

LE IONOPHORE A23187

UN TEST DE FÉCONDANCE DU SPERME AVANT FIV ?

P. Fenichel*, M. Donzeau**, BL. Hsi *, N. Ayraud**

* INSERM U210 et ** Laboratoire de Biologie de la Reproduction
Faculté de Médecine – NICE 06034 Cedex

THE IONOPHORE A 23187. A PENETRATION TEST FOR SPERM BEFORE IVF ? The acrosomic status of spermatozoa prepared for IVF has been evaluated by means of immunofluorescence test from Fenichel and Hsi using calcium A 23187 ionophore as inductor of acrosome reaction (AR). The spontaneous AR remains slight, even after 6 hour-incubation in Menezé B2 (6,8 + 2,7%). The response to ionophore, moderate before (11,2 + 9%), frankly increases after a 6h-capacitation (28,9 + 8,3%) in a group of 25 IVF couples (tubal indication, normal semen, positive fertilization). Nevertheless, it remains slight or null in 4 cases of unexplained repeated failure of fertilization. The response to ionophore A 23187 allows to explore the kinetics of capacitation of spermatozoa and their ability to perform AR. Its significance in terms of fecundance remains to be precised.
Key-words : sperm , acrosomic function, Ca A 23187 ionophore, In Vitro Fertilization.
Andrologie, 1991, 1:15-16

INTRODUCTION

Les paramètres classiques du spermogramme se sont avérés insuffisants pour apprécier la fécondance des spermatozoïdes et pour expliquer certains échecs de la fécondation in vitro (7). La RA constitue une étape clef de la fécondation comme le suggère l'absence de fécondance des spermatozoïdes microcéphales sans acrosome (8). Cette exocytose cellulaire calcium-dépendante a été relativement peu étudiée d'un point de vue clinique pour deux raisons essentielles : l'absence d'un test simple et fiable d'évaluation du statut acrosomique et l'incertitude quant à l'inducteur physiologique de la RA. Récemment Aitken (1) a proposé l'utilisation du calcium ionophore pour améliorer le test de pénétration croisé du hamster et Byrd et al (2) ont montré que la réponse à ce ionophore qui déclenche la RA en provoquant une entrée massive de calcium intra-cytosolique, dépendait de la capacitation préalable.

Nous avons utilisé cette propriété pour explorer de façon systématique les spermés préparés pour FIV afin de relier la RA avec et sans ionophore à la fécondance constatée. L'évaluation du statut acrosomique s'est faite à l'aide d'un test d'immunofluorescence (3) basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'acrosome.

MATERIEL ET METHODES

Les spermatozoïdes testés ont été issus des recueils réalisés le jour de la tentative de FIV. Il s'agissait d'indications tubaires avec spermogramme considéré comme normal ou d'un groupe avec non fécondance répétée inexpliquée impliquant un spermogramme normal, un test de Hühner positif et l'absence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le plasma féminin. Après séparation du liquide séminal par centrifugation-lavage dans du milieu de Tyrode et migration ascendante dans du B2 de Ménézo 1/2h, les spermatozoïdes récupérés dans le surnageant ont été divisés en deux parties ; l'une a permis l'insémination des ovocytes dans les trois heures suivant le recueil et l'autre partie a été placée à l'étuve à CO² (5%) à 37°C pendant 6h pour permettre la capacitation. La RA a été ensuite provoquée par le calcium (A23187 free acid, Sigma), 10µM dans B2 pendant une heure.

Le statut acrosomique avec et sans ionophore a été apprécié par le test de Fenichel et Hsi (3) à l'aide de la cytofluorométrie. Il s'agit d'un test d'immunofluorescence indirecte utilisant la propriété de l'anticorps monoclonal de souris GB24 de réagir avec la membrane interne de l'acrosome (4). Seuls les spermatozoïdes ayant réalisé la RA exposent l'antigène. Ce test est pratiqué sur des spermatozoïdes vivants en suspension (3). Le résultat est exprimé en pourcentage de spermatozoïdes marqués.

RESULTATS

La RA spontanée (fig.1) reste faible avant (4,4 + 2%) et après 6h d'incubation dans B2 (6,8 + 2,7%). La réponse à A23187 modérée avant incubation (11,2 + 9), s'améliore nettement après 6h (28,9 + 8,3%). Cette sensibilisation semble liée à la capacitation dans le B2 puisqu'elle est nettement plus faible (19 + 5,6%) si l'incubation

a lieu dans un tampon phosphate (PBS) sans calcium ni albumine (fig.2). Cette stimulation de la RA par A23187 après 6h d'incubation dans le B2, a toujours été nette avec une population inductible (RA induite moins RA spontanée) égale à 21,5 % + 5,3 dans un groupe de 25 conjoints FIV avec fécondation positive. Par contre l'exploration de 4 cas de non fécondance répétée inexpliquée (Tab.1) a révélé une réponse faible ou nulle à A23187 (population inductible <10 %), le test ayant été comparé à chaque fois à un témoin fertile. Le test de pénétration croisé dans l'ovocyte déperlucidé de hamster réalisé dans deux de ces cas au laboratoire de Biologie de la Reproduction de Bicêtre, s'est avéré totalement négatif.

TABLEAU 1 : STATUT ACROSOMIQUE DANS 4 CAS DE NON FÉCONDANCE RÉPÉTÉE INEXPLIQUÉE

Durée de l'infertilité	Spermogramme	FIV	Réaction acrosomique
N année	N % FT % FM	Cycles Ovocytes	% -A23187+
1 7	110 45 50	3 9	7 8
2 4	145 70 50	3 13	15 25
3 5	60 60 40	5 12	4 9
4 6	65 40 45	5 9	14 17

DISCUSSION

Parmi les différentes sondes fluorescentes qui ont été proposées récemment (5) pour évaluer le statut acrosomique et qui donnent une appréciation moins ambiguë que les colorations cytochimiques classiques comme la réaction de Talbot, le test de Fenichel et Hsi (3) permet de donner de façon simple et rapide un signal positif de la RA sur des spermatozoïdes vivants en suspension. A l'aide de ce test et dans des conditions de préparation des spermatozoïdes pour FIV, nous avons pu vérifier que le taux de

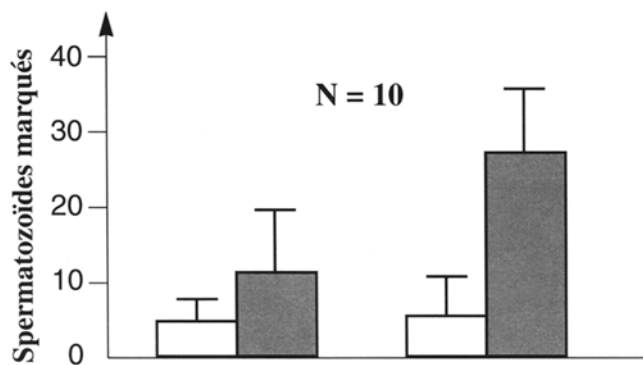


FIGURE 1 : Taux de réaction acrosomique spontanée (-) et induite par A23187 (+) avant et après 6h d'incubation dans du B2 de MENEZO.

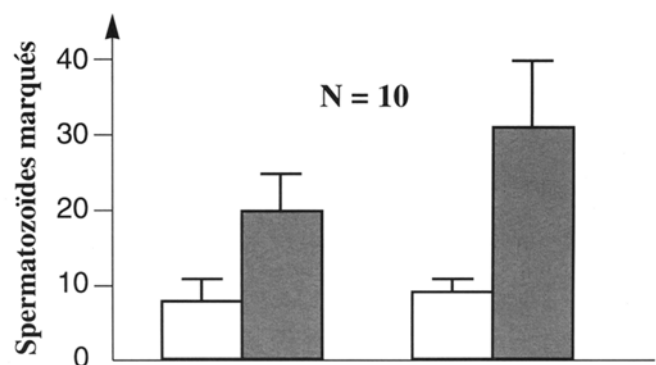


FIGURE 2 : Taux de réaction acrosomique spontanée (-) et induite par A23187 (+) après 6h d'incubation dans du PBS (tampon phosphate salin) ou du B2 de MENEZO.

RA spontanée restait faible même après capacitation dans le B2, permettant de comprendre sa faible valeur pronostique dans le cadre de la FIV (10). Par contre, le recours au ionophore calcique A23187 constitue une véritable exploration dynamique (6) de la fonction acrosomique, permettant d'approcher indirectement la capacitation (2). La réponse au ionophore est en effet dépendante du temps de pré-incubation dans le milieu capacitant comme le B2. Il n'existe jusqu'à présent aucun moyen direct de mesurer cette capacitation et son temps moyen bien que très variable dans l'espèce humaine qui a été évalué à 6h par Perreault et Rogers (9) à l'aide du test de pénétration croisée. Une absence de réponse au ionophore après 6h dans le B2, pourrait signifier une tendance à capiter lentement ou une anomalie dans la chaîne des événements qui font suite à l'entrée massive de calcium dans la cellule et qui conduisent à la RA.

Le calcium ionophore ne constitue pas une méthode physiologique pour induire la RA bien que celle-ci soit identique que le plan ultrastructural (11) et que la pénétration des ovocytes dépellucidés de hamster soit possible (1). L'identification des substances actives lors de la RA physiologique au niveau du liquide folliculaire, des cellules du cumulus et de la zone pellucide permettra probablement de remplacer le ionophore avantageusement. En attendant, il semble intéressant d'inclure le test au ionophore dans la batterie d'examen réalisés en cas de non

fécondance inexplicée et qui ont pour but de vérifier les différentes fonctions du spermatozoïde. Sa signification en terme de fécondance reste néanmoins à préciser.

REFERENCES

1. Aitken RJ, Thatcher S, Glasier AF, Clarkson JS, Wu FCW, Baird DT. Relative ability of modified versions of the hamster oocyte penetration test, incorporating hyperosmotic medium or the ionophore A23187, to predict IVF outcome. *Hum. Reprod.*, 1987, 2 : 227-235
2. Byrd W, Tsu J, Wolf DP. Kinetics of spontaneous and induced acrosomal loss in human sperm incubated under capacitating and non capacitating conditions. *Gamete. Res.*, 1989, 22 : 109-122
3. Fénelon P, Hsi BL, Farahifar D, Donzeau M, Barrier-Delpech D, Yeh CJG. Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, 87 : 699-706
4. Fénelon P, Dohr G, Grivaux C, Cervoni F, Donzeau M, Hsi BL. Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Molecular. Reprod. Dev.*, 1990, 27 : 173-178
5. Fénelon P. Les tests de la fonction acrosomique. *Contr. Fertil. Sex.*, 1990, 18 : 543-545
6. Fénelon P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL. Dynamics of human sperm acrosome reaction : relation to in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, accepted for publication, July 1990
7. Jeulin C, Serres C, Jouannet P. The effects of centrifugation, various synthetic media and temperature on the motility and vitality of human spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1982, 22 : 81-91
8. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Kennedy WP, Heath E, Perez-Pelaez M, Sobrero AJ, Zaneveld JD.

Acrosomeless sperm, a cause of primary male infertility. *Andrologia*, 1985, 7 : 3-11

9. Perreault SD, Rogers BJ. Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1982, 38 : 258-265.

10. Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM. Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1984, 42 : 418-425

11. Russell L, Pederson RN, Freund M. Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1979, 32 : 87-93.

RESUME: Le statut acrosomique des spermatozoïdes préparés pour FIV a été évalué par le test d'immunofluorescence de Fénelon et Hsi avec comme inducteur de la réaction acrosomique (RA), le calcium ionophore A23187. La RA spontanée reste faible même après 6h d'incubation dans le B2 de Ménézo (6,8 + 2,7%). La réponse au ionophore, modérée avant (11,2/9%), augmente franchement après 6h de capacitation (28,9+8,3%) dans un groupe de 25 conjoints FIV (indication tubaire, spermogramme normal, fécondation positive). Par contre, elle demeure faible ou nulle dans 4 cas de non fécondance répétée inexplicée. La réponse au ionophore A23187 permet d'explorer la cinétique de la capacitation des spermatozoïdes et leur aptitude à réaliser la RA. Sa signification en terme de fécondance reste à préciser. **Mots clés:** spermatozoïdes, fonction acrosomique, Ca A23187 ionophore, fécondation in vitro. **Andrologie, 1991, 1: 15-16**