

Apoptose et spermatogenèse

Dominique ROYERE, Fabrice GUERIF, Véronique LAURENT-CADORET,
Marie-Thérèse HOCHEREAU DE REVIERS

UMR 6073 «Physiologie de la Reproduction et des Comportements»
Inra / Cnrs / Université de Tours. Tours, France

RESUME

L'initiation de la spermatogenèse s'accompagne d'une vague d'apoptose qui limite l'efficacité des premiers cycles spermatogénétiques chez la plupart des mammifères. Au delà des premiers cycles, le rendement théorique n'est jamais atteint traduisant l'existence d'une perte cellulaire. Parmi les cellules germinales, les spermatogonies sont des cibles privilégiées d'une apoptose physiologique. Ce processus est étroitement lié aux relations établies par les cellules germinales avec les cellules de Sertoli, le concept de régulation densité dépendante datant de la fin des années 80. La nécessaire synchronisation des étapes de la spermatogenèse exige que le cycle cellulaire progresse plutôt qu'il ne s'arrête, ce qui pourrait expliquer la plus grande sensibilité des cellules germinales à l'apoptose. Le prix à payer est que l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire peut être facilement perturbé dans l'un ou l'autre sens.

Les premières approches réalisées pour comprendre les mécanismes en jeu dans l'apoptose des cellules germinales ont exploré sa dépendance hormonale (hormones gonadotropes, stéroïdes). Cependant, les situations observées ne permettaient pas d'établir de lien direct avec les voies de transduction et les mécanismes de régulation de l'apoptose au niveau testiculaire. Les étapes qui ont suivi concernent le démantèlement des voies de transduction impliquées dans l'apoptose et leur régulation au cours de la spermatogenèse.

L'implication des gènes de la famille *Bcl-2* est reconnue même si l'expression de certains de ses membres reste controversée. Les données résultant de la surexpression de certains gènes (*Bcl-2*, *Bcl-xl*) et les données issues des inactivations de

certains gènes (*Bax*) confirment le rôle exercé par ces gènes dans le contrôle de l'apoptose au niveau testiculaire tout en soulignant la stricte nécessité d'une régulation densité dépendante de la spermatogenèse. Plus récemment des profils d'expression de ces gènes ou protéines ont été décrits, avec des variations susceptibles d'expliquer certains résultats contradictoires de la littérature.

La place du système Fas/Fas ligand dans l'apoptose physiologique accompagnant les premiers cycles spermatogénétiques reste controversée alors que sa mise en jeu lors de certaines agressions chimio ou radio-thérapeutiques est admise. Cependant, l'inactivation du gène codant pour Fas ou son ligand ne génère pas d'infertilité ce qui limite son importance physiologique au niveau testiculaire.

L'identification et le démantèlement du système TNF (Tumor Necrosis Factor) et de ses récepteurs ne fait que commencer. L'expression de certaines protéines impliquées dans cette voie ou reliées à cette voie a été confirmée au niveau testiculaire mais semble plutôt concerner des étapes post-méiotiques de la spermatogenèse.

Parmi les oncogènes susceptibles de réguler ce phénomène, le couple *Kit/Stem Cell Factor* occupe une place singulière du fait de son expression au niveau testiculaire et de son rôle bien établi au cours du développement gonadique ainsi que dans la survie et la prolifération des spermatogonies dif-

Correspondance :

Pr Dominique Royère - Biologie de la Reproduction, UMR
«Physiologie de la Reproduction et des Comportements»
Inra / Cnrs / Université de Tours, Chu Bretonneau, Faculté de
Médecine, 37044 Tours cedex - Tel 02.47.47.47.46 -
Fax 02.47.47.84.99 - Email royere@med.univ-tours.fr

férenciées. En utilisant un modèle transgénique de souris hétérozygote pour l'inactivation par transgène du gène *Kit*, nous avons pu montrer l'incapacité d'une seule copie du gène *Kit* à préserver une spermatogenèse et une fertilité normales chez la souris. En outre les résultats observés suggèrent l'intervention de ce gène à différentes phases de la spermatogenèse, selon des voies de transduction qui pourraient diverger.

Au total l'analyse des voies et mécanismes contrôlant l'apoptose au cours de la spermatogenèse sont des étapes clés pour la compréhension de certains troubles de la spermatogenèse comme de la genèse des tumeurs testiculaires à cellules germinales.

Mots-clés : *apoptose, spermatogenèse, Bcl2, Fas, TNF, Kit, SCF*

I. INTRODUCTION

La spermatogenèse implique l'ensemble des étapes de division et différenciation des cellules germinales aboutissant aux cellules germinales matures, les spermatozoïdes. C'est un processus dynamique fortement synchronisé dont l'efficacité est en partie conditionnée par le rendement des étapes de division comme de différenciation. Si la perte cellulaire observée lors de ces étapes est établie depuis de nombreuses années, en revanche ce n'est que plus récemment que le concept d'apoptose ou mort cellulaire programmée s'est substitué au terme de dégénérescence [26, 3]. Différents travaux ont permis de préciser que les spermatogonies étaient les cibles principales de ce processus dans le tube séminifère en s'appuyant sur certains modèles. L'objectif de cette synthèse est de fournir quelques exemples empruntés à des modèles animaux ou à des situations expérimentales chez l'homme, afin d'apprécier l'importance que revêt ce concept de mort cellulaire programmée dans la mise en place et le maintien de la spermatogenèse dans des conditions physiologiques. A cette fin, nous envisagerons successivement les premières approches expérimentales s'appuyant sur la privation hormonale ou la cryptorchidie, puis les études ayant permis d'appréhender certaines voies de transduction impliquées dans la commande, le contrôle ou l'exécution du processus apoptotique au niveau de la lignée germinale.

II. PRIVATION HORMONALE, CRYPTORCHIDIE EXPERIMENTALE

Les approches réalisées ont d'abord fait appel à l'hypophysectomie suivie d'une supplémentation hormonale [45]

montrant l'action promotrice de la FSH et de la testostérone sur la survie des cellules germinales. Peu de temps après, le recours aux antagonistes de la GnRH a permis de mieux préciser l'action de FSH [9, 43, 12], y compris avec l'adjonction possible de FSH recombinante [26]. L'action ambivalente de la testostérone a également été soulignée avec, selon les conditions expérimentales et le stade spermatogénétique, une action favorisante sur l'apoptose ou promotrice de la survie des cellules germinales [46, 26]. Les études s'appuyant sur la cryptorchidie expérimentale ont souligné pour leur part les stades spermatogénétiques les plus sensibles [24, 25] et l'importance des interactions locales intra-testiculaires dans la régulation de la survie des cellules germinales [42]. Cependant, une approche intégrative de ce type ne pouvait se concevoir sans que l'analyse des voies de transduction impliquées dans le déroulement de l'apoptose ne soit réalisée au niveau testiculaire.

III. Bcl-2 ET SPERMATOGENESE

Homologues du gène *CED-9* identifié chez *C elegans*, les gènes de type *Bcl-2* constituent une famille caractérisée par certains domaines structuraux partagés par ses membres. C'est en particulier le cas du domaine BH3 (*Bcl-2* homology) qui intervient dans les interactions protéine – protéine responsables des homo- ou hétéro-dimérisations qui conditionnent l'activité de ces gènes [2]. On peut ainsi distinguer trois sous-familles, celle de *bcl-2* promotrice de survie cellulaire (*Bcl-2, Bcl-xlong, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Nr13*), celle de Bax (*Bax, Bcl-xshort, Bak, Bok*), et celle limitée à la conservation du domaine BH3 (*Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid*) incapable de former des homodimères, ces deux sous-familles promotrices d'apoptose. Nous évoquerons successivement les modèles murins de sur-expression ou dominants négatifs de ces gènes, les études ayant précisé le profil d'expression de certains de ces gènes chez le rat et chez l'homme.

1. Dys-expression de *bcl-2*, sur-expression de *bcl-XI* chez la souris

L'importance de la vague d'apoptose accompagnant le premier cycle spermatogénétique a été clairement démontrée par les expériences permettant d'obtenir l'expression au niveau du testicule du gène *bcl-2* qui ne l'est pas normalement et/ou la surexpression d'un gène de la même sous-famille qui est lui normalement présent au niveau testiculaire (*bcl-XI*). La première conséquence de leur expression sous la commande du promoteur du gène domestique de la phosphoglycérate kinase 1 est une augmentation de la densité des spermatogonies dans les tubes séminifères à trois semaines avec une nette diminution du nombre des cellules apoptotiques alors qu'à l'âge adulte les tubes séminifères sont partiellement déshabités et comportent des cellules

géantes multinuclées. Cet aspect est très comparable à celui décrit chez les souris présentant un k.o. (knock out) pour le gène *bax* [28].

2. Profil d'expression des protéines bcl-2 chez le rat

Cette étude a permis de suivre l'expression de certaines protéines du groupe bcl-2 avec une augmentation de l'expression des protéines à la fois pro-apoptotiques *bcl-2*, *bax*, et anti-apoptotiques *bcl-xl* et *bcl-w* au cours du premier cycle spermatogénétique maximale à 20 jours [47].

3. Profil d'expression des protéines bcl-2 chez l'homme

On dispose de peu de données chez l'homme. L'expression de bcl-X a été retrouvée au niveau des spermatogonies, alors que l'expression de bcl-2 et *bax* était plutôt le fait des spermatozoïdes et des spermatides, dans des prélèvements autopsiques en dehors de troubles avérés de la spermatogenèse [34] suggérant une compartimentalisation et des rôles différents pour ces protéines au cours de la spermatogenèse.

IV. FAMILLE TNF ET SPERMATOGENESE

1. Fas, Fas Ligand et spermatogenèse

Fas L appartient à une famille de protéines incluant TNF (Tumor Necrosis Factor), la lymphotoxine α , APO3L, APO2L ou TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) capables de se lier à des récepteurs spécifiques (Fas, TNF-R1, TNF-R2, DR3, DR4, DR5) comportant un segment dans leur région intra-cytoplasmique d'environ 80 Acides Aminés appelé «Domaine de mort cellulaire = DD». Leur trimérisation permet le recrutement de protéines effectrices comportant un domaine comparable (DD) ainsi qu'un «domaine effecteur de mort = DED» à leur tour capable de recruter des pro-caspases (pro-caspase 8 notamment). L'ensemble constitue un «complexe de signalisation inducteur de mort = DISC» [5].

a) Données expérimentales chez les murins

Elles sont relativement contradictoires. Les premiers travaux ont montré l'expression protéique de Fas au niveau des cellules germinales, de Fas L au niveau des cellules de Sertoli chez le rat, avec une expression accrue à la suite d'une exposition à deux toxiques sertoliens (MEHP = Mono 2EthylHexyl Phtalate; 2,5 HD = Hexane Dione) ou une survie abaissée en présence d'anticorps anti-Fas ou d'antisens de Fas L chez le rat et chez la souris [29]. L'apoptose induite par le couple Fas – Fas L constituerait ainsi un mode de réponse à des agressions dirigées contre la cellule de Sertoli ou les cellules germinales [30]. Enfin, l'importance physiologique de Fas au cours de la sperma-

togenèse ne devrait pas être sous-estimée sur l'argument de l'absence de troubles de la spermatogenèse chez les souris déficientes pour le gène de Fas (souris *lpr*, [1]) car ces animaux continuent d'exprimer au niveau testiculaire ce gène [29]. L'expression accrue des messagers de Fas et Fas L au niveau testiculaire chez le rat entre 16 et 32 jours de vie parallèlement à la vague d'apoptose observée dans cette période constituait un autre argument en faveur de l'implication physiologique de Fas dans ce phénomène [11]. Des travaux plus récents ont révélé des résultats assez différents, puisque, chez le rat aucun ARN de Fas L n'est détecté au niveau des cellules de Sertoli entre J10 et l'âge adulte, alors que qu'ils sont détectés au niveau testiculaire à partir de J30. En outre l'irradiation *in utero* des rats femelles retarde l'apparition de la spermatogenèse qui ne se trouve restaurée qu'à partir de 63 jours, date à partir de laquelle l'expression de Fas L est seulement détectée. Enfin la cryptorchidie expérimentale unilatérale chez le rat adulte s'accompagne de la disparition de la lignée germinale ainsi que de l'expression de Fas L, alors que lignée germinale et expression de Fas L sont préservées au niveau du testicule controlatéral laissé en place [13]. Cette expression concerne les spermatozoïdes et les spermatides chez le rat comme chez la souris, seules les spermatides allongées et les spermatozoïdes exprimant la protéine. Ces résultats remettent clairement en cause l'impact physiologique du couple Fas – Fas L sur le développement de la spermatogenèse tout en argumentant un rôle plus tardif en reproduction [38].

b) Données obtenues chez l'homme

Il s'agit d'abord de données expérimentales résultant de l'évaluation de l'apoptose observée sur des cellules germinales issues de segments de tubes séminifères incubés avec ou sans sérum et hormones [36]. L'absence de sérum et d'hormones s'accompagne d'une augmentation très nette de l'apoptose des cellules ainsi cultivées au bout de quatre heures. Ce phénomène est largement inhibé tant par la présence d'un anticorps anti-FasL que par l'addition d'un inhibiteur de caspases (Z-VAD FMF = FluoroMethyl Ketone).

L'expression de Fas et Fas L a été retrouvée chez l'homme par RT-PCR quantitative au niveau du testicule adulte, mais pas au niveau du testicule fœtal. En outre dans une approche préliminaire distinguant des situations à spermatogenèse normale, à spermatogenèse bloquée au stade pré-méiotique ou post-méiotique, une augmentation significative des cellules germinales exprimant Fas dans le cas d'un blocage post-méiotique a été observée [19].

2. TNF, TRAIL et spermatogenèse

Les similitudes entre les systèmes Fas et TNF ont déjà été évoquées en particulier en ce qui concerne la trimérisation

des récepteurs et les domaines de mort ou effecteurs de mort. Les protéines recrutées diffèrent (TNFR associated death domain protein = TRADD) ou non (Fas associated death domain protein = FADD), mais la voie de signalisation apoptotique aboutit au recrutement et à l'activation de la pro-caspase 8. Mais pour TNF une autre voie de signalisation existe, celle-ci plutôt anti-apoptotique, qui fait intervenir une autre protéine (TNFR associated factor 2) capable de recruter une protéine RIP (Receptor Interacting Protein) et d'activer la voie NFkB, pour initier la transcription de protéines inhibitrices de l'apoptose (cIAP 1 et 2 = cellular inhibitor of apoptosis). Les voies empruntées par TNF peuvent donc aboutir, selon la situation et le compartiment cellulaire, à un signal pro- ou anti-apoptotique [5].

a) Données expérimentales chez les murins

L'ontogenèse de TRAIL et de ses récepteurs a été établie chez le rat. L'expression de TRAIL a été observée dans la gonade fœtale et adulte au niveau des cellules de Leydig comme des cellules germinales en terme d'ARNm et de protéine. En revanche, les récepteurs de type 1 (DR4) et de type 2 (DR5) ne sont observés qu'au niveau des cellules de Leydig pour DR5 et au niveau des cellules germinales post-méiotiques pour DR4, les autres récepteurs étant des récepteurs incomplets ou récepteurs leurres [21]. De tels résultats ne sont pas en faveur d'une action du système TRAIL lors de l'installation de la spermatogenèse et dans l'apoptose spermatogonale.

b) Données obtenues chez l'homme

La présence de récepteurs de type 1 du TNF a été détectée par immunochimie sur des coupes de testicules humains au niveau des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig. L'expression du TNF au niveau des cellules germinales (spermatocytes pachytènes et spermatoïdes ronds) est établie. Sur des préparations de segments de tubes séminifères, l'apoptose induite par l'absence dans le milieu de culture de sérum et d'hormones est partiellement inhibée de façon dose dépendante en présence de TNF α [37]. Cette inhibition ne s'accompagne pas de variation significative de l'expression de NFkB, alors que l'expression de Fas L se trouve partiellement inhibée en présence de TNF α . Ces résultats suggèrent l'intervention possible de TNF α dans le contrôle de l'apoptose des cellules germinales par le biais au moins d'un contrôle de l'expression de Fas ligand.

V. P53 ET SPERMATOGENESE

Les données disponibles concernent les murins. L'expression et l'action pro-apoptotique du gène suppresseur de tumeur P53 a été établie au niveau des cellules germinales primordiales [32], des spermatogonies A1 [8] et des spermatoïdes primaires [50]. Il faut distinguer parmi les voies de signalisation mises en jeu par p53, celles qui sont

dépendantes (expression de Fas, Bax, stress oxydatif) ou non (Bcl-2) de séquences spécifiques transactivatrices [44]. L'augmentation de l'expression de la protéine pendant les quatre premières semaines de vie chez la souris [39] et le doublement observé des spermatogonies indifférenciées chez les souris présentant un KO de ce gène [8] argumentent pour un rôle de p53 au cours de l'installation de la spermatogenèse. Inversement la surexpression de p53 chez la souris au niveau des cellules germinales post-méiotiques s'accompagne selon le niveau de cette surexpression, soit d'un trouble majeur de la spermatogenèse avec disparition des spermatoïdes, soit d'une subfertilité marquée par une térazoospermie chez les mâles, soit d'une fertilité conservée [4]. Ces dernières observations suggèrent un véritable effet dose pour cette protéine permettant de comprendre la diversité de ses fonctions au niveau testiculaire. L'implication de p53 dans les agressions exogènes sur le testicule (radio ou chimiothérapeutiques en particulier) ne sera pas abordée ici.

Au total la plupart des exemples fournis par les situations expérimentales décrites constituent autant d'arguments en faveur d'une régulation densité – dépendante de la population des cellules germinales, concept avancé dès les années 80 pour souligner l'importance d'un équilibre numérique entre cellules somatiques (cellules de Sertoli) et cellules germinales pour assurer l'efficacité de la spermatogenèse [14]. Celle-ci va donc mettre en jeu un équilibre entre des facteurs promouvant l'apoptose (Fas, TRAIL, TNF α , protéines Bcl-2, p53) et des facteurs promouvant la survie cellulaire (protéines Bcl-2, TNF α et Kit/SCF).

VI. KIT/SCF ET SPERMATOGENESE

L'impact du couple Kit/Stem Cell Factor (Kit ligand) sur la spermatogenèse est attesté par différents arguments. L'expression de Kit au niveau de certaines cellules germinales et des cellules de Leydig, et l'expression de son ligand au niveau des cellules de Sertoli du testicule sont établis. Les mutations spontanées observées sur chacun de ces deux gènes (White Spotting pour *Kit*, Steel pour *SCF*) s'accompagnent généralement d'un défaut de migration de cellules germinales primordiales et affectent leur survie. En outre le couple Kit/SCF est également impliqué dans la survie des spermatogonies différenciées. Enfin on ne peut exclure un rôle possible d'une forme tronquée de Kit au niveau des cellules germinales post-méiotiques.

1. Données structurales

Le gène correspondant au locus W est situé sur le chromosome 5 chez la souris, 4 chez l'homme (4q12) et comporte 21 exons. Il existe deux types d'ARN messagers codés par ce gène, un long (5,5 kb) et au moins deux courts (3,2 et 2,3 kb) qui sont des transcrits alternatifs sous la dépendan-

ce d'un promoteur cryptique situé dans le seizième intron. Les protéines résultantes sont soit la forme complète (140-160 kDa) qui s'intègre dans la famille des récepteurs de type tyrosine kinase, soit la forme tronquée (tr-Kit, 24-30 kDa) qui est réduite au second domaine catalytique à activité phosphotransférase et à l'extrémité cytoplasmique de Kit [40].

Le gène correspondant au locus Steel est situé sur le chromosome 10 chez la souris, 12 chez l'homme et comporte 9 exons. Les ARN messagers codés par ce gène résultent d'un épissage alternatif qui inclut ou ignore l'exon 6. Il en résulte deux formes transmembranaires, l'une longue (45 kDa) comportant un site de clivage protéolytique permettant la libération facile d'une forme soluble, l'autre plus court (32 kDa) ne possédant pas ce site de clivage et disposant d'un site beaucoup moins efficace [6]. L'équilibre entre ces deux formes est âge et développement dépendant et fait aussi intervenir une régulation hormonale (FSH).

2. Expression et fonctions gonadiques de Kit et SCF

L'importance fonctionnelle du couple Kit/SCF repose sur un ensemble d'arguments issus de l'analyse de mutations spontanées des loci W et Steel et des données acquises *in vitro*. Brièvement, les mutations observées à l'état homozygote sur ces deux loci s'accompagnent d'un défaut de migration des cellules germinales primordiales (CGP) lors de la constitution de la gonade primitive. L'action de Kit sur les CGP concerne à la fois leur migration et leur survie [31, 20]. Un autre stade d'expression de Kit est représenté par les spermatogonies différenciées qui sont tributaires de ce gène pour leur prolifération [51, 35, 33]. La forme tronquée de Kit observée au niveau des cellules germinales post-méiotiques pourrait être impliquée dans l'activation ovocytaire après la fécondation [41]. En outre l'interaction Kit/SCF serait requise lors de la prolifération des cellules de Leydig [48]. Il existe peu de données concernant le déficit d'expression de ce gène dans l'espèce humaine, les seules mutations identifiées correspondant à un syndrome de piebaldisme caractérisé seulement par une dépigmentation partielle du cuir chevelu et de la peau sans autre anomalie de la lignée mélanocytaire, hématopoïétique ou germinale [17, 16, 18].

3. Résultats expérimentaux obtenus sur les fonctions gonadiques de Kit/SCF

Le modèle utilisé dans notre étude était un modèle de souris transgénique chez lequel le gène *kit* est invalidé par l'insertion d'une séquence *nls-lacZ* dans le premier exon du gène [7]. Outre l'inactivation du gène, cette séquence permettait de suivre l'expression du gène rapporteur au cours du développement gonadique car aucune modifica-

tion du promoteur principal du gène n'avait été faite. Notre hypothèse était que l'analyse des souris hétérozygotes par comparaison avec les souris sauvages consanguines nous permettrait d'observer le développement gonadique, à la différence des souris homozygotes déficientes qui meurent dans la première semaine de vie d'une anémie mégaloblastique, et d'apprécier le phénotype des hétérozygotes compte tenu du même fond génétique des souris sauvages contrôles.

Effectivement les souris hétérozygotes étaient parfaitement viables et se distinguaient aisément des souris sauvages par la dépigmentation de leur queue. Par rapport aux souris sauvages, les mâles hétérozygotes ne présentaient aucune différence en terme de poids total et de comportement ; en revanche, le premier cycle spermatogénétique était caractérisé par une vague d'apoptose beaucoup plus intense au niveau des spermatogonies différenciées, avec une diminution très nette de la transition des spermatogonies A vers les spermatogonies B. Cette apoptose était également plus marquée chez l'adulte. En revanche, ni le rendement de méiose, ni le rendement de spermiogénèse n'étaient affectés par le déficit à l'état hétérozygote du gène *kit* [22]. Les conséquences de ce déficit étaient une diminution de la production spermatogénétique et une hypofertilité des animaux. Deux observations originales sont venues compléter les connaissances établies sur le couple Kit/SCF au niveau testiculaire. L'expression du gène rapporteur a bien été confirmée au niveau des spermatogonies différenciées, mais après son extinction complète une nouvelle expression est apparue au stade pachytène/diplotène de la prophase méiotique. En outre l'hypofertilité observée chez les souris haplodéficientes lors d'expériences de croisement *in vivo* a été évaluée par fécondation *in vitro*, avec diminution du taux de fécondation à nombre égal de spermatozoïdes mobiles inséminés. Les altérations de mobilité et les perturbations fonctionnelles observées au niveau de la réaction acrosomique constituent autant d'éléments argumentant pour un rôle possible de *Kit* au niveau des cellules post-méiotiques. La persistance de l'expression de la forme tronquée de *kit* dans notre modèle ne fournissait pas d'argument en faveur de sa responsabilité dans le phénotype observé [23].

4. Kit/SCF : un couple à action pléiotrope sur la gonade

Il est intéressant de remarquer que le récepteur Kit et son ligand SCF offrent la particularité, outre l'expression du premier au niveau des cellules germinales et de Leydig, ainsi que l'expression du second au niveau des cellules de Sertoli, de s'exprimer à des périodes et de développer des actions biologiques différentes selon la période de développement de la gonade. En particulier, l'expression et le rôle de *kit* au niveau des cellules germinales sont disconti-

nus et divergent quant aux mécanismes de transduction qui sont en jeu. Il en est ainsi de la voie PI3K qui est en jeu dans l'effet de *kit* sur la prolifération des spermatogonies différenciées [10, 27, 15] mais apparemment pas dans l'effet anti-apoptotique de *kit*. Par contre, l'action *in vitro* de SCF sur l'expression de certaines protéines de la famille *bcl-2* chez le rat a clairement été montrée, à l'avantage des protéines promotrices de survie cellulaire (*Bcl-xl*, *Bcl-w* notamment [49]). L'expression de *kit* au cours de la méiose ne peut être reliée à aucune action sur la prolifération ou la survie des cellules germinales [22, 23]. Compte tenu de la multiplicité des mécanismes transductionnels recrutés par ce récepteur de type tyrosine kinase, il est raisonnable de penser que tant les mécanismes qui contrôlent l'expression de ce gène dans la gonade que les mécanismes transductionnels impliqués dans ses actions biologiques divergent en fonction du stade de développement et du type cellulaire concerné. Il reste que le couple *Kit/SCF* constitue un exemple privilégié du dialogue entre cellules de Sertoli et cellules germinales pour le contrôle de la spermatogenèse.

VII. CONCLUSION

L'apoptose, nous l'avons vu tout au long de cet exposé, joue un rôle majeur dans la mise en place et le maintien de la spermatogenèse. Elle est en particulier en jeu pour maintenir le rapport numérique entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales dans des limites compatibles avec le déroulement normal de la spermatogenèse. Si cet équilibre est perturbé dans l'un ou l'autre sens, il en résultera une altération sévère de la production des gamètes. Notre propos s'est volontairement limité à la place de l'apoptose dans le processus physiologique d'installation de la spermatogenèse, mais l'apoptose est aussi une réponse apportée à certains déséquilibres soit endogènes, perturbations du cycle cellulaire, ADN endommagé, carence en facteurs de croissance, soit exogènes, exposition à certains produits chimiques, aux radiations ionisantes, à des perturbateurs endocriniens. Sa place dans des processus pathologiques, qu'il s'agisse d'infertilité ou de tumorigenèse chez l'homme, est très vraisemblable mais reste à préciser.

REFERENCES

- ADACHI M., SUEMATSU S., KONDO T. et al. : Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet.*, 1995, 11 : 294-300.
- ADAMS J.M., CORY S. : The *Bcl-2* protein family : arbiters of cell survival. *Science*, 1998, 281 : 1322-1326.
- ALLAN D.J., HARMONT B.V., ROBERTS S.A. : Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.*, 1992, 25 : 241-250.
- ALLEMAND I., ANGLO A., JEANTET A.Y., CERUTTI I., MAY E. : Testicular wild-type p53 expression in transgenic mice induces spermiogenesis alterations ranging from differentiation defects to apoptosis. *Oncogene*, 1999, 18 : 6521-6530.
- ASHKENAZI A., DIXIT V.M. : Death receptors : signaling and modulation. *Science*, 1998, 281 : 1305-1308.
- ASHMAN L.K. : The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999, 31 : 1037-1051.
- BERNEX F., DE SEPULVEDA P., KRESS C., ELBAZ C., DELOUIS C., PANTHIER J.J. : Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development*, 1996, 122 : 3023-3033.
- BEURNER T.L., ROEPERS-GAJADIEN H.L., GADEMAN I.S. et al. : The role of the tumour suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ.*, 1998, 5 : 669-678.
- BILLIG H., FURATA I., RIVIER C., TAPANAINEN J., PARVINEN M., HSUEH J.W. : Apoptosis in testis germ cells : developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, 1995, 136 : 5-12.
- BLUME-JENSEN P., JIANG G., HYMAN R., LEE K.F., O'GORMAN S., HUNTER T. : Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat. Genet.*, 2000, 24 : 157-162.
- BOEKELHEIDE K., LEE J., SHIPP E.B., RICHBURG J.H., LI G. : Expression of Fas system-related genes in the testis during development after toxicant exposure. *Toxicol. Letters*, 1998, 102-103 : 503-508.
- BRINKWORTH M.H., WEINBAUER G.F., SCHLATT S., NIESCHLAG E. : Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J. Reprod. Fert.*, 1995, 105 : 25-33.
- D'ALESSIO A., RICCIOLI A., LAURETTI P. et al. : Testicular FasL expression is expressed by sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98 : 3316-3321.
- DE ROOIJ D.G., GROOTGOED A. : Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10 : 694-701.
- DOLCI S., PELLEGRINI M., DI AGOSTINO S., GEREMIA R., ROSSI P. : Signaling through extracellular signal-regulated kinases is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 : 40225-40233.
- EZOE K., HOLMES S.A., HO L. et al. : Novel mutations and deletions of the Kit (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 56 : 58-66.
- FLEISHMAN R.A. : Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allele of the c-kit membrane receptor gene. *J. Clin. Invest.*, 1992, 89 : 1713-1717.
- FLEISHMAN R.A., GALLARDO T., MI X. : Mutations in the ligand binding domain of the kit receptor : an uncommon site in human piebaldism. *J. Invest. Dermatol.*, 1996, 107 : 703-706.
- FRANCAVILLA S., D'ABRIZIO P., RUCCI N. et al. : Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85 : 2692-2700.
- GODIN I., DEED R., COOKE J., ZSEBO K., DEXTER M., WYLIE C.C. : Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 1991, 352 : 807-809.
- GRATAROLI R., VINDRIEUX D., GOUGEON A., BENAHEMED M. : Expression of Tumor Necrosis Factor- α -Related

- Apoptosis Inducing Ligand and its receptors in rat testis during development. *Biol. Reprod.*, 2002, 66 : 1707-1715.
22. GUERIF F., CADORET V., RAHAL-PEROLA V. et al. : Apoptosis, onset and maintenance of spermatogenesis : evidence for the involvement of *Kit* in *Kit*-haplodeficient mice. *Biol. Reprod.*, 2002, 67 : 70-79.
 23. GUERIF F., CADORET V., PLAT M. et al. : Characterization of the fertility of *Kit*-haplodeficient male mice. *Int. J. Androl.*, 2002, 25 : 358-368.
 24. HENRIKSEN K., HAKOVIRTA H., PARVINEN M. : *In situ* quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int. J. Androl.*, 1995, 18 : 256-262.
 25. HENRIKSEN K., KANGASNIEMI M., PARVINEN M., KAIPIA A., HAKOVIRTA H. : *In vitro* Follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology*, 1996, 137 : 2141-2149.
 26. KERR J.F., WYLLIE A.H., CURRIE A.R. : Apoptosis : a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26 : 239-257.
 27. KISSEL H., TIMOKHINA I., HARDY M.P. et al. : Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.*, 2000, 19 : 1312-1326.
 28. KNUDSON C.M., TUNG K.S.K., TOURLETOTTE W.G., BROWN G.A.J., KORSMEYER S.J. : Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 1995, 270 : 96-99.
 29. LEE J., RICHBURG J.H., YOUKIN S.C., BOEKELHEIDE K. : The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, 1997, 138 : 2081-2088.
 30. LEE J., RICHBURG J.H., SHIPP E.B., MEISTRICH M.L., BOEKELHEIDE K. : 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.
 31. MATSUI Y., TOKSOZ D., NISHIKAWA S. et al. : Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 1991, 353 : 750-752.
 32. MATSUI Y., NAGANO R., OBINATA M. : Apoptosis of fetal testicular cells is regulated by both p53-dependent and independent mechanisms. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 55 : 399-405.
 33. OHTA H., YOMOGIDA K., DOHMAE K., NISHIMUNE Y. : Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells : the role of c-kit and its ligand SCF. *Development*, 2000, 127 : 2125-2131.
 34. OLDEREID N.B., DE ANGELIS P., WIGER R., CLAUSEN O.P.F. : Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, 7 : 403-408.
 35. PACKER A.I., BESMER P., BACHVAROVA R.F. : Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, 42 : 303-310.
 36. PENTIKAINEN V., ERKKILA K., DUNKEL L. : Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, 1999, 276 (Endocrinol. Metab. 39) : E310-E316.
 37. PENTIKAINEN V., ERKKILA K., SUOMALAINEN L. et al. : TNF α down regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86 : 4480-4488.
 38. RICCIOLI A., SALVATI L., D'ALESSIO A. et al. : The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia*, 2003, 35 : 64-70.
 39. RODRIGUEZ I., ODY C., ARAKI K., GARCIA I., VASSAMO P. : An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.*, 1997, 16 : 2262-2270.
 40. ROSSI P., SETTE C., DOLCI S., GEREMIA R. : Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J. Endocrinol. Invest.*, 2000, 23 : 609-615.
 41. SETTE C., PARONETTE M.P., BARCHI M., BEVILACQUA A., GEREMIA R., ROSSI P. : Tr-kit induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J.*, 2002, 21 : 5386-5395.
 42. SHIKONE T., BILLIG H., HSUEH A.J.W. : Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol. Reprod.*, 1994, 51 : 865-872.
 43. SINHA HIKIM A.P., WENG C., LEUNG A., SWERDLOFF R.S. : Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 1995, 136 : 2770-2775.
 44. SIONOV R.V., HAUPT Y. : The cellular response to p53 : the decision between life and death. *Oncogene*, 1999, 18 : 6145-6157.
 45. TAPANAINEN J.S., TILLY J.L., VIHKO K.K., HSUEH A.J.W. : Hormonal control of apoptotic cell death in the testis : gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.*, 1993, 7 : 643-650.
 46. TROIANO L., FUSTINI M.F., 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.
 47. YAN W., SAMSON M., JEGOU B., TOPPARI J. : Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol. Endocrinol.*, 2000, 14 : 682-699.
 48. YAN W., KERO J., HUHTANIEMI I., TOPPARI J. : Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment : implication of a role of the stem cell Factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Dev. Biol.*, 2000, 227 : 169-182.
 49. YAN W., SUOMINEN J., TOPPARI J. : Stem cell factor protects germ cells from apoptosis *in vitro*. *J. Cell Sci.*, 2000, 113 : 161-168.
 50. YIN Y., STAHL B.C., DEWOLF W.C., MORGENTALER A. : P53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 1998, 204 : 165-171.
 51. YOSHINAGA K., NISHIKAWA S., OGAWA M. et al. : Role of c-kit in mouse spermatogenesis : identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, 1991, 113 : 689-699.

ABSTRACT

Spermatogenesis and apoptosis

Dominique ROYERE, Fabrice GUERIF, Véronique LAURENT-CADORET, Marie-Thérèse HOCHEREAU DE REVIERS.

Onset of spermatogenesis is associated with a wave of apoptosis, which limits its efficacy during the first cycles in most mammals. After the first cycles, the actual efficacy of spermatogenesis always remains below the theoretical yield. Among the germinal cells, spermatogonia are the main targets of physiological apoptosis. This physiological apoptosis partly depends on the relationships between germ cells and Sertoli cells. The impact of the Sertoli cell / germ cell number ratio on the efficacy of spermatogenesis is well accepted; the concept of density-dependent regulation in the seminiferous tubule was proposed in the early eighties. Since the steps of spermatogenesis require a continuous progression of the cell cycle rather than an arrest, germ cells might therefore be more sensitive to apoptosis. This may also lead to severe disturbances between proliferation and cell death.

The first experiments designed to elucidate the mechanisms of germ cell apoptosis were based on hormonal deprivation or cryptorchidism. However, the link between hormonal or cellular action and cell survival remained to be established. Analysis of signal transduction pathways involved in germ cell apoptosis and their regulation were the next steps.

The involvement of *bcl-2* family genes has been confirmed, although the expression of some of its members remains more controversial. Data derived from overexpression of some genes (*Bcl-2*, *Bcl-xl*) or resulting from gene inactivation (*Bax*) at the testicular level have highlighted the role of these genes in the control of germ cell apoptosis and have also provided some evidence for the strict requirement for density-dependent regulation of spermatogenesis. More recently, variations in the pattern of expression of these genes or proteins helped to explain some of the discrepancies in the literature.

The place of the *Fas* / *Fas* ligand system during the first cycle of spermatogenesis remains a matter of debate, with controversies concerning the precise site of expression of this oncogene and its receptor. Conversely, its role in the testis after chemotoxic or radiotoxic treatments is well established. However,

the normal fertility of animals with a spontaneous inactivation of *Fas* or *Fas L* genes does not support a physiological role of these factors during spermatogenesis.

While factors involved in *TNF* / *TNF R1* (Tumor Necrosis Factor) are under study, some data have been reported concerning the role of *TRAIL* (TNF- α Related Apoptosis Inducing Ligand) and its active or decoy receptors in the testis.

Among the oncogenes which may modulate the apoptotic process, *Kit* / *Stem Cell Factor* is particularly interesting, as *Kit* is expressed in some germ cells and Leydig cells, whereas *SCF* is expressed by Sertoli cells. Its impact during gonadal development and in the survival and proliferation of differentiated spermatogonia has been clearly established. Using a transgenic mice model, in which the *Kit* gene was inactivated by the insertion of a *nls-lacZ* sequence in its first exon, we showed that one single copy of the gene was unable to sustain physiological spermatogenesis and fertility in male mice. Our results also suggest that the *Kit* gene might be expressed at different steps of spermatogenesis, with different signal transduction pathways and biological actions.

Finally, analysis of the signal transduction pathways involved in testicular apoptosis and their mechanisms of control is one of the key steps to a better understanding of both impairment of spermatogenesis and the pathogenesis of certain germ cell tumours.

Key Words: *apoptosis, spermatogenesis, Bcl2, Fas, TNF, Kit, SCF*