

Alors que les femmes vierges, jamais exposées au sperme, n'auraient pas encore développé de réaction anticorps.

Les travaux de Naz montrent une fois de plus, s'il était encore nécessaire, que les spermatozoïdes sont immunogènes ; et surtout ces travaux montrent que le tractus génital féminin n'est pas un site immunitaire privilégié. La pénétration de protéines hétérologues induit nécessairement au niveau local et au niveau systémique la production d'anticorps. La fertilité serait la résultante d'un équilibre entre la production immunitaire et la régulation de cette dernière. On peut là établir un parallèle avec l'allogreffe que constitue la grossesse. Bien que le système immunitaire des femmes enceintes soit modifié, il est capable dans certains cas, et notamment dans la pathologie gravidique de développer une défense immunitaire contre leur fœtus. La grossesse normale est la résultante d'un équilibre entre les phénomènes d'immunosupression locale et les phénomènes de réaction immunitaire contre les protéines hétérologues du fœtus.

Cette étude suggère que toute femme régulièrement exposée aux spermatozoïdes produit des anticorps antispermatozoïdes (ab-1) qui eux-mêmes génèrent la production de leur anti-idiotype (ab-2), ces anti-idiotypes neutralisent les effets de ab-1. A l'inverse, chez les femmes infertiles, la production de ab-2 est soit trop faible, soit absente, cette insuffisance de production induit une infertilité. Les troubles de la production d'anticorps anti-idiotypes peuvent résulter soit l'absence de production de ab-2 soit d'une hyperimmunisation due aux antigènes spermatiques se produisant pour des raisons jusqu'alors inconnues. Il a déjà été évoqué que les infections au niveau du tractus génital féminin pourraient, par l'afflux de cellules immunocompétentes locales, induire une réponse unitaire aux protéines spermatiques immunitaires exagérée.

Ces travaux pourraient dans un avenir plus ou moins proche trouver leur application dans le développement de vaccins contraceptifs contre les spermatozoïdes ou dans le traitement des infertilités immunologiques. Naz propose de traiter les infertilités immunologiques par injection de Gamma Globulines Sériques de femmes ayant accouché.

•••

SEXOLOGIE

6th World Meeting on Impotence
Singapour, 12-16 Septembre 1994

International Journal on Impotence Research,
Vol. VI, Suppl.1, Sept.1994.

Les aspects fondamentaux concernant la physiologie et plus particulièrement la neurophysiologie de l'érection ont fait l'objet de nombreuses communications. Ces travaux expérimentaux apportés étaient le plus souvent réalisés *in vivo* chez le rat ou concernaient des études pharmacologiques menées sur des lambeaux de corps caverneux humains ou animaux.

Concernant la commande de l'érection par le système nerveux central, deux études ont montré la possibilité d'induire une tumescence des corps caverneux chez le rat anesthésié par la stimulation de l'aire pré-optique médiane ou du noyau paraventriculaire, deux noyaux hypothalamiques largement impliqués dans les fonctions de reproduction (RAMPIN et al, CHEN et al). A partir d'un modèle d'érection provoquée par l'administration d'apomorphine, la déplétion de l'organisme en monoxyde d'azote (NO) d'origine neuronale n'empêche pas la survenue des érections ainsi induites (ADAMS et al).

Au niveau des corps caverneux la colocalisation, c'est-à-dire la présence de plusieurs neuromédiateurs au sein d'une même terminaison nerveuse, a pu être confirmée : en particulier la présence conjointe de VIP et de NOS (enzyme de synthèse du monoxyde d'azote) a été démontrée (HEDLUND et al, ADAIKAN et al). La présence de neuropeptides proches du VIP tel que le PACAP ou bien l'hélospectine a été établie au sein des terminaisons nerveuses du corps caverneux. Ces neuropeptides sont capables *in vitro* de relâcher la fibre musculaire lisse caverneuse (ANDERSON et al.). Au sein des fibres musculaires lisses des corps caverneux il semble que le cGMP plutôt que le cAMP soit le nucléotide cyclique actif impliqué dans la relaxation (STIEF et al). D'autre part, pour expliquer la synergie d'action des très nombreuses fibres musculaires lisses caverneuses à partir d'un nombre plus restreint de terminaisons nerveuses libérant les neuromédiateurs responsables du contrôle du tonus musculaire, la présence de jonctions étroites entre les cellules musculaires (gap junctions) a été bien démontrée. Les fibres musculaires lisses caverneuses constituent ainsi un véritable syncytium fonctionnel (CHRIST et al). Par ailleurs il a été démontré *in vitro* que la prostaglandine EI inhibait la fabrication de collagène au sein du tissu caverneux en prévenant la synthèse du facteur de croissance TGF béta 1 (SAENZ de TEJADA et al).

Deux communications ont présenté des résultats concernant la mesure de pression pénienne chez le rat enregistrées par télémétrie après implantation d'un dispositif miniaturisé. Les auteurs ont rapporté les variations de pressions enregistrées au cours de la copulation (GIULIANO et al) et également pendant des érections spontanées dont certaines sont très probablement associées aux épisodes de sommeil paradoxal (BERNABÉ et al). L'importance de ce nouveau modèle physiologique a été soulignée par la remise du prix de la meilleure communication. Un réflexe urétrogénital a par ailleurs été mis en évidence chez le rat : il consiste à déclencher des érections et des éjaculations par la stimulation mécanique de la muqueuse urétrale démontrant ainsi l'importance de la sensibilité de cette muqueuse dans le déclenchement de l'activité sexuelle chez cet animal. Par ailleurs des comparaisons électromyographiques effectuées entre le rat et l'homme permettent de penser que ce réflexe urétrogénital est comparable à l'orgasme masculin (MC KENNA et al).

Le rôle de la testostérone a fait l'objet de plusieurs communications. Le rat castré présente des érections moindres en réponse à la stimulation du nerf caverneux (CARRIER et al, BROCK et al). L'érection est restaurée lorsque les animaux sont supplémentés en testostérone. Par ailleurs chez le rat castré, on observe une diminution du nombre des fibres nerveuses renfermant l'enzyme de synthèse du monoxyte d'azote (NO). Chez le lapin la castration entraîne une diminution de la densité des récepteurs alpha 1 adrénergiques au sein des corps caverneux (KINURA et al). Enfin l'effet du vieillissement a également été étudié. Chez le rat âgé la fréquence des érections pharmacologiquement induites est diminuée et la supplémentation en testostérone ne restaure pas la fonction érectile défaillante. Le nombre de fibres nerveuses nitrergiques au sein des corps caverneux diminue lors du vieillissement. Le tissu caverneux lui même est moins sensible à des agents myorelaxants comme la papavérine et plus sensible à l'action myocontractante de la noradrénaline.

(Compte rendu de F. GIULIANO)

•••

Programme d'auto-injection intra-caverneuse : analyse des résultats et complications

R. VALDEVENITO, A. MELMAN

Department of Urology, Albert Einstein Collège of Medicine, Montefiore Medical Center, Bronx, New York, USA

International Journal of Impotence Research. 1994, 6 : 81-91.

254 patients âgés de 27 à 91 ans ont été inclus dans le programme.

Ils ont reçu, pour la plupart, une association triple de : 150 mg de PAPAVERINE, 5 mg de PHENTOLAMINE, et 50 microgrammes de PROSTAGLANDINE E1 dans 2,4 ml de sérum salé ave une dose initiale de 0,2 ml par injection. Les explorations de l'impuissance avaient conclu à 22 % de patients psychogènes, 45 % de vasculaires, 22 % de diabétiques et 3 % de neurologique.

Le taux d'abandons a été de 38,6 dont 25 % de perdus de vue dans les 10 premiers mois, contre 21 à 66 % pour les autres auteurs cités dans l'article.

13 % ont souhaité changer de traitement après 8 mois (en moyenne), surtout dans le groupe des patients vasculaires, et ont opté le plus souvent pour une prothèse pénienne.

Le taux de complication n'a été que de 1,6 % d'érection prolongée et 5,9 % de fibrose.

Il est important de signaler que la majorité des abandons (70 %) correspondaient à des patients vasculaires ou diabétiques.

(M. BUVAT-HERBAUT

•••