



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

FACULTÉ DE MEDECINE

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

G.F.D. ou Ecole Doctorale : BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL



**ÉTUDE DE L'ARCHITECTURE MOLÉCULAIRE DE  
LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DES MEMBRANES  
ACROSOMIQUES DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN.  
LEURS MODIFICATIONS AU COURS DES  
PHÉNOMÈNES DE CAPACITATION ET DE LA  
RÉACTION ACROSOMIQUE**

**THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement

le 28 mars 1997

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I**

par

**FIERRO-PASTRANA Reyna-Carmen**

née le 07.09.1961

à TEHUACAN (Mexique)



Membres du Jury :

Mr le Professeur G. GRIGNON - Président et Co-Directeur de Thèse  
Mr le Professeur J.P. DADOUNE - Rapporteur  
Mr le Professeur J.C. CZYBA - Rapporteur  
Mr le Professeur B. FOLIGUET - Co-Directeur de Thèse  
Mr le Professeur M. DAUÇA

**C'est le temps que tu as perdu pour  
ta rose qui fait ta rose si importante.**

A. de SAINT-EXUPÉRY

## AVANT PROPOS

A ma fille Carmen-Lorena, pour tout le bonheur qu'elle m'apporte.

A Humberto, pour tout le temps passé à la réalisation de cette thèse et pour sa patience.

A mes parents, mes frères Jorge et Luis qui m'ont quitté trop tôt, pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études.

A ma famille, pour la confiance qu'elle m'a témoignée.

A tous mes amies et amis de la France et du Mexique, pour leur amitié tout simplement.

A toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu dans cet effort, je tiens à adresser mes remerciements.

Je vous remercie de tout coeur.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur **G. GRIGNON**,

Sans qui ce travail n'existerait pas. J'ai été très touchée par l'accueil que vous m'avez réservé dans votre service fait d'amitié et de confraternité. Merci pour le temps que vous avez bien voulu me consacrer et les qualités humaines que vous possédez.

Monsieur le Professeur **B. FOLIGUET**,

Je vous remercie de l'aide et du soutien que vous m'avez témoigné lors de la réalisation de ce travail. Votre disponibilité et vos compétences m'ont été d'une grande utilité.

Monsieur le Professeur **J. P. DADOUNE**,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur **J. C. CZYBA**,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail. Soyez en remercié.

Monsieur le Professeur **M. DAUCA**,

C'est avec beaucoup de gentillesse que vous avez accepté de juger ce travail. Je vous en remercie.

J'adresse tous mes remerciements à

Toutes les personnes du secteur du CECOS de la Maternité Régionale A. Pinard de Nancy, du laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine, et du laboratoire d'Histologie, Embryologie et Microscopie Électronique, en particulier J. CHANEL, C. PELLETIER, L. MARCHAL, C. CAMUT, M. CARTIGNY, M. SIMONETTI, P. SCHWED. et J. EL KAISSOUNI.

Mlle le Professeur M. C. BENÉ et M. le Professeur G. FAURE, du Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine.

Toutes les personnes du laboratoire de Biologie Cellulaire, UAM-I, Mexique, en particulier R. ORTIZ, Y. DUCOULOMB, C. GONZALEZ, M. BETANCOURT, E. GONZALEZ et E. CASAS.

Toutes les autorités de l'Université Autonome Métropolitaine, Mexique, et plus spécialement R. GREATHER et E. RODRIGUEZ.

CONACYT et UAM-Iztapalapa, Mexico, Mexique.



## TABLE DE MATIÈRES

I) DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	9
1) FÉCONDATION.....	10
A) Cellules en présence.....	11
a) Ovule.....	11
b) Spermatozoïde.....	13
B) Différentes temps de la préparation à la fécondation.....	18
a) Acquisition du pouvoir fécondant du sperme.....	18
b) Capacitation.....	19
• Généralités.....	19
• Modifications moléculaires de la membrane.....	20
• Protéines du cytosquelette.....	23
• Modifications internes.....	24
• Facteurs capacitants et décapacitants.....	25
b) Réaction acrosomique.....	28
• Généralités.....	28
• Lieu de la réaction acrosomique.....	30
• Autres facteurs de la réaction acrosomique.....	32
• Induction de la réaction acrosomique.....	33
c) Fusion de gamètes.....	36
d) Réaction corticale.....	36
e) Étape finale de la fécondation.....	37
2) CAUSES DE STÉRILITÉ.....	39
A) Généralités.....	39
B) Chez la femme.....	40
C) Chez l'homme.....	41
a) Stérilités sécrétoires.....	41
b) Stérilités excrétoires.....	42
c) Anomalie de l'éjaculation.....	42
d) Les immunités.....	43
3) ASSISTANCE MÉDICALE À LA PROCRÉATION.....	45
A) Insémination artificielle.....	47
a) Insémination artificielle avec sperme du conjoint (IAC).....	47
b) Insémination artificielle avec sperme de donneur (IAD).....	47
B) FIV (FIVETE).....	48
C) Micromanipulations.....	48
a) Zona drilling (ZD).....	48
b) Micro-injection sous-pellucidaire (MISP).....	48
c) Micro-injection intra-cytoplasmique (ICSI).....	48



II) MODIFICATIONS DU GLYCOLEMME AU COURS DE LA CAPACITATION ET LA REACTION ACROSOMIQUE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN IDENTIFIÉES PAR DES LECTINES.....	50
1) INTRODUCTION.....	51
2) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	57
3) MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	59
A) Analyse du sperme.....	60
B) Préparation des spermatozoïdes .....	60
C) Induction de la réaction acrosomique.....	61
D) Lectines .....	62
E) Neutralisation des lectines .....	63
F) Microscopie électronique à transmission.....	63
a) Le microscope.....	63
b) Préparation des échantillons .....	64
G) Cytométrie de flux .....	65
a) GB24 simple marquage .....	67
b) Lectines simple marquage .....	68
c) Lectines triple marquage .....	68
4) RÉSULTATS.....	72
A) Étude ultrastructurale.....	73
B) Étude quantitative.....	82
5) DISCUSSION .....	101
6) CONCLUSION.....	117
III) LOCALISATION DE RÉCEPTEURS AUX CYTOKINES À LA SURFACE DES SPERMATOZOÏDES HUMAINS .....	121
1) INTRODUCTION.....	122
2) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	129
3) MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	132
A) Analyse du sperme.....	133
B) Préparation des spermatozoïdes .....	133
C) Anticorps.....	134
D) Cytométrie de flux .....	135
E) Microscopie électronique à transmission .....	137
a) Marquage avant inclusion (pre-embedding).....	137
b) Marquage après inclusion (post-embedding) .....	138
F) Témoins.....	139
4) RÉSULTATS.....	140
A) Caractéristiques des spermés .....	141
B) Cytométrie de flux.....	141
C) Microscopie électronique à transmission .....	155
5) DISCUSSION .....	160
6) CONCLUSION.....	171
IV) BIBLIOGRAPHIE .....	174

**I) DONNÉES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



# 1) FÉCONDATION

La fécondation résulte de la fusion entre un spermatozoïde et un ovule. Quand cette conjonction se réalise, les pronuclei se rapprochent et mettent en commun leur capital génétique. Les événements de la fécondation comprennent trois étapes principales : la reconnaissance de l'ovule par le spermatozoïde, le contrôle par l'ovule de la pénétration d'un seul spermatozoïde et l'activation du métabolisme de l'ovule pour le développement de l'embryon.

Depuis longtemps, les biologistes s'interrogent sur les modalités de la reconnaissance de l'ovule par le spermatozoïde. Après avoir longtemps admis une place prépondérante au hasard, on sait à l'heure actuelle que le spermatozoïde reconnaît spécifiquement l'ovule, quand il est en contact avec l'enveloppe qui l'entoure. (Epel, 1978)

Pour mieux comprendre le processus de la fécondation il faut d'abord connaître la morphologie des deux cellules impliquées : l'ovule et le spermatozoïde.



## A) Cellules en présence

### a) Ovule

L'ovule est un ovocyte de deuxième ordre, bloqué en métaphase de la deuxième division de méiose. L'ovocyte est alors entouré par trois structures :

a) La membrane plasmique qui limite le cytoplasme est hérissée de micro-villosités qui font saillie dans l'espace périvitellin, siège du premier globule polaire. La liaison du spermatozoïde à cette membrane n'est pas spécifique de l'espèce.

b) La zone pellucide (ZP) est une enveloppe acellulaire qui sépare l'ovocyte des cellules folliculeuses et qui, avec l'ovocyte lui-même, l'ont élaborée. Sur sa face externe se situent des groupements glucidiques, apparemment des glycoprotéines, sites de liaison des spermatozoïdes. Elle comporte plusieurs millions de copies de ces glycoprotéines qui s'assemblent en longs filaments interconnectés pour former une structure acellulaire, asymétrique et poreuse, de 7 à 35  $\mu\text{m}$  d'épaisseur selon les espèces, (Phillips et Shalgi, 1980). La liaison du spermatozoïde à cette structure est spécifique de l'espèce à la différence de la liaison à la membrane plasmique. Cette spécificité explique la fixation de spermatozoïdes propres à l'espèce

c) Le cumulus oophorus, constitué de cellules folliculeuses dissociées dans une matrice surtout composée d'acide hyaluronique (Katz, *et al.*, 1989).

Au centre de ce dispositif, l'ovocyte est métaboliquement inerte et sa survie est de courte durée en l'absence de fécondation. Le délai au delà duquel l'ovocyte ne peut plus être normalement fécondé a été estimé à 8-10 heures . L'œuf expulsé du follicule mûr est recueilli par le pavillon tubaire et transporté en direction de l'utérus.

Jusqu'au stade préovulatoire de l'évolution folliculaire, l'ovocyte contenu dans le cumulus est au stade d'ovocyte I bloqué en fin de prophase (stade diacinèse). La croissance cytoplasmique s'est poursuivie et le diamètre de l'ovocyte humain atteint environ 140  $\mu\text{m}$  ; il contient 150 ng des protéines (Schultz, *et al.*, 1988).

Son étude en microscopie électronique montre sa richesse en organites divers (figure 1). Les mitochondries, très nombreuses, se rencontrent dans tout le cytoplasme. L'appareil de Golgi, d'abord unique, se fragmente en plusieurs unités à l'origine de grains de sécrétion, les granules corticaux. Des ensembles de systèmes membranaires lisses disposés en amas constituent les lamelles annulaires. Les lamelles annulaires associées à du reticulum granuleux, des mitochondries et des lysosomes, forment les corps de Balbiani. Certains longues microvillosités des cellules folliculeuses entrent en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte; dans ces zones de contact on observe des jonctions perméables et des jonctions adhérentes.

Le noyau de l'ovocyte I, à l'état quiescent (noyau dictyé ou vésicule germinative), est sphérique et de grande taille. Il contient une chromatine finement granuleuse et un ou deux nucléoles. Le noyau produit de grandes quantités de RNA et le cytoplasme, siège de nombreuses synthèses protéiques, s'enrichit progressivement en organites divers. Dès le début de sa croissance, l'ovocyte excrète des

glycoprotéines qui forment la ZP. Dans le cytoplasme s'accumulent des protéines de réserve et du RNA qui interviendra dans les synthèses protéiques au cours des premiers jours du développement de l'oeuf; le RNA messenger est en partie stabilisé sous forme polyadénylée et ne sera traduit qu'après la fécondation (Baker, 1982 ; Czyba et Montella, 1993)

## **b) Spermatozoïde**

Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées dont le rôle est de transporter une copie haploïde de génome mâle jusqu'au contact de l'oeuf. Cette cellule comprend une tête et un flagelle. Les détails de ces différentes zones ont été précisés en microscopie électronique à transmission (figure 2).

1) La Tête.- Elle contient le noyau et l'acrosome qui sont entourés par la membrane plasmique. Le noyau haploïde contient le matériel génétique hautement condensé. L'acrosome est un sac qui recouvre 75% de la portion antérieure de la tête; il est muni de deux membranes qu'on appelle membrane externe et interne de l'acrosome. Le contenu acrosomique est constitué d'enzymes protéolytiques et glycolitiques qui seront rejetés à l'extérieur pour assurer la lyse des membranes périphériques de l'ovocyte. Chez le cobaye on observe l'acquisition d'un glycocalyx lors du passage épидidymaire qui augmente les charges négatives de surface; son rôle n'est pas encore bien défini (Bearer et Friend, 1990).

Dans la partie postérieure de l'acrosome on trouve la plaque équatoriale. Il s'agit de la membrane plasmique doublée par une lame postacrosomique ; cette région est une barrière à la diffusion des

constituants membranaires entre les régions acrosomiques et post-acrosomiques. C'est à ce niveau que la membrane du spermatozoïde fusionne avec la membrane de l'ovocyte. On a observé, chez le cobaye, un blocage de la fécondation en ajoutant des anticorps monoclonaux dirigés contre des composants moléculaires de surface de cette région (Bearer et Friend, 1990).

2) Le Flagelle.- Le flagelle est une longue structure filiforme ayant pour fonction de propulser en avant la cellule. Il comprend quatre régions :

- Le col.- C'est la zone de transition entre la tête et le flagelle qui coordonne le mouvement pour optimiser son efficacité. Il comprend : la plaque basale, le centriole proximal et les colonnes segmentaires.

- La pièce intermédiaire.- La pièce intermédiaire est composée par le complexe axonémal qui est l'élément essentiel de la mobilité, doublé par des fibres denses qui font suite aux colonnes segmentaires; l'ensemble est engainé dans un manchon cytoplasmique riche en réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et mitochondries; dans quelques spermatozoïdes non matures on peut trouver des restes cytoplasmiques importants. Les mitochondries fournissent sous forme d'ATP l'énergie nécessaire à la génération et à la propagation d'ondes dans le flagelle.

- La pièce principale.- Elle contient un complexe filamentueux axial doublé par les fibres denses sur les 2/3 de sa longueur ; l'ensemble est entouré par une gaine fibreuse sans mitochondries ; cette pièce est responsable de la mobilité du

spermatozoïde. La limite entre la pièce intermédiaire et la pièce principale est marquée par la présence d'un anneau dense aux électrons qui adhère à la membrane plasmique, l'annulus.

- La pièce terminale.- Elle est composée seulement par le complexe filamentueux axial entouré par la membrane plasmique.

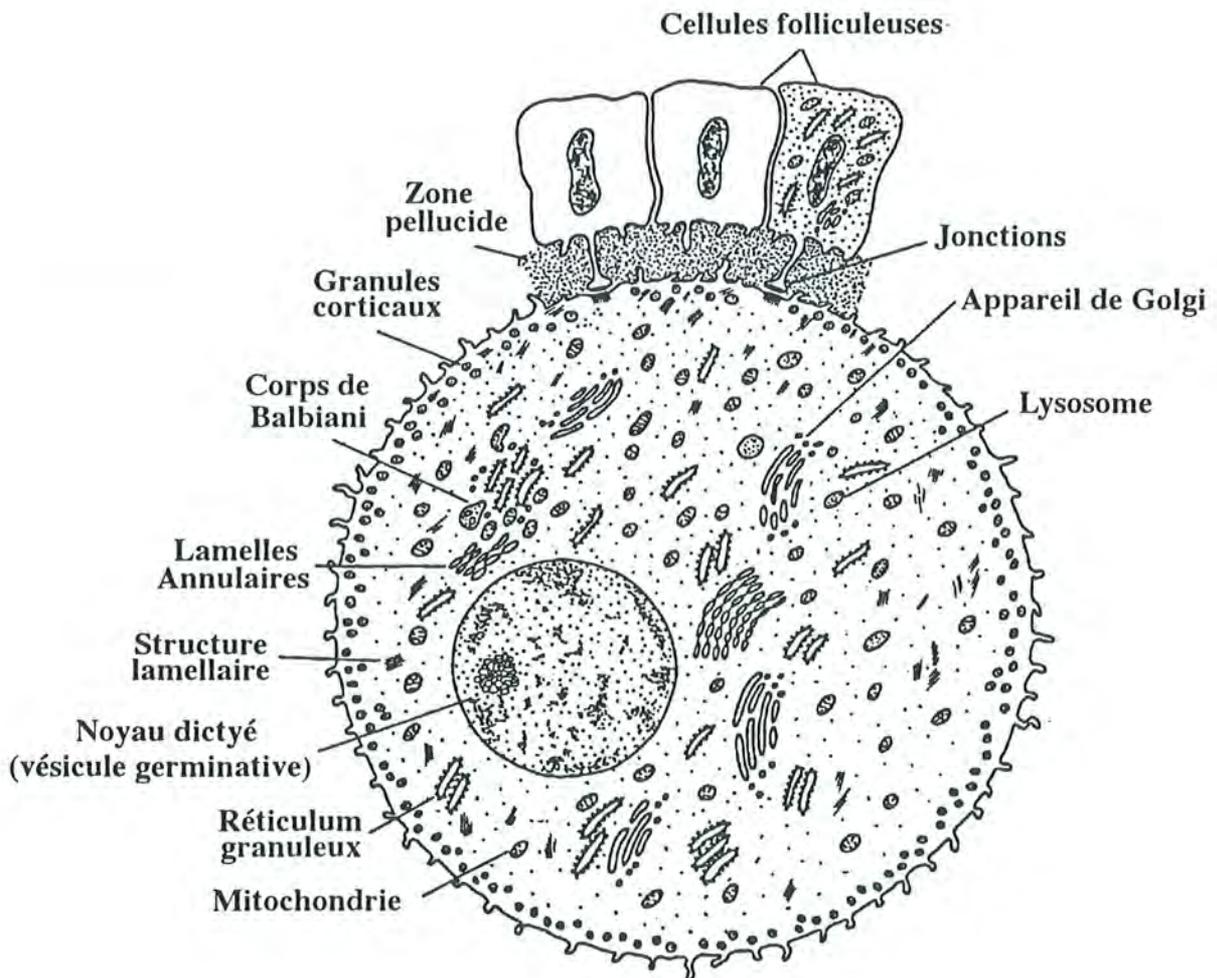


Figure 1. Aspect en microscopie électronique d'un ovocyte de premier ordre (Czyba, 1993)

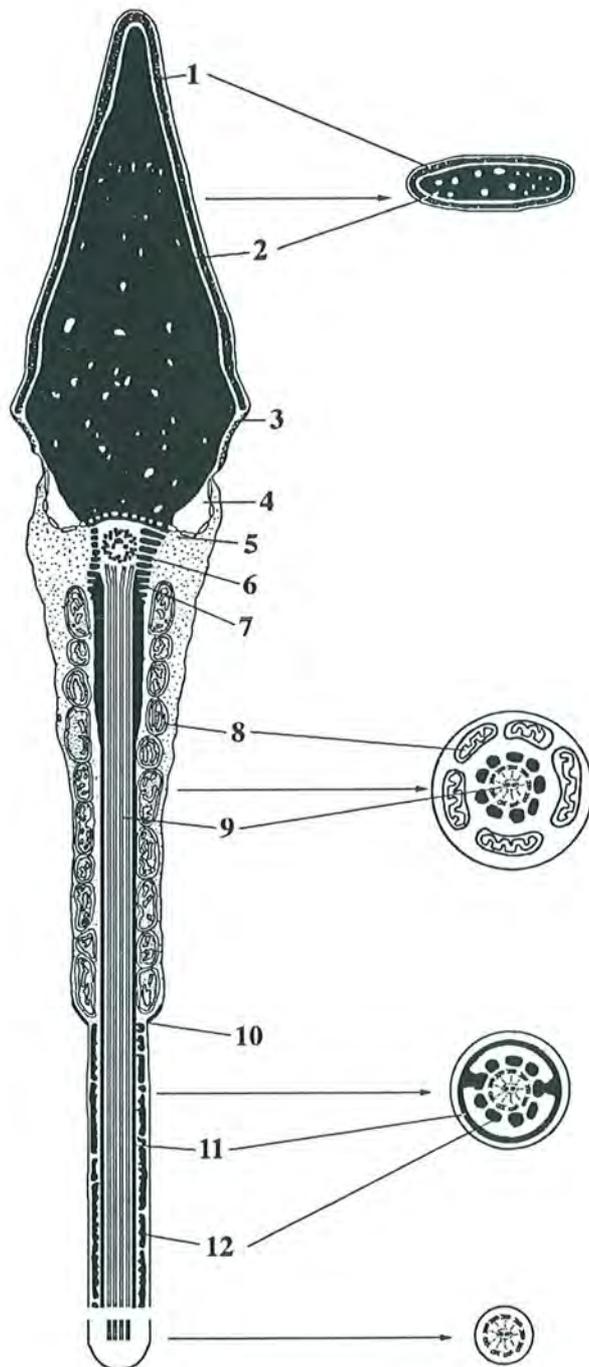


Figure 2. Ultrastructure du spermatozoïde humain (Grignon, 1996)  
1. Acrosome. 2. Noyau. 3. Lame post acrosomiale. 4. Espace périnucléaire postérieur. 5. Plaque basale. 6. Centriole proximal. 7. Colonne segmentaire. 8. Hélice mitochondriale. 9. Axonème. 10. Annulus. 11. Fibre dense. 12. Gaine fibreuse.

## **B) Différentes temps de la préparation à la fécondation**

### **a) Acquisition du pouvoir fécondant du sperme**

Les principales étapes de l'acquisition du pouvoir de fécondance des spermatozoïdes ont été largement analysées dans la littérature. Les spermatozoïdes, issus de la maturation des spermatogonies puis des spermatocytes, quittent les tubes séminifères pour passer dans l'épididyme. Au cours de son trajet épидидymaire, le spermatozoïde subit une série de modifications dont des remaniements membranaires : modifications du rapport stérols/phospholipides, perte ou acquisition de protéines et de résidus glycosylés (Fournier-Delpech et Thibault, 1991).

Les spermatozoïdes qui quittent le testicule ont de faibles mouvements circulaires et sont incapables de fertiliser un ovule. D'autre part, les spermatozoïdes pris dans la queue ont une forte mobilité unidirectionnelle et sont capables de fertiliser l'ovule.

Dès cette étape, ils acquièrent l'aptitude à se fixer sur la ZP de l'ovocyte. Les sécrétions des vésicules séminales et de la prostate contribuent aux caractéristiques biochimiques particulières du milieu liquide dans lequel les spermatozoïdes sont émis (notamment fructose et prostaglandines par les vésicules séminales, zinc et spermine par la prostate) ; elles ont un rôle de protection membranaire, en bloquant ou masquant des sites fonctionnels (facteurs de décapacitation).

Pour féconder, les spermatozoïdes doivent cheminer dans le tractus génital féminin, subir la capacitation, reconnaître et pénétrer la zone pellucide, et fusionner avec la membrane de l'ovocyte. L'aptitude à féconder des spermatozoïdes résulte de la somme de ces étapes dans le processus de fertilisation (Primakoff, *et al.*, 1985).

## **b) Capacitation**

### **• Généralités**

La capacitation peut être définie comme l'ensemble des phénomènes biochimiques et métaboliques subis par les spermatozoïdes, présents dans la queue de l'épididyme ou éjaculés, pour acquérir un pouvoir fécondant.

Austin et Chang ont trouvé par première fois en 1951 que les spermatozoïdes éjaculés de mammifères ne sont pas encore fécondants et ne peuvent pas être utilisés sans préparation pour une fécondation *in vitro*. Physiologiquement après l'insémination, le pouvoir fécondant est acquis lors du transit dans les voies génitales féminines où s'effectue la capacitation des spermatozoïdes (Fraser, 1989). Le mucus cervical élimine le liquide séminal dont plusieurs composants s'opposent au déroulement de la réaction acrosomique (RA) indispensable à la traversée de la ZP ; le mucus cervical élimine également une partie des composants protéiques fixés sur la membrane des spermatozoïdes au cours de leur transit épидидymaire ou provenant des sécrétions des glandes annexes (Czyba et Montella, 1993). Le transport des spermatozoïdes à travers le tractus génital est rapide, dans l'espèce

humaine entre 15-30 minutes, mais la capacitation *in vitro* nécessite un temps plus long (1-4 heures) (Plachot, *et al.*, 1986) C'est pourquoi, certains auteurs suggèrent que le processus de capacitation ne se complète qu'après pénétration du cumulus oophorus par le spermatozoïde (Zaneveld, *et al.*, 1991). Sur le plan physiologique le spermatozoïde resterait ainsi insensible aux signaux d'induction de la réaction acrosomique jusqu'à l'approche de la ZP, prévenant ainsi une réaction acrosomique prématurée et par conséquent nocive pour la fécondation.

### **• Modifications moléculaires de la membrane**

Les mécanismes contrôlant la mise en place initiale des domaines membranaires ainsi que leurs réorganisations consécutives semblent impliquer l'autoassemblage des lipides et les interactions protéiques ainsi que l'intervention d'endoprotéases.

Les modifications de structure de la membrane débutent au cours de la spermiogénèse et se poursuivent durant la maturation épидидymaire. Il a été montré que la glycoprotéine sulfatée SGP-2 est sécrétée par les cellules de Sertoli et les cellules épидидymaires ; après exocytose, cette protéine se fixe à la surface des spermatozoïdes et y reste associée pendant tout le transit des spermatozoïdes à travers l'épididyme (Hermon, *et al.*, 1991).

Après une période de stabilité au cours de leur stockage dans la queue de l'épididyme, la membrane doit se réorganiser de nouveau en vue de la fécondation.

La capacitation s'accompagne de changements importants de l'architecture membranaire, probablement afin de faciliter la fusion des membranes et la transmission de signaux lors de la fécondation.

La plaque équatoriale est le lieu de prédilection de la plupart des réorganisations et contient une multitude de protéines et de lipides ayant des propriétés "fusiogéniques", structurales et de liaison.

Les protéines, fixées en surface par des liaisons non covalentes, sont relarguées au cours de la capacitation soit *in vivo* dans l'utérus (Villarroya et Scholler, 1987), soit lorsqu'on incube des spermatozoïdes éjaculés dans de milieu de culture.

Certaines protéines migrent dans la membrane acrosomique sur des distances plus ou moins importantes, c'est le cas de l'antigène aHSIA.1 présent sur le spermatozoïde humain qui, au cours de la capacitation migre de la partie antérieure de la tête jusqu'à la partie équatoriale post acrosomique (Villarroya et Scholler, 1987). D'autres protéines migrent localement par redistribution ; ce qui entraîne la formation de petites surfaces membranaires instables et plus perméables qui représentent des sites de fusion entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique.

L'antigène PH-20 a été détecté sur les spermatozoïdes de cobaye (Primakoff, *et al.*, 1985), de souris, de singe et d'homme (Gmachi, *et al.*, 1993 ; Lin, *et al.*, 1994). On trouve cet antigène dans l'appareil de Golgi des spermatides. Il est distribué tout au tour de la surface cellulaire des spermatozoïdes testiculaires et pendant le transit épидидymaire, il disparaît du flagelle pour rester seulement sur la tête.

Un autre élément membranaire à prendre en considération est constitué par l'ensemble des modifications des lipides constitutifs de la membrane spermatique. Ces échanges portant sur le cholestérol et les

phospholipides vont entraîner une fragilisation et une plus grande fluidité de la membrane. Le rapport cholestérol/phospholipides est important pour la stabilité membranaire. Il est reconnu que ce rapport diminue durant la capacitation. Lorsqu'elle contient moins de cholestérol et plus de phospholipides fusioogéniques, la membrane se déstabilise progressivement, favorisant ainsi sa réorganisation et la survenue de la réaction acrosomique (Langlais, *et al.*, 1988). Une théorie a été proposée selon laquelle cette déstabilisation membranaire surviendrait dans une période transitoire entre la capacitation et la réaction acrosomique ; cette théorie se fonde sur l'action de régulation du cholestérol membranaire par la protéine kinase A dans le testicule (Baily et Grogan, 1986). Or, cette enzyme est activée durant la réaction acrosomique humain et y joue un rôle important. Elle serait donc un facteur de régulation du cholestérol membranaire du spermatozoïde.

Il est classique d'associer à la capacitation une diminution de la charge de surface et une perte en groupements glucidiques, et plus particulièrement en acide sialique. De tels changements peuvent être expliqués par l'élimination de glycoprotéines ou de polysaccharides périphériques, qui peuvent contenir de l'acide sialique. Les modifications de la composition en carbohydrates du glycocalix sont susceptibles de modifier la fixation des lectines observées après capacitation.

Le nombre de sites actifs augmente de façon significative en cytofluorométrie après lavage des spermatozoïdes et marquage par des lectines fluorescentes. La localisation de ces lectines est modifiée durant le temps de la capacitation, ce qui confirme la mobilisation latérale des molécules, en rapport avec des modifications des composants lipidiques. Certaines lectines marquées sont ainsi très

utiles pour apprécier la réalité de cette capacitation. La quantification des groupes glucidiques de surface après capacitation montre l'importance de certains sites récepteurs dans le pronostic de la fécondance des spermatozoïdes humaines.

O'Rand en 1979 propose un modèle qui englobe les changements de la surface de la membrane du spermatozoïde avant et après la capacitation (figure 3). Ce modèle propose que la membrane plasmique du spermatozoïde avant la capacitation est constituée par quatre sortes de molécules :

- a) Glycoprotéines mobiles
- b) Glycoprotéines non mobiles
- c) Glycolipides
- d) Composants périphériques de la membrane,

et après capacitation on trouve une association des protéines mobiles et non mobiles et une modification ou une disparition des composants périphériques (O'Rand, 1979).

### • Protéines du cytosquelette

Il y a une disposition particulière de l'actine, de la spectrine et de la vimentine dans le spermatozoïde humain. La vimentine se trouve dans le segment équatorial des cellules perméable et non perméables (Ochs, *et al.*, 1986 ; Virtanen, *et al.*, 1984). Il existerait un rapport entre la vimentine et les mécanismes de phosphorylation dans le processus de capacitation (Visconti, *et al.*, 1995a ; Visconti, *et al.*, 1995b).

D'autres protéines comme l'annexine, la bande 3 et la fibronectine ont été retrouvées dans le segment équatorial (Berruti, 1988 ; Hoshi, *et al.*, 1994 ; Parkkila, *et al.*, 1993).

Dans le spermatozoïde humain, on trouve l'actine dans la région postacrosomique, le col et la pièce principale ; la spectrine se localise dans la région postacrosomique et la pièce principale du spermatozoïde humain et du lapin (Virtanen, *et al.* , 1984).

### • **Modifications internes**

Il semble que le calcium intracytoplasmique s'élève progressivement et lentement au cours de la capacitation et que cette variation soit sensible aux antagonistes des canaux calciques (Fraser, 1989). D'autres mouvements ioniques sont probablement impliqués, ce qui confirme l'élévation du potentiel de membrane et la baisse de la teneur en potassium dont la concentration est cinq fois supérieure dans le liquide tubaire. Le pH et les substrats énergétiques interviennent également lors de la capacitation puisque le glucose inhibe la capacitation induite par l'héparine chez le taureau. Les bicarbonates augmentent le pH durant la capacitation et favorisent ainsi la réaction acrosomique (Parrish, *et al.*, 1989 ; Roblero, *et al.*, 1988).

L'augmentation de la synthèse d'AMP cyclique stimulée par l'activité adényl-cyclase et l'inhibition de l'activité phosphodiésterasique, a été mise en évidence au cours de la capacitation et de l'hyperactivation du mouvement. L'élévation du calcium intracytoplasmique semble contrôler cette activité

enzymatique. Une activité protéine kinase a été mise en évidence au niveau du flagelle participant au contrôle de la mobilité (Tash et Means, 1983 ; White et Aitken, 1989).

L'augmentation de la perméabilité aux ions  $Ca^{++}$  qui résulte de la déstabilisation membranaire entraîne une hyperactivation des spermatozoïdes, c'est à dire, une augmentation de l'amplitude du battement flagellaire et une modification de leur trajectoire (Jouannet et Serres, 1995 ; Serres, *et al.*, 1991). Certains auteurs suggèrent que cette hyperactivation génère une énergie facilitant la migration des spermatozoïdes et leur contact avec les cellules folliculeuses et la ZP. Les spermatozoïdes hyperactivés, qui entrent en contact avec les cellules folliculeuses, pénètrent immédiatement dans le gel d'acide hyaluronique. Il semble que, lors de ce passage, l'acrosome libère une certaine quantité de hyaluronidase capable de liquéfier la matrice intercellulaire (Katz, *et al.*, 1989 ; Suarez, *et al.*, 1991).

### • Facteurs capacitants et décapacitants

La face externe de la membrane plasmique contient des glycoprotéines adsorbées ou des polysaccharides liés à la membrane par des liaisons superficielles non covalentes et qui ne pénètrent pas dans la bicouche lipidique. Ces facteurs appelés décapacitants sont susceptibles de masquer des sites de liaison ou des récepteurs ioniques ou d'activation cellulaire. Ils proviennent des liquides testiculaire, épидидymaire ou séminal.

Un groupe est constitué de glycoprotéines de masses moléculaires élevées (180-260 kDa) qui stabilisent l'acrosome ou inhibent la liaison à la zone pellucide (Zaneveld, *et al.*, 1991).

Une autre glycoprotéine épидидymaire et séminale identifiée est appelée l'acrostatine. D'environ 5 kDa, elle inhibe l'acrosine, enzyme essentielle pour la fertilisation, présente sur la tête du spermatozoïde. La caltrine est un inhibiteur du transport du calcium qui a été isolé du plasma séminal de taureau (Rufo, *et al.*, 1982).

Un autre facteur est un polylactosaminyl glycoside de haute masse moléculaire mis en évidence dans le fluide épидидymaire de la souris. Ce facteur inhibe la galactosyltransférase, enzyme de la membrane du spermatozoïde de souris qui intervient dans la liaison du spermatozoïde à la ZP. La présence de cet inhibiteur dans le plasma séminal humain ainsi que le rôle de la galactosyltransférase dans la fixation du spermatozoïde humain à la ZP, restent à démontrer (Zaneveld, *et al.*, 1991).

Tous ces facteurs peuvent être assez facilement détachés par des agents physiques ou chimiques comme les lavages par centrifugation, détergents, drogues, hormones comme la progestérone, catecolamines, taurine, hypotaurine, NECA qui est un analogue de l'adénosine et il exerce une influence sur le système adénylate-cyclase, albumine, protéases, hydrolases et lipides (Emiliozzi, *et al.*, 1995 ; Yanagimachi, 1975). Tous ces facteurs sont considérés comme agents capacitants.

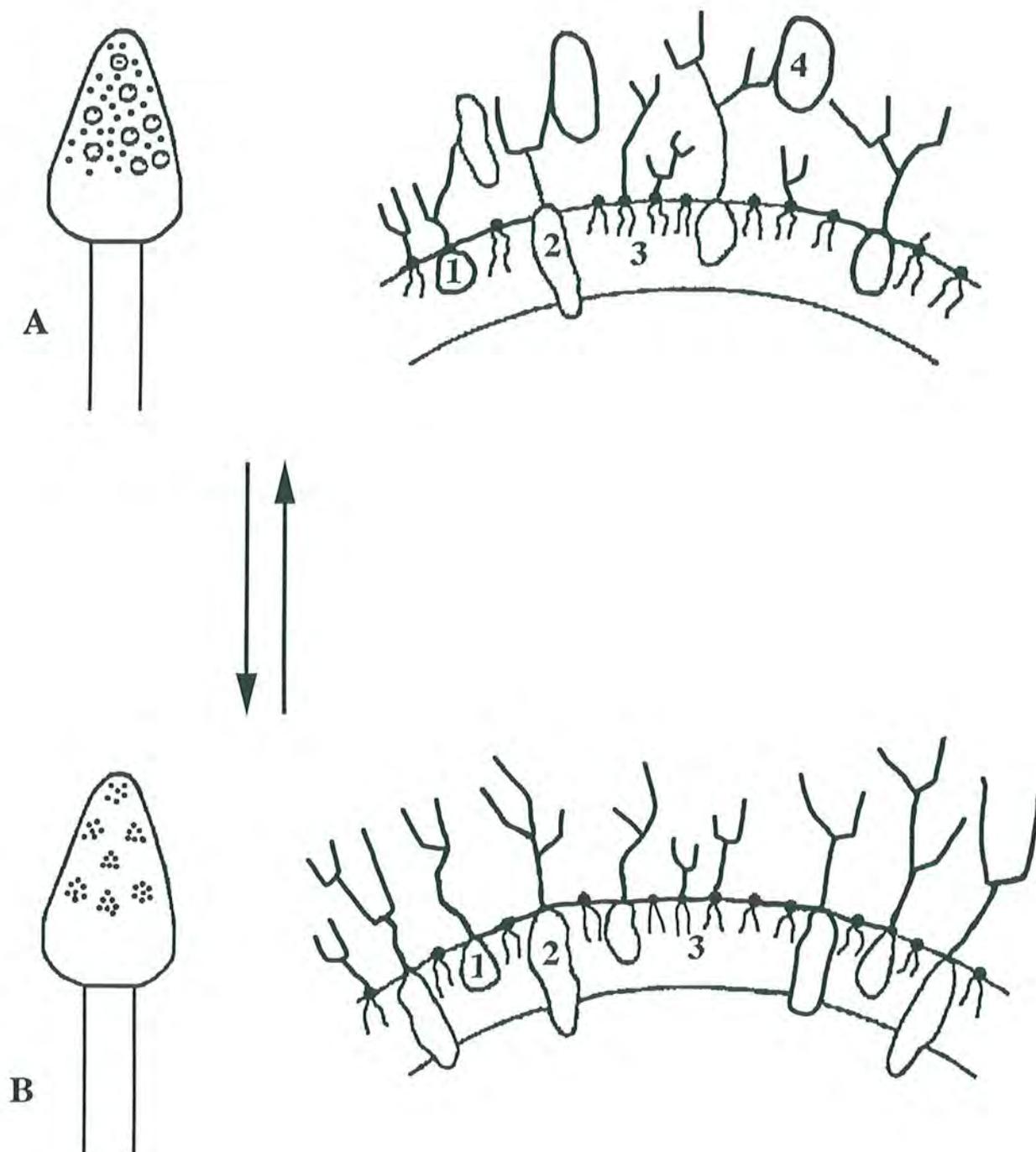


Figure 3. Disposition des molécules selon le modèle proposé par O'Rand en 1979:  
A. Avant capacitation. B. Après capacitation. 1. Glycoprotéines mobiles.  
2. Glycoprotéines non mobiles. 3. Glycolipides. 4. Composants périphériques.

## **b) Réaction acrosomique**

### **• Généralités**

A l'issue de la capacitation, le spermatozoïde est capable d'accomplir la réaction acrosomique. La réaction acrosomique induit un phénomène d'exocytose qui permet aux spermatozoïdes de pénétrer la zone pellucide et de fusionner avec la membrane plasmique ovocytaire. Il est décrit la formation de vésicules membranaires qui s'ouvrent lors de la pénétration du spermatozoïde (figure 4), mettant alors en contact direct la membrane interne de l'acrosome et la ZP (Crozet, 1991). Ces événements nécessitent un environnement extracellulaire favorable incluant la composition ionique qui joue un rôle primordial dans la stimulation des processus nécessaires aux fonctions du spermatozoïde. La fusion des membranes déstabilisées est suivie de leur rupture qui libère les enzymes acrosomiques. La libération des enzymes hydrolytiques de l'acrosome provoque la formation d'une cavité dans la ZP où pénètre la tête du spermatozoïde poussée par les battements flagellaires (figure 5).

Seule la microscopie électronique a été capable de permettre la visualisation du phénomène dynamique, à savoir, la fusion de la membrane acrosomique externe avec la membrane plasmique, les vésicules de ces membranes fusionnées, la libération d'enzymes liées à la matrice acrosomique, comme l'acrosine, à travers les pores ainsi formés, et l'extériorisation de la membrane interne de l'acrosome.

La première barrière peri-ovocytaire que rencontre le spermatozoïde, est l'ensemble des cellules folliculeuses (cumulus) ; la hyaluronidase contenue dans l'acrosome devrait en théorie favoriser la progression des spermatozoïdes à ce niveau mais ceci implique une réaction acrosomique précoce qui modifie les caractéristiques antigéniques du spermatozoïde et entraîne la fixation du gamète au cumulus ; en fait, seuls les spermatozoïdes capités à acrosome intact traversent le cumulus sans y adhérer et la présence du cumulus ne semble pas un impératif pour la fécondation de l'ovocyte dans l'espèce humaine (Crozet, 1991 ; Plachot, 1988).

Les spermatozoïdes qui entrent en contact avec la ZP se fixent à sa surface; une liaison s'établit entre des glycoprotéines de la ZP et des protéines de la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes. Le phénomène de reconnaissance et de fixation est étroitement spécifique, les spermatozoïdes d'une espèce animale ne se fixent pas à la ZP des ovocytes d'une autre espèce.

Pour certains auteurs la réaction acrosomique s'apparente au modèle d'exocytose de certaines cellules somatiques : les vésicules sécrétoires migrent vers la membrane plasmique mais le cytosquelette et les forces osmotiques les empêchent d'entrer en contact avec cette membrane tant que le signal approprié n'est pas reçu. Il est probable que les mêmes forces soient présentes dans le spermatozoïde de telle sorte que l'arrangement spatial de la membrane plasmique et de l'acrosome est maintenu durant le transport spermatique (Zaneveld, *et al.*, 1991).

## • Lieu de la réaction acrosomique

Après avoir traversé le cumulus, le spermatozoïde entre en contact avec la zone pellucide (ZP). On sait depuis longtemps que pour traverser cette enveloppe le spermatozoïde doit avoir effectué sa réaction acrosomique. Le lieu où elle se produit a fait l'objet d'affirmations contradictoires et de nombreuses controverses. Cela provient en partie du fait que la réaction acrosomique peut se produire spontanément en l'absence d'ovocyte et qu'on peut la provoquer *in vitro*. Plusieurs études ont permis d'aboutir à la conclusion que chez les mammifères la réaction acrosomique du spermatozoïde fécondant se produit au contact de la zone pellucide (Crozet et Dumont, 1984 ; Saling et Storey, 1979).

Sur la ZP, trois glycoprotéines sulfatées au rôle fonctionnel bien étudié chez la souris, ont été identifiées : ZP1, ZP2 et ZP3. La ZP3 a une masse moléculaire de 83 kDa et possède une chaîne polypeptidique qui porte des oligosaccharides ; cette molécule joue le rôle de récepteur grâce à ses oligosaccharides et seule la chaîne  $\alpha$  est responsable de la liaison spécifique d'espèce. Le spermatozoïde peut fixer *in vitro* 10 000 à 50 000 molécules ZP3 sur sa membrane (Plachot, 1988 ; Wassarman, 1987). La glycoprotéine ZP3 déclencherait cette réaction par sa partie protéique, en provoquant une entrée massive de calcium. Le calcium intracellulaire favoriserait la fusion progressive de la membrane externe de l'acrosome à la membrane plasmique du spermatozoïde en se liant aux phospholipides anioniques et en activant des phospholipases membranaires (Wassarman, 1987).

Chez l'homme, les molécules intervenant dans la fixation, n'ont pas encore été identifiées. Pour mieux comprendre les bases cellulaires et moléculaires de l'interaction gamétique chez l'homme, des expériences avec la ZP3 recombinante (rhuZP3) ont été faites. Certains auteurs ont montré le rôle essentiel des modifications post-translationnelles dans l'activité de la rhuZP3 et penchent pour un rôle de la ZP3 humaine dans les étapes précoces de la fécondation; ils mettent en évidence l'importance d'une glycosylation correcte dans l'induction de la réaction acrosomique (Barratt et Hornby, 1995).

En ce qui concerne le récepteur membranaire au niveau du spermatozoïde, une protéine membranaire de 95 kDa a été identifiée dans le spermatozoïde de souris, possédant les caractéristiques d'une tyrosine kinase qui a été appelée ZRK (zona receptor kinase), distincte de l'hexokinase. La conservation pendant l'évolution, des récepteurs tyrosine kinase ainsi que celle du ligand correspondant ZP3, suggère l'existence d'un RTK (receptor tyrosine kinase) spécifique de ZP3 dans le spermatozoïde humain. Il est possible que le ZRK soit une composante importante sur l'interaction spermatozoïde-ZP3 (Burks, *et al.*, 1995 ; Saling, *et al.*, 1995).

Le spermatozoïde fixé à la ZP effectue sa réaction acrosomique et expose donc sa membrane acrosomique interne, permettant une fixation secondaire à ZP2.

## • **Autres facteurs de la réaction acrosomique**

Il est établi que le calcium joue un rôle important dans la réaction acrosomique. Elle ne peut se produire dans un milieu qui en est dépourvu et elle s'accompagne toujours d'une élévation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{++}$ . D'après un modèle proposé chez le hamster, l'augmentation de  $\text{Ca}^{++}$  inactiverait des ATPases membranaires qui assurent le maintien d'un niveau intracellulaire faible de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$  et élevé de  $\text{K}^+$ . Tout cela entraînerait une élévation du pH intracellulaire et l'activation de certaines enzymes comme l'acrosine, qui conduirait à la dispersion du contenu de l'acrosome. Cet influx calcique pourrait agir sur la fusion de la membrane acrosomique externe et de la membrane plasmique, soit directement en se liant à des phospholipides anioniques, soit en activant des phospholipases membranaires avec formation de produits fusogènes (Yanagimachi, 1994).

Les protéines de liaison du GTP (protéines G) sont les médiateurs de certains récepteurs. Elles régulent l'activité d'enzymes comme l'adénylcyclase et les phospholipases  $\text{A}_2$  et C, ainsi que la mobilisation du calcium. Les protéines G pourraient exercer directement ou indirectement un contrôle sur les mécanismes qui régulent le pH et le contenu en calcium du spermatozoïde (Anderson, *et al.*, 1991 ; Crozet, 1994).

## • Induction de la réaction acrosomique

Étant donné que la réaction acrosomique spontanée n'affecte qu'un faible pourcentage de spermatozoïdes, on est généralement conduit à l'induire artificiellement pour évaluer la qualité des spermatozoïdes dans le but de l'assistance médicale à la procréation ou bien pour faire la recherche. Les principaux agents connus comme stimulant la réaction acrosomique des spermatozoïdes humains sont l'ionophore A-23187 (Aitken, *et al.*, 1994 ; Holden, 1991), le fluide folliculaire (Ghetler, *et al.*, 1990) et la progestérone. La progestérone est capable d'induire *in vitro* la réaction acrosomique chez l'homme ainsi que chez d'autres mammifères, par interaction avec un ou plusieurs récepteurs de la membrane plasmique du spermatozoïde (Krausz, *et al.*, 1995 ; Meizel, 1995 ; Meyers, *et al.*, 1995).

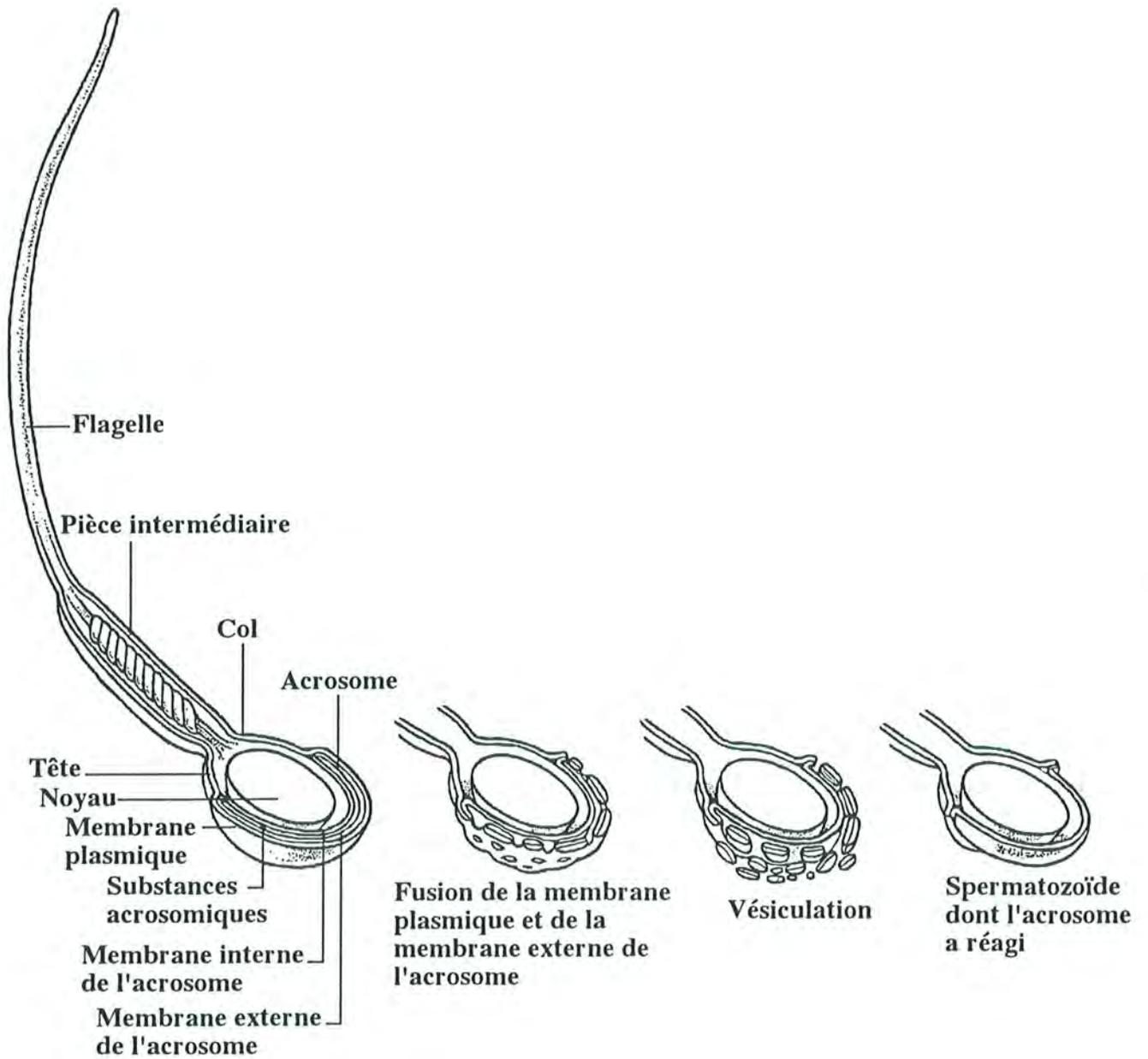


Figure 4. La réaction acrosomique (Wassarman, 1988)

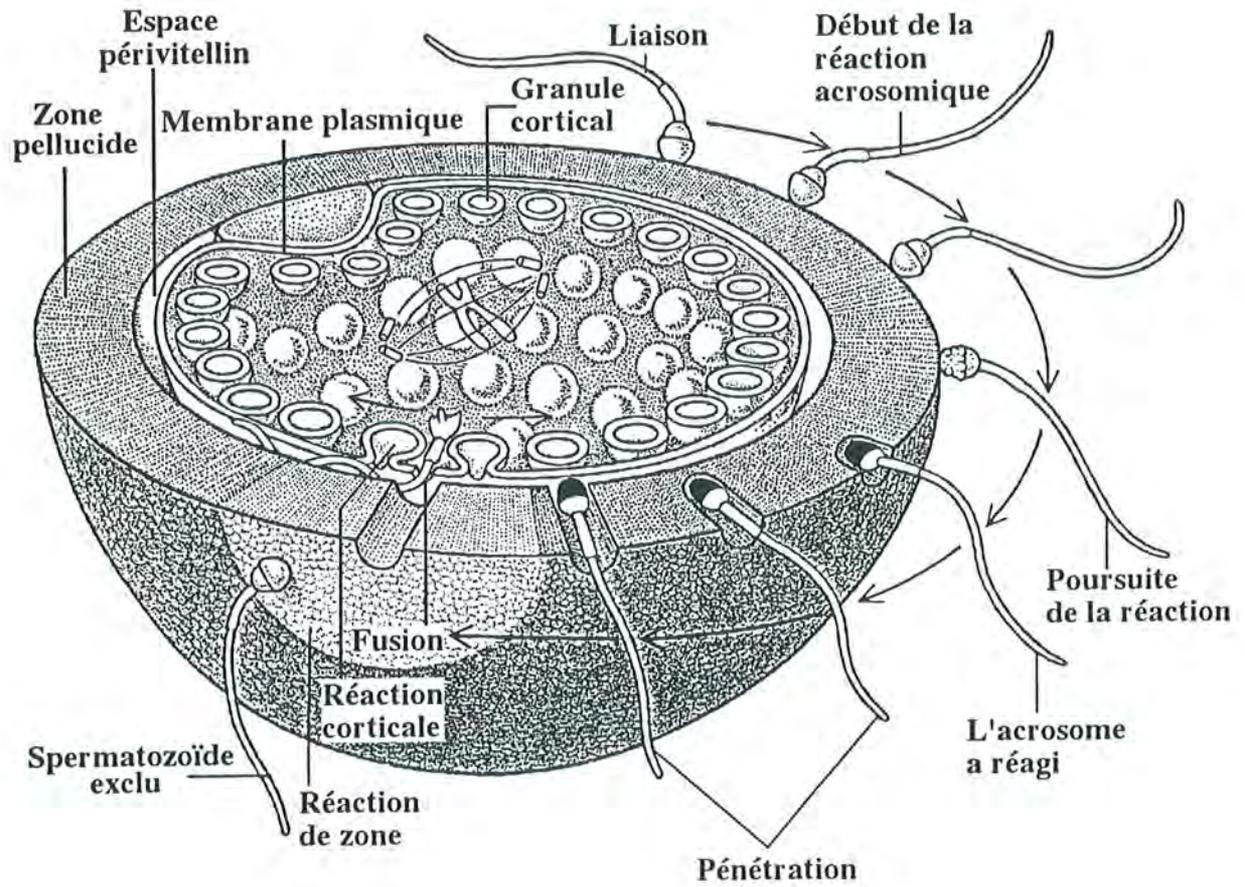


Figure 5. Interaction du spermatozoïde avec l'ovocyte (Wassarman, 1988)

### **c) Fusion de gamètes**

Le spermatozoïde, après avoir franchi la zone pellucide, s'introduit dans l'espace périvitellin, il s'immobilise et les deux gamètes fusionnent. La fusion se produit entre la membrane plasmique qui recouvre le segment équatorial du spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte. La membrane plasmique du spermatozoïde qui persiste au niveau du segment équatorial du spermatozoïde a subi des modifications au cours de la réaction acrosomique qui l'ont rendue apte à la fusion. Le début de la fusion provoque une décharge de  $\text{Ca}^{++}$  à partir du reticulum endoplasmique lisse qui se propage en quelques secondes dans l'ensemble de l'œuf et est responsable de l'activation de l'activité métabolique. Il y a aussi un changement de potentiel transmembranaire et une augmentation de la perméabilité au  $\text{K}^+$ .

### **d) Réaction corticale**

Le changement de potentiel dû à la modification de la perméabilité membranaire, provoque un blocage rapide mais transitoire de la polyspermie, suivi, une minute plus tard, d'un blocage lent mais permanent. La dépolarisation de la membrane induit la réaction corticale. Les granules corticaux sont de petits organelles lysosomiques entourés d'une membrane et situés juste sous la membrane plasmique de l'ovocyte. Ces granules fusionnent avec la membrane cytoplasmique et libèrent par exocytose leurs enzymes hydrolytiques dans l'espace

périvitellin. Les enzymes provoquent des modifications chimiques et physiques de la ZP qui la rendent imperméable à d'autres spermatozoïdes. Malgré la rapidité du blocage, il peut arriver que plusieurs spermatozoïdes franchissent en même temps la ZP et pénètrent dans l'ovocyte provoquant une polyploïdie et un arrêt le plus souvent précoce du développement de l'œuf fécondé (Czyba et Montella, 1993).

### **e) Étape finale de la fécondation**

L'entrée du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte induit la reprise et l'achèvement de la deuxième division méiotique avec la formation d'un pronucleus féminin et un masculin. La production au cours de la méiose de deux globules polaires assure la réduction de moitié du nombre de chromosomes et le maintien de l'ensemble des réserves cytoplasmiques de l'œuf.

A l'exception du noyau et des rares mitochondries, tous les composants du spermatozoïde sont probablement détruits par des lysosomes. L'enveloppe nucléaire disparaît et la chromatine est décondensée en moins d'une heure, mais une nouvelle enveloppe nucléaire est mise en place délimitant un pronoyau plus volumineux que le noyau du spermatozoïde et à chromatine moins dense que celle du pronoyau femelle.

Les deux pronoyaux se placent presque au contact l'un de l'autre mais ne fusionnent pas (caryogamie ou amphimixie). Ils sont chacun le siège d'une prophase au cours de laquelle s'individualisent les chromosomes. On observe un accroissement du métabolisme

énergétique de l'ovocyte, tout particulièrement une élévation de l'activité respiratoire et une modification des synthèses protéiques ; chez la souris le taux de synthèse de 6 protéines est augmenté alors que celui de 11 autres est diminué (Chen, *et al.*, 1980). Les enveloppes des pronoyaux sont détruites et les chromosomes viennent se placer autour de la plaque équatoriale métaphasique. L'assemblage des matériaux génétiques maternels et paternels marque la fin de la fécondation et le début du développement embryonnaire.

## **2) CAUSES DE STÉRILITÉ**

### **A) Généralités**

La fécondation est impossible si les gamètes ne peuvent pas se rencontrer, soit parcequ'ils sont absents, soit parce qu'il existe un obstacle mécanique dans les voies génitales, soit parce qu'ils sont détruits au cours de leur trajet.

La fréquence des couples qui après deux ans de rapports sexuels réguliers et complets n'ont pas eu de grossesse même interrompue est d'environ 10 % quel que soit le pays considéré. Le terme stérilité devrait être appliqué stricto sensu aux seuls couples définitivement stériles. Les autres, ceux qu'on parvient à traiter, sont des couples hypofertiles.

Une hypofertilité de l'un peut être masquée par l'hypofertilité de l'autre. Il est difficile d'affirmer des chiffres exacts mais la plupart de rapports indiquent que dans 45 % des stérilités du couple, il existe un facteur masculin, 45 % sont dues à un facteur féminin et 10 % sont dues à une pathologie à la fois chez l'homme et chez la femme.

La mise en évidence de la cause de la stérilité repose sur l'investigation clinique et sur des examens complémentaires qui doivent être systématiquement réalisés afin de ne pas méconnaître plusieurs pathologies associées.

## **B) Chez la femme**

Dans la plupart des cas, la stérilité féminine absolue est due à l'occlusion des trompes, empêchant ainsi physiquement la rencontre de l'ovule avec les spermatozoïdes. Cette forme de stérilité est le plus souvent consécutive à une infection génitale à partir de maladies sexuellement transmissibles ou bien à des séquelles d'infections abdominales.

Certaines malformations de la vulve, du vagin ou de l'utérus sont susceptibles d'entraîner la stérilité en s'opposant à une pénétration suffisante lors du coït, de même certaines lésions cicatricielles.

Il y a aussi les stérilités dans lesquelles l'ovaire est impliqué soit parce qu'il présente une lésion qui gêne son fonctionnement correct, soit parce qu'il fonctionne de manière défectueuse, généralement par suite de troubles de la commande hypothalamo-hypophysaire.

## **C) Chez l'homme**

En ce qui concerne le partenaire masculin, beaucoup de progrès ont été faits dans la compréhension de la physiologie des infertilités masculines :

### **a) Stérilités sécrétoires**

La spermatogenèse peut être insuffisante soit pour des causes testiculaires, soit parce que la sécrétion de FSH est insuffisante.

- Causes testiculaires :

- cryptorchidie non traitée ou traitée de façon trop tardive
- varicocèle, qui entraîne une altération progressivement aggravée

de la spermatogenèse

- augmentation de la température au niveau des testicules
- altération congénitale
- causes iatrogènes qui sont fréquentes

Toutes ces causes ont des dénominateurs communs : une sécrétion de testostérone habituellement normale et un taux de FSH élevé.

- Sécrétion de FSH insuffisante.- Cette anomalie entre dans le cadre des hypogonadismes dits hypogonadotropes, parce qu'il existe également une insuffisance de sécrétion de LH par atteinte de l'hypothalamus et/ou de l'hypophyse. Ces troubles peuvent être iatrogènes ou liés à des hyperprolactinémies, rares chez l'homme.

## **b) Stérilités excrétoires**

Elles résultent d'obstacles à la progression des spermatozoïdes dans les voies spermatiques. La cause en est le plus souvent acquise et infectieuse, au premier plan il y a les infections à chlamydiae. Celles-ci sont infiniment plus fréquentes que les gonococcies ou la tuberculose, elles peuvent n'avoir aucune traduction fonctionnelle et pourtant atteindre prostate et épididyme. Il faut savoir qu'un obstacle sur les voies excrétrices peut, à la longue, retentir sur la spermatogenèse et l'altérer de façon irréversible (Schoysman, *et al.*, 1989).

## **c) Anomalie de l'éjaculation**

L'éjaculation rétrograde vers la vessie (anéjaculation avec orgasme conservé) peut être secondaire à un traumatisme chirurgical pelvien, à une maladie neurologique (neuropathie diabétique par exemple) (Jouannet, 1989).

## **d) Les immunités**

Les protéines, glycoprotéines et lipoprotéines de la membrane du spermatozoïde, différenciées lors de la spermatogenèse, diffèrent en tant qu'antigènes de ceux des cellules somatiques de l'individu puisqu'ils correspondent à l'expression d'un génome haploïde. Normalement les spermatozoïdes n'entrent pas en contact avec les cellules du système immunitaire et leurs antigènes sont parfaitement tolérés. Il peut cependant se produire une défaillance des systèmes de protection suivie de la production d'anticorps anti-spermatozoïdes (De Almeida, 1989).

Chez de nombreuses espèces animales, l'immunisation expérimentale contre des spermatozoïdes homologues conduit à la formation d'anticorps altérant la fertilité *in vivo*. Des études *in vitro* sur des modèles animaux ont montré que les anticorps pouvaient altérer les interactions spermatozoïdes-ovocyte (Fierro, *et al.*, 1994 ; Tesarik, *et al.*, 1990).

De même, dans l'espèce humaine, une immunisation dirigée contre des antigènes spermatiques peut être un facteur d'infertilité qu'elle soit présente chez l'homme (auto-immunité) ou chez la femme (iso-immunité). La plupart des études faites sur cette immunité se sont limitées à la recherche des anticorps circulants dirigés contre des spermatozoïdes. La fréquence de ces anticorps est très variable selon les séries des sujets infertiles étudiés : 3 à 15 % chez l'homme et 3 à 22 % parmi les femmes. Chez l'homme, des taux élevés d'anticorps sériques sont toujours associés à la présence d'anticorps fixés sur les spermatozoïdes éjaculés mais dans quelques cas, assez rares,

l'immunité n'est décelée que dans l'éjaculât. Chez la femme, la corrélation entre les anticorps sériques et les anticorps détectés dans le mucus cervical est faible. Ainsi des titres élevés d'anticorps peuvent être détectés dans le sérum sans contrepartie dans les sécrétions cervicales et vice-versa. Par contre, il y a une bonne corrélation entre le taux des anticorps circulants et leur présence dans les liquides folliculaires (De Almeida, 1991 ; De Almeida, 1993).

La fixation des auto-anticorps sur les antigènes membranaires est responsable de l'agglutination et de l'immobilisation des spermatozoïdes dans l'éjaculât ou la glaire, d'une diminution de leur mobilité et de leur survie dans l'utérus et les trompes et de la neutralisation des fonctions de reconnaissance de la zone pellucide et de fusion à l'ovocyte.

### **3) ASSISTANCE MÉDICALE À LA PROCRÉATION**

L'assistance médicale à la procréation (AMP) a fait son apparition il y a une vingtaine d'années avec la création de banques de spermés agréés par le Ministère de la Santé, et implantées dans des structures hospitalo-universitaires pour la plupart : il s'agissait des CECOS (Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Spermés Humains), pratiquant principalement des inséminations avec spermé de donneur dans un contexte de stérilité définitive du mari. Des laboratoires de biologie de la reproduction se sont développés réalisant des examens dans le cadre d'hypofertilités masculines ou de stérilités cervicales, mais c'est seulement depuis une dizaine d'années que l'AMP a eu un essor exceptionnel avec le développement de la fécondation *in vitro* (FIV) et actuellement de la microinjection.

La procréation médicalement assistée s'entend des techniques médicales et biologiques permettant la procréation en dehors des processus naturels (article L.671.1 de la loi Bioéthique de 1994). Il s'agit donc de procréations sans rapport sexuel qui ne sont pas curatifs dans le sens où ils ne rétablissent pas la fonction déficiente. Les équipes d'AMP ont maintenant à leur disposition une vaste panoplie de techniques mais elles doivent veiller à définir une stratégie thérapeutique rigoureuse, et la mieux adaptée à chaque situation de stérilité pour éviter un risque d'acharnement thérapeutique. Non

seulement les techniques se sont multipliées mais encore les indications se sont élargies et les progrès accomplis ont fait surgir à chaque étape de nouvelles questions éthiques.

Tout diagnostic de stérilité doit être relativisé en tenant compte de la durée de l'infécondité. Un large consensus s'accorde sur une durée de deux ans pour qu'on puisse admettre la notion d'infécondité dans un couple. Cette notion d'une durée minimale d'infécondité à respecter doit toutefois être nuancée en fonction du bilan étiologique et de certains contextes particuliers. Il existe des cas où la stérilité de l'homme peut être considérée comme totale et définitive : azoospermie avec destruction ou atteinte irréversible de la lignée germinale, immobilité complète des spermatozoïdes, absence totale d'acrosomes, etc.

La fécondation *in vitro* (FIV) expérimentale permet l'observation des différentes étapes de la fécondation (fixation sur la ZP, pénétration, fusion de gamètes). La première FIV d'un ovocyte de mammifère, confirmé cytologiquement, a été réalisée en 1954 chez la lapine à partir de spermatozoïdes capacités dans l'utérus et d'ovocytes récemment ovulés; pour appréhender les mécanismes de la capacitation, les fécondations furent tentées avec des spermatozoïdes capacités *in vitro*. Les premières FIV dans ces conditions ont été obtenues chez des rongeurs, puis chez l'homme (1969) et beaucoup plus tardivement chez les gros mammifères domestiques. La FIV d'ovocytes maturés *in vitro* a également été réalisée avec succès chez différentes espèces (Betancourt, *et al.*, 1993 ; Crozet, 1991). Les échec de FIV permettent de cerner certaines étiologies d'infertilité et d'orienter des recherches plus spécifiques d'anomalies : anomalies ultra-structurales du flagelle, anomalies de l'acrosome, de la cape postacrosomique et de décondensation de la chromatine (Bartoov, *et al.*, 1980). Tout cela

montre que les moyens de remédier à l'infécondité se sont développés seulement dans les dernières décennies et que la transition des techniques de l'animal à l'homme est un processus très rapide.

Les principales méthodes biomédicales qui permettent de lutter contre l'infécondité sont :

## **A) Insémination artificielle**

### **a) Insémination artificielle avec sperme du conjoint (IAC)**

C'est une méthode ancienne proposée devant une infertilité du couple qui permet d'optimiser les chances de grossesse dans certaines indications bien définies. Elle est considérée comme le premier stade dans les procréations médicalement assistées pour indications non tubaires.

L'insémination consiste à déposer les spermatozoïdes à différents niveaux du tractus génital féminin. Elle peut être intracervicale ou intra-utérine.

### **b) Insémination artificielle avec sperme de donneur (IAD)**

C'est la même méthode qui a été décrit précédemment mais avec le sperme d'un donneur anonyme.

## **B) FIV (FIVETE)**

La FIV nécessite la réalisation d'une série d'étapes *in vitro* aboutissant à l'obtention d'embryons. La procédure de la FIV comporte plusieurs étapes : la récupération et la mise en culture des ovocytes, le recueil et la préparation du sperme, l'insémination et la culture embryonnaire.

La FIV suivie de transfert embryonnaire (FIVETE) a largement fait la preuve qu'elle était une thérapeutique fiable des stérilités tubaires définitives et un traitement alternatif dans d'autres stérilités : idiopathiques, immunologiques et endométriose.

## **C) Micromanipulations**

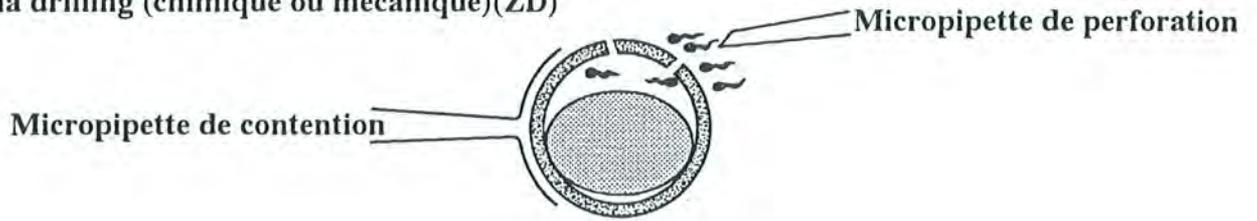
Les techniques de micromanipulation des gamètes (figure 6) visent à contourner la zone pellucide pour favoriser un contact direct entre le spermatozoïde et l'ovocyte (Wolf et Jouannet, 1991).

**a) Zona drilling (ZD)**

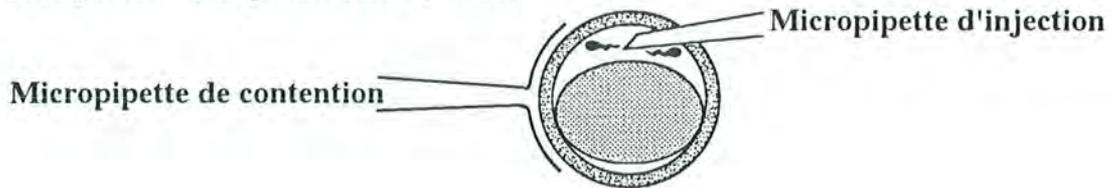
**b) Micro-injection sous-pellucidaire (MISP)**

**c) Micro-injection intra-cytoplasmique (ICSI)**

**A. Zona drilling (chimique ou mécanique)(ZD)**



**B. Micro-injection sous-pellucidaire (MISP)**



**C. Micro-injection intracytoplasmique (MIC)**

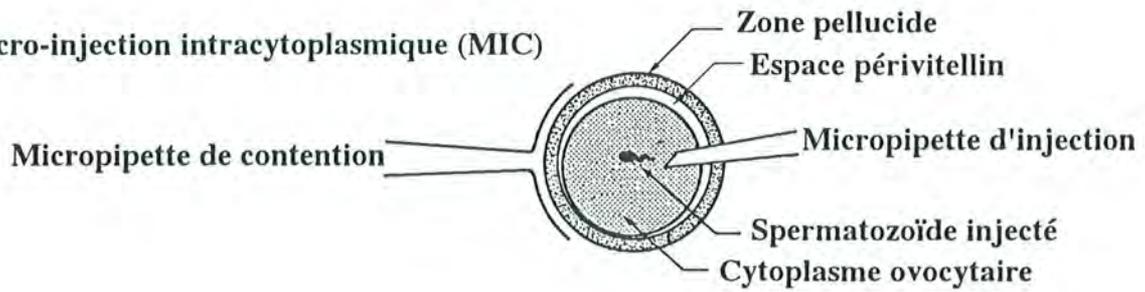


Figure 6. Différentes méthodes de micromanipulations des gamètes (Barrière et al, 1996)

**II) MODIFICATIONS DU  
GLYCOLEMME AU COURS DE LA  
CAPACITATION ET LA RÉACTION  
ACROSOMIQUE DU  
SPERMATOZOÏDE HUMAIN  
IDENTIFIÉES PAR DES LECTINES**

# **1) INTRODUCTION**

La capacitation et la réaction acrosomique s'accompagnent (comme on vient de décrire), entre autres phénomènes, de changements de la topographie des glucides du glycolemme. Ce dernier est constitué par les parties glucidiques des glycoprotéines et des glycolipides membranaires.

Les glucides sont des composés naturels largement répandus chez tous les êtres vivants. Toutes les cellules eucaryotes possèdent des glucides au niveau de leurs surfaces, à la fois sous forme de chaînes oligosaccharidiques et polysaccharidiques liées de façon covalente aux protéines membranaires (glycoprotéines) et sous forme de chaînes oligosaccharidiques liées de façon covalente aux lipides (glycolipides).

Les portions glucidiques sont liées de façon, covalente mais leur arrangement est très complexe, faisant intervenir la structure du squelette protéique ou lipidique et aussi la synthèse et le métabolisme des glycoprotéines qui sont sous le contrôle d'enzymes : les glycosyltransférases qui fixent des sucres spécifiques et les hydrolases qui éliminent des sucres spécifiques. Les liaisons établies sont soit de type N-glycosidique sur un résidu asparagine, soit de type O-glycosidique sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Les glucides fixés sont des oses (xylose, mannose, galactose), des hexosamines (D-glucosamine, D-galactosamine, le plus souvent sous forme N-acétylée) ou des acides sialiques, dérivés de l'acide neuraminique. Les oligosaccharides N-glycosylés contiennent habituellement 12 oses environ et sont construits autour d'un noyau commun de résidus mannose, alors que les oligosaccharides

O-glycosylés ont tendance à être plus courts (environ 4 oses) (Alberts, *et al.*, 1989 ; Gahmberg, *et al.*, 1992).

Les glucides simples (monosaccharides) sont des composés de formule  $(CH_2)_n$  ou  $n$  est un nombre entier variant de 3 à 7, tels que le glucose et le fructose. Les glucides peuvent exister sous une forme linéaire ou cyclique. Sous leur forme linéaire, ils possèdent un certain nombre de groupements hydroxyle et un groupement aldéhyde ou cétone qui jouent un rôle particulier.

Premièrement, ils peuvent réagir avec un groupement hydroxyle dans la même molécule, pour convertir la molécule en une forme cyclique. Dans la forme cyclique, le carbone du groupement aldéhyde ou cétone d'origine peut être identifié comme le seul qui soit lié à deux oxygènes.

Deuxièmement, une fois la forme cyclique formée, le carbone peut contracter une liaison supplémentaire avec un des carbones qui porte un groupement hydroxyle sur une autre molécule de glucide, créant ainsi un disaccharide.

L'addition, par le même moyen, d'autres monosaccharides aboutit à la formation d'oligosaccharides d'une longueur croissante (trisaccharides, tétrasaccharides, etc.) jusqu'à de très grosses molécules polysaccharidiques composées de milliers d'unités monosaccharidiques (résidus). Étant donné que chaque monosaccharide possède plusieurs groupements hydroxyle libres susceptibles de former une liaison avec un autre monosaccharide (ou avec un autre composé), le nombre de structures polysaccharidiques possibles est gigantesque.

La structure des chaînes glucidiques est très complexe. Alors que les acides aminés des protéines et les nucléotides des acides nucléiques s'enchaînent linéairement, les monosaccharides peuvent se lier en

plusieurs points. Deux acides aminés donnent un seul dipeptide tandis que deux monosaccharides identiques peuvent se combiner pour donner 11 disaccharides différents. (Sharon et Halina, 1993).

Les cellules s'identifient par l'intermédiaire de structures présentes à leur surface, en particulier par les glucides membranaires, le plus souvent localisés à la périphérie des structures protéiques. Une cellule qui porte une structure caractéristique d'une information biologique est spécifiquement reconnue par les cellules qui possèdent le ligand correspondant, tel est le cas de la reconnaissance entre l'ovule et le spermatozoïde. On a identifié la structure de certaines glycoprotéines et de glycolipides de surface mais la liste n'est pas exhaustive.

Une manière de démontrer la présence de glucides à la surface cellulaire est d'utiliser des protéines de liaison des glucides : les lectines.

Puisque les lectines se lient à des glycoprotéines, des protéoglycannes et des glycolipides présents à la surface des cellules, elles sont largement utilisées en biologie cellulaire comme outils biochimiques afin de localiser et d'isoler des molécules de la membrane plasmique qui contiennent des glucides (Damjanov, 1987). Certaines lectines de végétaux couramment utilisées ainsi que leur spécificité glucidique sont répertoriées dans le tableau 1.

Fréquemment, des lectines ayant la même spécificité monosaccharidique montrent des affinités différentes pour une même cellule ou un même tissu dans des préparations histochimiques (Damjanov, 1987 ; Griffiths, 1993).

Les lectines sont des molécules stables que l'on peut conjuguer à une grande variété de marqueurs tels que l'or colloïdal, les fluorochromes, des enzymes, des radio-isotopes, sans inactiver les sites

de fixation pour les glucides. On peut aussi utiliser des anticorps antilectines (Mac Coy, 1987) pour les localiser secondairement.

Les lectines couplées à des particules denses aux électrons permettent réaliser des études ultrastructurales en microscopie électronique; les marqueurs les plus utilisés sont l'or colloïdal, la ferritine et le complexe avidine-biotine, entre autres. Elles sont aussi utilisées conjuguées aux colorants fluorescents et elles permettent une étude morphologique en microscopie optique à fluorescence, ou bien une étude quantitative en cytométrie de flux.

L'utilisation des lectines ouvre de nombreuses voies de recherche ; actuellement elles sont utilisées dans des études de polarité de la membrane cellulaire, modifications de membrane sous l'influence de divers stimulants, identification des récepteurs, etc.

## PRINCIPALES LECTINES

ORIGINE	ACRONYME	SPÉCIFICITÉ	MASSE MOLÉCULAIRE kDa
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	NAcGlc, Ac. Sial	36
<i>Pisum sativum</i>	PSA	$\alpha$ -Man	49
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	$\beta$ -D-Gal	108
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	NAcGal	140
<i>Glycine max</i>	SBA	NAc-D-Gal	110
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	D-Man	102
<i>Lens culinaris</i>	LCA	$\alpha$ -Man	46
<i>Vicia faba</i>	VFA	$\alpha$ -Man	50
<i>Ulex europaeus</i>	UEA	L-Fuc	170
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA	$\beta$ -Gal	128
<i>Ricinus communis</i>	RCA	$\beta$ -Gal	120
<i>Helix pomatia</i>	HPA	NAc- $\alpha$ -Gal	79
<i>Bandereia ou Griffonia simplicifolia</i>	BS-1-A <sub>4</sub>	$\alpha$ -D-NAcGal	114
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jacalin	$\beta$ -Gal	39,5
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	NAcGal	400

**Tableau 1.** Les lectines, les plus utilisées (Benhamou, 1989 ; Griffiths, 1993).

## **2) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

Le présent travail a comme objectifs :

a) L'étude qualitative et quantitative des sites glucidiques membranaires du spermatozoïde humain au cours de la réaction acrosomique.

Cette étude a aussi pour but d'évaluer la dynamique du processus dans les conditions de préparation *in vitro* des gamètes pour la FIV.

Une appréciation de la fécondance du sperme en vue du pronostic de réussite de l'Assistance Médicale à la Procréation est aussi proposée..

b) Étude d'une technique en triple marquage permettant de juger la réaction acrosomique et la vitalité des gamètes. Cet essai technique est destiné à améliorer l'interprétation des résultats obtenus avec l'objectif précédent.

### **3) MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Les spermés étudiés proviennent de 60 patients du CECOS (Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme Humains) de la Maternité Régionale de Nancy. Tous les spermés ont été classés normospermiques (World Health Organisation, 1992). Les échantillons ont été recueillis par masturbation, après un délai d'abstinence sexuelle de trois à cinq jours, qui assure un volume d'éjaculat et une concentration de spermatozoïdes optimaux.

## **A) Analyse du sperme**

Pour analyser le sperme, un spermogramme et un spermocytogramme sont réalisés (Foliguet, *et al.*, 1991). Le spermogramme comprend un examen macroscopique (viscosité, volume, pH) et un examen microscopique (vitalité, numération, mobilité à 1, 4 et 7 h, recherche d'agglutinats de spermatozoïdes). Le spermocytogramme exprime les caractéristiques morphologiques; cet examen cytologique sur frottis coloré permet d'observer les formes normales et anormales.

## **B) Préparation des spermatozoïdes**

Après 20 minutes de liquéfaction de l'éjaculat à 37 °C en étuve (5 % CO<sub>2</sub>), un gradient de Percoll a été réalisé en versant

successivement et délicatement dans un tube à fond conique des aliquotes de 1 ml de solution de Percoll (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède) dilué dans du milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle (Eurobio, Les Ulis, France) en concentrations décroissantes (90 %, 70 % et 40 %) de façon à ce que les interfaces soient visibles entre les couches.

Le sperme est ajouté au sommet de la colonne (1,5 ml), puis centrifugé pendant 20 minutes à 600 g. Les zones 40 % et 70 % sont éliminées. La fraction 90 % est récupérée et lavée avec du milieu Tyrode (BICEF, L'Aigle, France) 15 minutes à 600 g. Le culot de spermatozoïdes est recueilli dans du milieu B2 Menezo (Api Système BioMérieux, Marcy l'Étoile, France; CCD, Paris, France), qui induit une capacitation *in vitro* (environ 4 h d'incubation). Ce milieu est composé de sels minéraux, de glucides, de cholestérol, d'acides aminés, d'acides nucléiques, de vitamines, de BSA (albumine bovine) et d'antibiotiques.

### **C) Induction de la réaction acrosomique**

L'ionophore calcique A-23187 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) est dilué dans de l'éthanol absolu (Coopération pharmaceutique française, Melun, France) pour obtenir une solution de stockage à 2 mM. Pour les manipulations, cette solution est diluée au 1/100ème dans du milieu B2 pour avoir une concentration finale de 20 mM (Parinaud, *et al.*, 1993).

On ajoute 5 µl de cette solution dans un tube contenant 500 µl de chaque échantillon de sperme. Après incubation pendant 0,5, 1, 2 et 3 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>), les échantillons sont lavés avec du tampon

phosphate 0,01 M, pH 7,4 (PBS) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) et centrifugés 5 minutes à 600 g. Le surnageant est éliminé.

## D) Lectines

Le terme de lectine est utilisé depuis 1954 pour décrire un groupe de protéines d'origine non-immune ayant des sites de liaison qui reconnaissent une séquence spécifique de résidus glucidiques et qui agglutine les cellules (Goldstein, *et al.*, 1980). A l'origine, elles furent isolées à partir de végétaux où on les trouve en quantités importantes dans de nombreuses graines ; certaines sont très toxiques et servent à dissuader les animaux de les manger. Plus récemment, la présence de lectines a été démontrée dans de nombreux organismes : bactéries et animaux, y compris les mammifères, certaines d'entre elles se trouvent sur la surface des cellules et on pense qu'elles sont impliquées dans la reconnaissance entre cellules.

Quatre lectines ont été utilisées dans cette étude : *Triticum vulgare* agglutinine (WGA), Concanavalin A (Con-A), *Arachis hypogea* agglutinine (PNA), and *Ulex europaeus* agglutinine (UEA-I), qui se fixent spécifiquement aux résidus d'acide sialique et N-acetylglucosamine, D-mannose,  $\beta$ -D-galactose, et, L-fucose, respectivement (Holden, *et al.*, 1990 ; Huang, *et al.*, 1982 ; Lassalle et Testart, 1994 ; Mortimer, *et al.*, 1987). Les lectines ont été utilisées conjuguées à la ferritine et à l'or colloïdal (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) pour la microscopie électronique, et conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pour la cytométrie de flux.

## **E) Neutralisation des lectines**

Pour mettre en évidence la spécificité glucidique du marquage des lectines, une neutralisation a été réalisée (témoins). Chaque lectine a été incubée pendant 30 minutes avec le sucre spécifique (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) à une concentration 0,3 M (Bains, *et al.*, 1992), avant d'être incubée avec les spermatozoïdes.

## **F) Microscopie électronique à transmission**

### **a) Le microscope**

La microscopie électronique est une technique qui permet de visualiser des structures grâce à des appareils dont la source de rayonnement émet des électrons. La résolution ou pouvoir séparateur du microscope est définie par la distance minimale séparant deux points individualisables, cette distance est proportionnelle à la longueur d'onde du rayonnement. L'utilisation des électrons apporte un pouvoir de résolution élevé (0,2 nm), nettement supérieur à celui du microscope optique (0,2 mm). Cette différence est due à la longueur d'onde des électrons qui est 100 000 fois plus faible que celle des photons.

On distingue habituellement 4 parties principales : le système d'illumination, le système d'élaboration des divers types d'images, le

système d'examen et le système de prise de vues (Hagege et Hagege, 1980).

## **b) Préparation des échantillons**

Dans cette étude, des échantillons de sperme ont été incubés pendant 1 h avec les lectines conjuguées à la ferritine (concentration 50 mg/ml) et d'autres avec les lectines conjuguées à l'or colloïdal, diluées au 1/30ème dans du PBS.

Après un lavage avec du PBS (37 °C) et centrifugation pendant 5 minutes à 600 g, les spermatozoïdes sont immédiatement fixés pendant 2 h à température ambiante (TA) avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4.

Les spermatozoïdes sont encore lavés et postfixés avec du tétr oxyde d'osmium à 1 % pendant 30 minutes à température ambiante. L'échantillon est lavé et centrifugé; le culot a été inclus en agarose à 2 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA).

Ensuite, on procède à une déshydratation progressive dans des alcools à 30°, 50°, 70°, 80°, 90° avec des bains de 5 minutes à température ambiante, puis d'alcool absolu trois fois 20 minutes et de propylène oxyde trois fois 20 minutes aussi.

La preimprégnation a été faite avec un volume de propylène et un volume d'épon (CIPEC, Paris, France) pendant 1 h puis l'échantillon est introduit dans l'épon pendant une quinzaine d'heures à température ambiante.

Finalement, l'inclusion est faite dans des moules avec un mélange frais d'épon dont la polymérisation à l'étuve à 56 °C pendant au moins 48 h assure le durcissement.

Le bloc contenant l'échantillon est taillé avec une fraiseuse en tronc de pyramide, ainsi on s'approche au maximum des cellules, la surface idéale d'un bloc est de 1 mm<sup>2</sup>. La présence des cellules est vérifiée ensuite avec des coupes semi-fines d'1,5 mm d'épaisseur, étalées sur lame de verre, séchées et colorées au bleu azur II. Les coupes ultrafines d'épaisseur de 60-70 nm ont été réalisées avec un ultramicrotome Reichert-Jung avec des couteaux de diamant.

Les coupes s'étalent à la surface de l'eau distillée contenue dans le réservoir du couteau et sont ensuite récupérées sur des grilles en cuivre 200 mesh (Sté René Janning, Vanves, France) et séchées. Les coupes sont colorées avec de l'acétate d'uranyle 2 % pendant 10-20 minutes à 37 °C au noir, et du Reynolds (sels de plomb) de 10 à 20 minutes à température ambiante au noir. Finalement les coupes sont analysées au Microscope Électronique à Transmission Philips CM12.

## **G) Cytométrie de flux**

La cytométrie de flux (CMF) est une méthode qui sert à mesurer certaines caractéristiques cellulaires, elle est définie comme l'étude une par une de cellules en suspension grâce à un système de lecture par laser (Ruiz-Argüellez, 1992).

La CMF comprend une part d'incertitudes et d'inconvénients qu'il ne faut pas méconnaître. La cytofluorométrie se distingue des méthodes d'analyse globale par l'analyse cellule par cellule. Elle a pour avantage, par rapport aux méthodes microscopiques, sa rapidité, le grand nombre de cellules analysées et la possibilité d'une analyse quantitative donc objective. La cytométrie de flux permet d'analyser plusieurs milliers d'éléments en quelques secondes.

La lumière diffusée sous un petit angle (moins de 12 degrés) (Forward scatter : FS) est liée à la taille de la cellule supposée sphérique. C'est un des paramètres les plus utilisés.

La lumière diffusée sous un angle droit (Side scatter : SS) est liée au contenu de la cellule et à son rapport nucléocytoplasmique (Benson, *et al.*, 1984). On peut considérer que cette mesure apprécie la granularité de la cellule.

On utilise des histogrammes biparamétriques représentant, par exemple la taille en abscisse (FS) et la granularité en ordonnée (SS). Il est également possible de visualiser la répartition de la valeur (moyenne, écart type) de n'importe quel paramètre dans la population cellulaire étudiée (histogrammes de type monoparamétrique) (Métézeau et Delamare, 1988).

Pour les études en cytométrie de flux, on a utilisé un cytomètre EPICS XL (Epics Division Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) localisé au Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine. L'analyse statistique a été faite avec le programme Slide Write Plus (Advanced Graphics Software, Carlsbad, CA, USA).

### **a) GB24 simple marquage**

GB24 est un anticorps monoclonal qui est obtenu *in vitro* après sélection et clonage d'hybridomes qui synthétisent un seul type d'immunoglobulines dirigées contre un épitope défini d'une protéine spécifique de l'acrosome. Les hybridomes sont issus de la fusion de cellules de myélome et de lymphocytes de souris immunisées avec une préparation de placenta humain. GB24 est une immunoglobuline G1/kappa, en raison d'une parenté antigénique entre le placenta humain et l'acrosome humain GB24 reconnaît spécifiquement un antigène de 48 kDa sur la membrane interne de l'acrosome du spermatozoïde humain (Fénichel, *et al.*, 1990). La fixation de l'anticorps GB24 permet donc de visualiser et de quantifier les spermatozoïdes ayant effectué cette réaction. Plusieurs techniques utilisant cet anticorps monoclonal ont été utilisées pour rechercher le démasquage de l'antigène de la membrane acrosomique.

Le culot de spermatozoïdes, obtenu après élimination de l'ionophore calcique, est resuspendu dans 100 µl d'une solution contenant l'anticorps monoclonal GB24 spécifique de la membrane interne de l'acrosome (Théramex, Monaco), (10 µl de la solution stock de GB24 dans 90 µl de PBS/BSA 0,1 %, pour 5 X 10<sup>6</sup> cellules dans 100 µl) (Fénichel, *et al.*, 1989).

L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 30 minutes. Les spermatozoïdes ont été ensuite lavés avec du PBS et centrifugés 5 minutes à 600 g. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 100 µl d'une solution d'anticorps anti-immunoglobulines de souris

conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Eurobio, Les Ulis, France), dilution 1/40ème dans du PBS.

Après 30 minutes d'incubation, les spermatozoïdes sont lavés comme au cours de l'étape précédente, puis fixés au paraformaldéhyde (PAF) 1 % pour permettre de conserver les cellules sans altération du marquage fluorescent pendant environ une semaine sous réserve de les conserver à 4 °C à l'abri de la lumière.

La proportion des spermatozoïdes marqués et leur intensité de fluorescence ont été mesurées avec le cytomètre. EPICS XL (Epics Division Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

## **b) Lectines simple marquage**

Les échantillons de sperme ( $10^5$  à  $5 \times 10^5$  cellules) ont été incubés avec 5 µl de lectine marquée à la fluorescéine pendant 30 minutes à 37 °C.

Les spermatozoïdes ont été lavés avec du PBS et fixés au PAF 1 % avant la lecture au cytomètre.

## **c) Lectines triple marquage**

- Il est possible de détecter simultanément plusieurs émissions de fluorescence, si on est capable de les exciter avec le même cytomètre. Dans ce cas, le marquage des spermatozoïdes a été fait avec trois marqueurs en même temps : iodure de propidium (IP) pour évaluer

la vitalité, anticorps GB24 pour évaluer la réaction acrosomique, et une lectine pour chercher les groupes glucidiques.

D'abord, 10 µl de l'anticorps GB24 (dilué comme plus haut) ont été ajoutés dans 100 µl de milieu B2 contenant une concentration de spermatozoïdes de  $5 \times 10^5$ .

Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, le culot de spermatozoïdes obtenu après élimination de l'anticorps, est lavé avec 1 ml de milieu B2 et centrifugé 5 minutes à 600 g. Le culot est resuspendu dans 100 µl de milieu B2.

Les spermatozoïdes ont été mis à incuber 20 minutes à 37 °C avec 10 µl d'anticorps anti-immunoglobulines de souris conjugué à la phycoérythrine (DAKO, Glostrup, Danemark), dilution 1/10ème dans du PBS. Ensuite un lavage est effectué dans les mêmes conditions qu'à l'étape précédente.

Le culot a été à nouveau suspendu dans 100 µl du milieu B2. Une troisième incubation a été faite avec 5 µl de lectine marquée à la fluorescéine (dilution 1/50ème dans du PBS) et 5 µl de l'IP, pendant 20 minutes toujours à 37 °C. A l'issue de cette incubation, les spermatozoïdes sont à nouveau lavés.

Après le dernier lavage, les spermatozoïdes ont été fixés avec 1 ml du PAF 1 %. Puis, ils ont été analysés au cytomètre.

Nous avons travaillé en deux conditions :

· Réaction acrosomique spontanée = RAS

· Réaction acrosomique induite après deux heures d'incubation avec l'ionophore A-23187 = RAI.

- Pour comparer les résultats de vitalité avec l'IP, on a analysé les spermatozoïdes après coloration par l'éosine-nigrosine :

Une goutte de l'échantillon a été déposée sur une lame et une goutte d'éosine (éosine jaune à 5 % dans l'eau) a été ajoutée. Après avoir mélangé les deux gouttes avec une baguette de verre pendant 20 secondes, une goutte de nigrosine (nigrosine RAL à 10 % dans l'eau) a été ajoutée.

On a mélangé et on a fait les étalements. Après séchage à l'air, la partie centrale de l'étalement a été examinée au microscope optique.

Interprétation :

Les spermatozoïdes dont la tête est blanche sont vivants.

Les spermatozoïdes dont la tête est rouge sont morts.

<b>ORIGINE VÉGÉTAL</b>	<b>ACRONYME</b>	<b>SPÉCIFICITÉ</b>
<b><i>Triticum vulgare</i></b>	<b>WGA</b>	<b>NAcGlc, Ac. Sial.</b>
<b><i>Concanavalia ensiformis</i></b>	<b>Con-A</b>	<b>D-Man.</b>
<b><i>Arachis hypogea</i></b>	<b>PNA</b>	<b><math>\beta</math>-D-Gal.</b>
<b><i>Ulex europaeus</i></b>	<b>UEA-I</b>	<b>L-Fuc.</b>

**Tableau 2.** Lectines utilisées dans ce travail.

## **4) RÉSULTATS**

## **A) Étude ultrastructurale**

Les essais en microscopie électronique à transmission ont été effectués avec 5 aliquotes des 30 échantillons de spermes lavés avec percoll, non incubés ou incubés avec l'ionophore A-23187 pendant 30 min, 1, 2 et 3 h.

Nous avons étudié la réaction acrosomique spontanée (condition RAS) et la réaction acrosomique induite (condition RAI). Avant l'induction de la réaction acrosomique avec l'ionophore, nous avons trouvé un bon marquage avec la lectine WGA sur toute la membrane plasmique du spermatozoïde. La figure 7 montre un bon marquage de la membrane plasmique de la tête d'un spermatozoïde avec cette lectine conjuguée à la ferritine à une concentration de 50 mg/ml, de même la figure 9 montre la coupe d'un flagelle avec un bon marquage.

Avec les lectines Con-A, PNA et UEA-I nous n'avons observé aucun marquage. Nous avons fait plusieurs essais en utilisant différentes concentrations des lectines conjuguées à la ferritine (tableau 3) mais les résultats n'ont pas changé. Nous avons testé aussi plusieurs dilutions des lectines conjuguées à l'or colloïdal et en utilisant la concentration maximale recommandée pour l'or colloïdal (dilution 1/10ème), nous avons observé un faible marquage avec la lectine PNA, cependant, on ne peut pas dire que ce marquage soit significatif, et avec Con-A et UEA-I (figure 8 et 10) aucun marquage n'est apparu (tableau 4).

**MARQUAGE A LA FERRITINE**  
**(condition RAS)**

**CONCENTRATION**

( $\mu\text{g/ml}$ )

<b>LECTINE</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>LOCALISATION</b>
<b>WGA</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>Membrane plasmique</b>
<b>Con-A</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>PNA</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>UEA-I</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

**Tableau 3.** Nous avons trouvé un bon marquage sur toute la membrane plasmique des spermatozoïdes avec la lectine WGA seulement.

**MARQUAGE A L'OR COLLOÏDAL**  
**(condition RAS)**

<b>DILUTION</b>					
<b>LECTINE</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>	<b>1/30</b>	<b>1/50</b>	<b>LOCALISATION</b>
<b>WGA</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>Membrane plasmique</b>
<b>Con-A</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>PNA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>Région acrosomique</b>
<b>UEA-I</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

**Tableau 4.** Avec les lectines marquées à l'or colloïdal nous avons trouvé aussi un bon marquage avec WGA et aucun marquage n'est apparu avec les autres lectines.

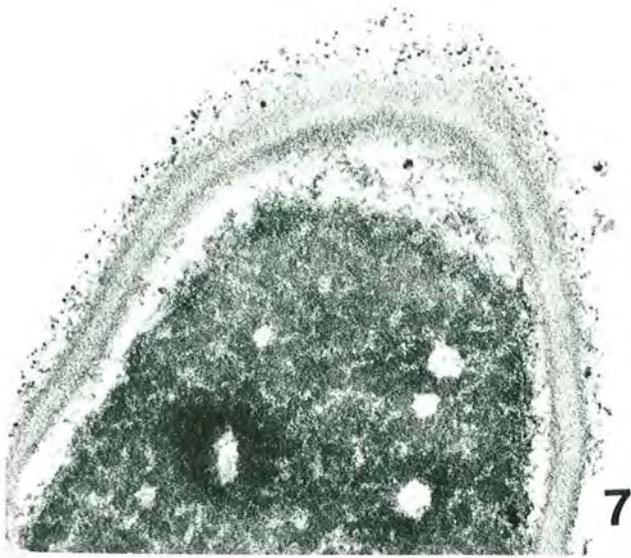
**PLANCHE**

**Figure 7.** Tête de spermatozoïde marquée avec la lectine WGA conjuguée à la ferritine. Il y a un bon marquage de la membrane plasmique.

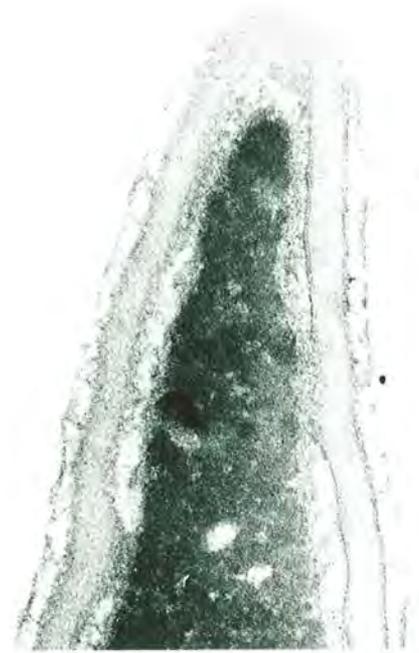
**Figure 8.** Tête de spermatozoïde où il n'y a pas de marquage après incubation avec Con A (condition RAS).

**Figure 9.** Membrane plasmique du flagelle de spermatozoïde marquée avec WGA conjuguée à la ferritine. On trouve un bon marquage.

**Figure 10.** Coupe de flagelle où aucun marquage n'est apparu après incubation avec UEA-I (condition RAS).



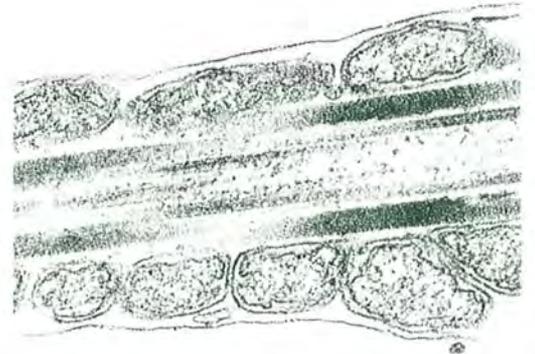
7



8



9



10

Après l'induction de la réaction acrosomique avec l'ionophore, la lectine WGA révèle un bon marquage dès 30 min d'incubation sur toute la membrane plasmique (le flagelle inclus). Le marquage sur la tête des spermatozoïdes diminue à 1 h pour disparaître après 2 h d'incubation (tableau 5).

Par contre, avec la Con-A, un faible marquage apparaît à 30 min seulement; il augmente à partir de une heure d'incubation (figure 11) pour quasiment disparaître à 3 h. Le marquage se trouve sur l'acrosome des spermatozoïdes qui avaient déjà commencé leur réaction acrosomique, précisément sur la membrane interne de l'acrosome.

Un faible marquage est apparu à 30 min avec PNA et le pic d'apparition du marquage est à 1 h pour diminuer à partir de 2 h. Ce marquage se trouve sur la membrane externe de l'acrosome mais surtout sur les vésicules formées au cours de la réaction acrosomique (figure 12 et 13).

Le décours temporel de la lectine UEA-I commence à 30 minutes d'incubation pour devenir un excellent marquage à 1 et 2 h mais qui diminue à partir de 3 heures. Le marquage se trouve sur les vésicules mais surtout sur la membrane interne de l'acrosome (figure 14, 15 et 16).

D'autre part, nous avons préparé les échantillons témoins en neutralisant les lectines ; elles ont été incubées avec leurs sucres

spécifiques avant d'être ajoutées aux spermatozoïdes (NAc-Glc pour WGA, 3-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-mannopyranose pour Con-A, 6-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-galactose pour PNA et L-fucose pour UEA-I). Nous n'avons trouvé aucun marquage pour les quatre lectines, ce qui permet de dire que le marquage que nous avons trouvé avec les lectines non neutralisées est vraiment spécifique.

**MARQUAGE A L'OR COLLOÏDAL**  
**(condition RAI)**

**Incubation A-23187**

(h)

LECTINE	0,5	1	2	3	LOCALISATION
WGA	++	+	-	-	Tête
	++	++	++	++	Flagelle
Con-A	+	++	++	+	Acrosome (membr. int.)
PNA	-	++	+	-	Acrosome (vésicules)
UEA-I	+	++	++	+	Acrosome (membr. int.)

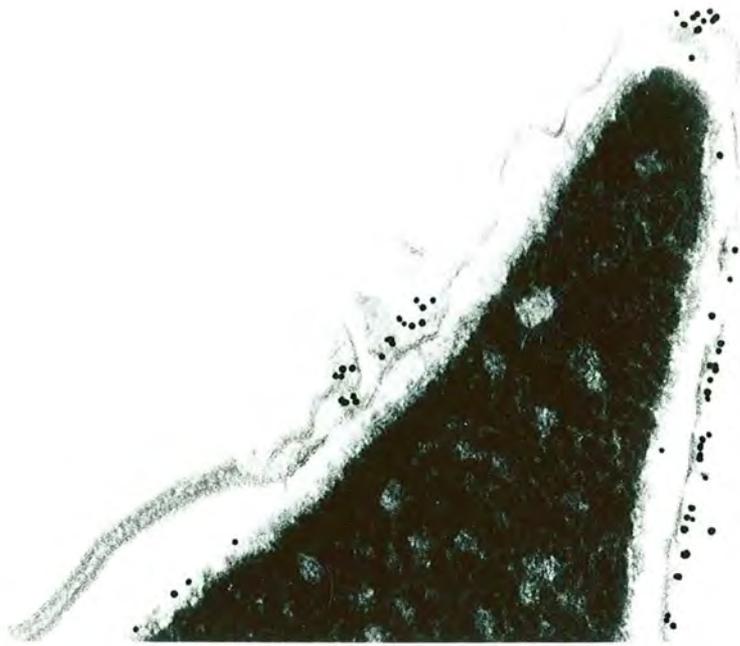
**Tableau 5.** Après l'induction de la réaction acrosomique le marquage avec WGA diminue. Avec les autres lectines il y a un bon marquage : sur la membrane des vésicules formées au cours de la réaction acrosomique avec PNA et sur la membrane interne de l'acrosome avec Con-A et UEA-I.

# PLANCHE

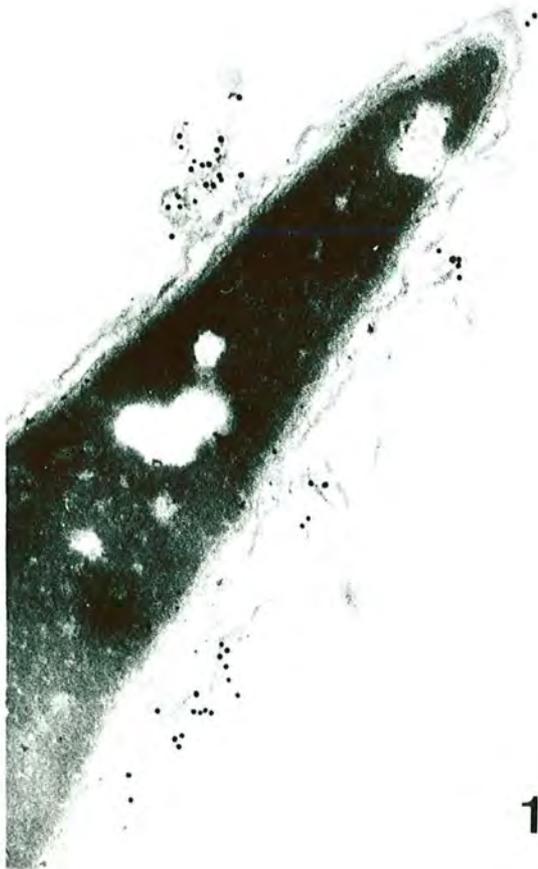
**Figure 11.** Un bon marquage est observé sur la membrane interne de l'acrosome avec Con-A conjuguée à l'or colloïdal, après une heure d'incubation avec l'ionophore A-23187

**Figure 12.** Avec la lectine PNA on trouve un bon marquage sur la membrane externe de l'acrosome et les vésicules formées au cours de la réaction acrosomique.

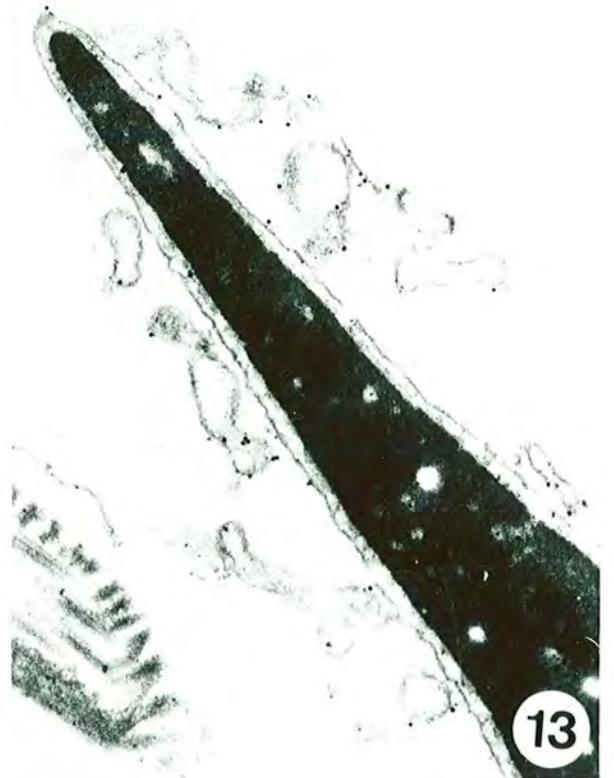
**Figure 13.** Avec PNA, un bon marquage apparaît à une heure d'incubation avec l'ionophore, et on le trouve surtout sur les vésicules issues de la réaction acrosomique.



11



12



13

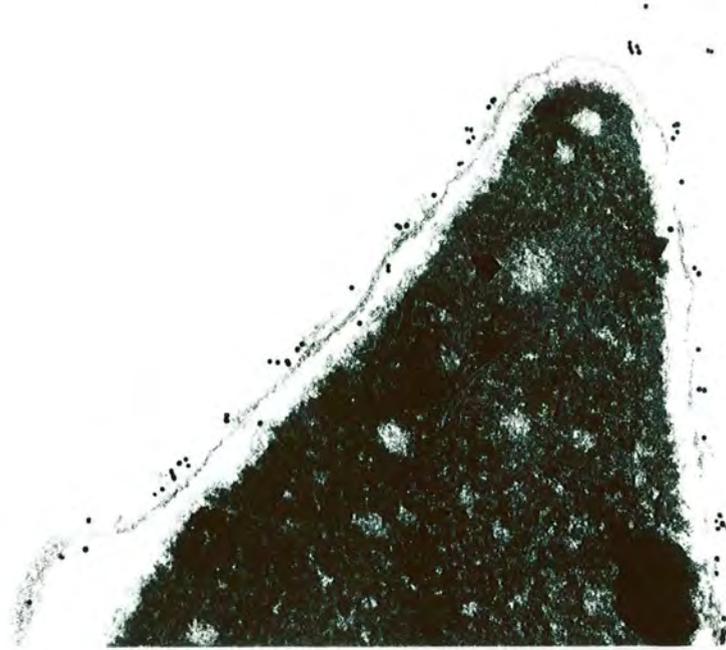
# **PLANCHE**

Marquage des spermatozoïdes avec la lectine UEA-I conjuguée à l'or colloïdal après avoir affectué la réaction acrosomique.

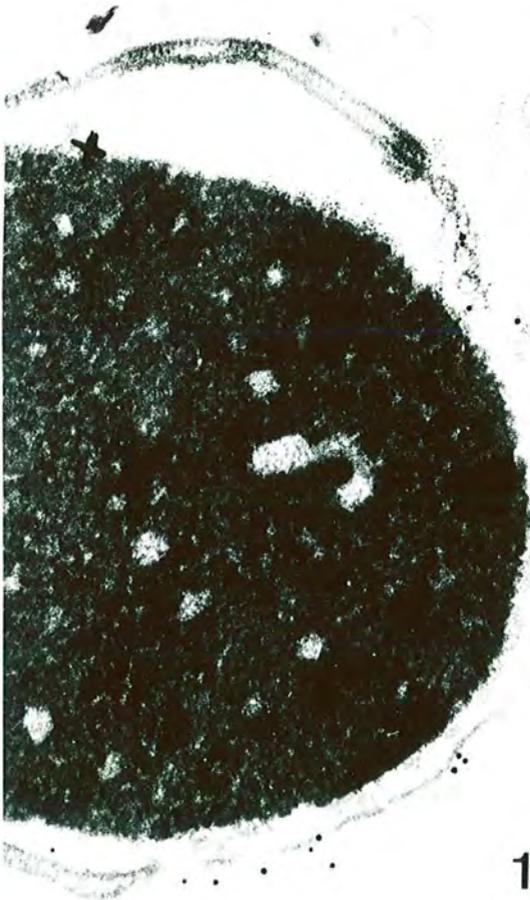
**Figure 14.** Tête de spermatozoïde qui montre un bon marquage sur la membrane interne de l'acrosome.

**Figure 15.** Coupe qui montre un bon marquage de la membrane interne de la région antérieure de l'acrosome.

**Figure 16.** Région postérieure de l'acrosome où on trouve un bon marquage spécifiquement sur la membrane interne acrosomique.



14



15



16

## **B) Étude quantitative**

Les essais en cytométrie de flux en simple marquage ont été réalisés sur 30 échantillons de sperme lavés avec percoll. Nous avons travaillé sur l'histogramme bi-logarithmique qui représente la répartition des spermatozoïdes en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse. Ces données nous ont permis de déterminer l'index de fluorescence (IF) correspondant au produit des deux données précédentes.

Le pourcentage de spermatozoïdes marqués avec l'anticorps GB24 avant l'incubation avec l'ionophore est trop faible ; il augmente progressivement avec le temps pour atteindre un pic à 2 h ; la différence entre le sperme en condition RAS et le sperme incubé avec l'ionophore (RAI) est significative ( $p < 0,05$ ) de même que la différence entre les résultats à 30 min et les autres temps d'incubation ( $p < 0,01$ ). Le marquage diminue à partir de 3 h (graphique 1).

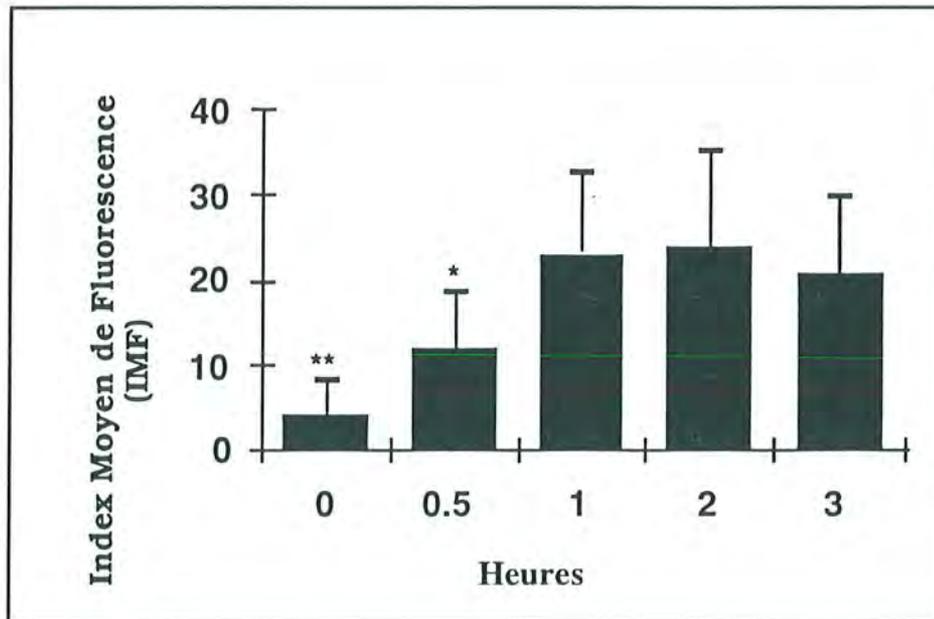
L'étude avec des lectines en simple marquage a été réalisée avec des échantillons non incubés et incubés pendant 30 min, 1 et 2 h avec l'ionophore A-23187 (graphique 2).

Un bon marquage a été trouvé avec WGA avant l'incubation avec l'ionophore ; ce marquage a diminué après 30 min d'incubation pour

rester stable ; les différences entre les temps d'incubation n'ont pas été significatives.

Le marquage avec Con-A augmente à 30 min et 1 h pour diminuer à 2 h ; les différences sont significatives entre 0 et 30 min- ( $p < 0,04$ ) et aussi entre 1 et 2 h ( $p < 0,04$ ). Avec PNA un faible marquage initial a été observé mais il a augmenté avec le temps d'incubation ; les différences ont été significatives seulement entre 0 et 1 h ( $p < 0,01$ ).

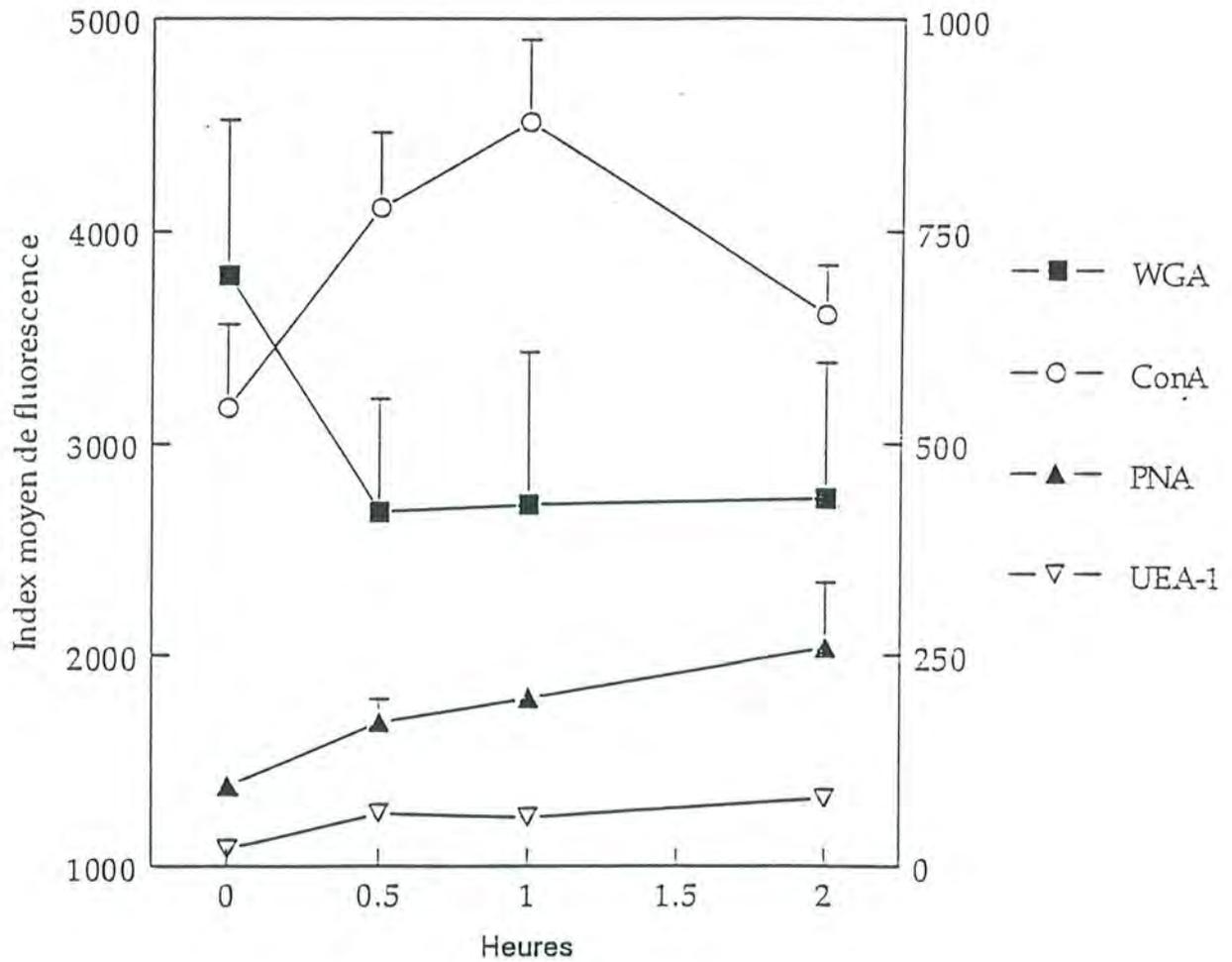
Il y a un faible marquage à 30 min d'incubation avec UEA-I, marquage qui augmente progressivement avec le temps ; les différences entre 0 et les autres temps d'incubation ont été significatives ( $p < 0,00001$ ), de même que les différences entre 1 et 2 h ( $p < 0,01$ ) et entre 30 min et 2 h ( $p < 0,009$ ).



**Graphique 1.** Le marquage avec l'anticorps GB24 a été faible avant l'incubation avec l'ionophore mais il augmente au cours de la réaction acrosomique et le pic d'apparition est à 2 h.

\*\* La différence entre le sperme sans l'ionophore et le sperme incubé avec l'ionophore est significative ( $p = 0,007$  à 0,5 h, et  $p < 0,005$  pour le reste).

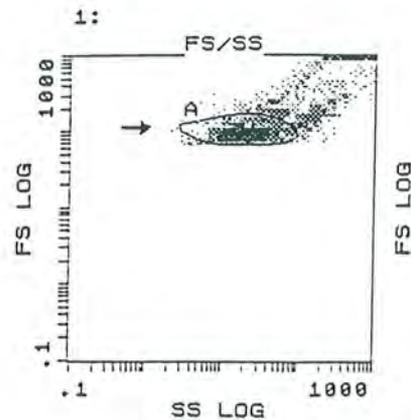
\* La différence entre 0,5 et 1 h est aussi significative ( $p < 0,01$ ).



**Graphique 2.** Un bon marquage a été trouvé avec WGA avant l'incubation avec l'ionophore. Au cours de la réaction acrosomique il y a un bon marquage avec Con-A, PNA et UEA-I surtout entre 1 et 2 h. L'échelle des valeurs de l'index moyen de fluorescence pour WGA est à gauche et pour les autres lectines, elle est à droite.

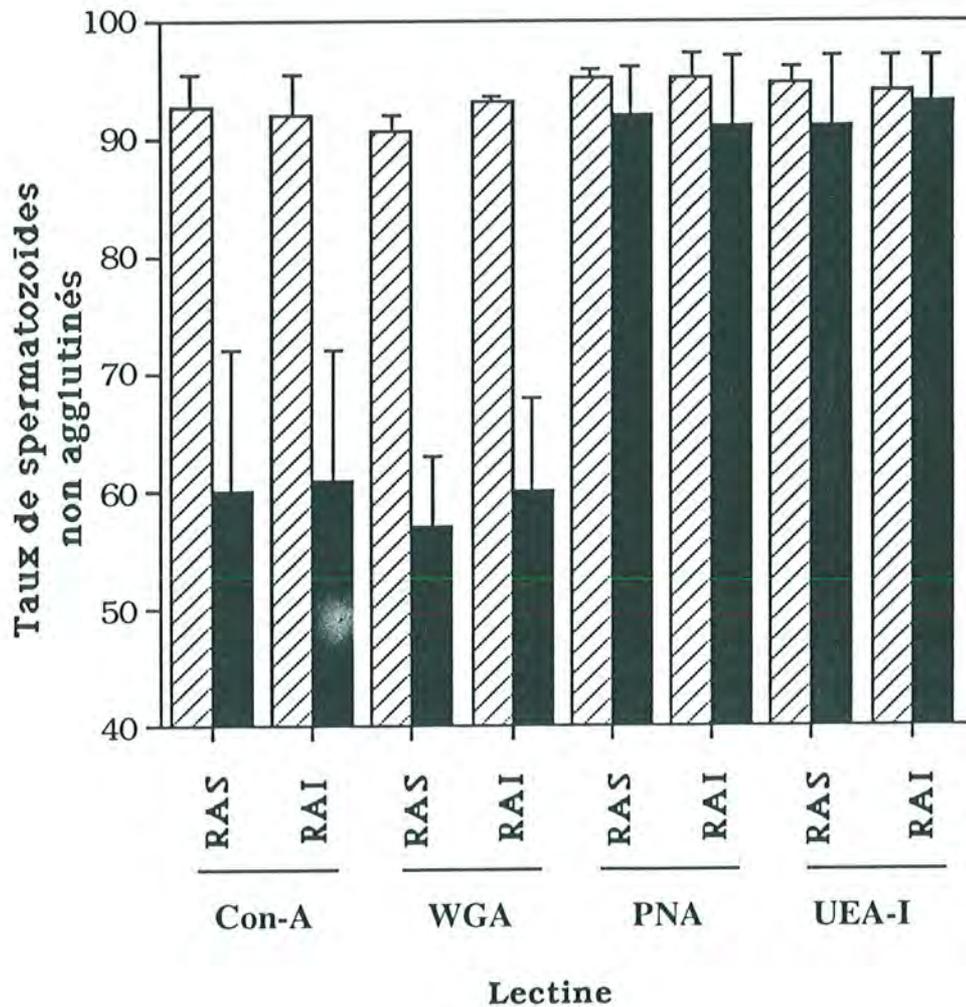
Le triple marquage effectué à l'aide de lectines, GB24 et l'iodure de propidium, a donné des résultats intéressants. Nous avons travaillé avec 20 échantillons normospermiques pour suivre le marquage avec les mêmes lectines avant et après l'induction de la réaction acrosomique avec l'ionophore A-23187.

Afin de distinguer la population de spermatozoïdes des débris cellulaires et des spermatozoïdes agglutinés il a été nécessaire de définir la fenêtre en caractérisant les spermatozoïdes : des critères de taille et de densité cellulaire ont été utilisés



Fenêtre de détection des spermatozoïdes  
au cytomètre en fonction de la taille  
et de la densité cellulaire

Avec les lectines Con-A et WGA il y a moins de spermatozoïdes non agglutinés qu'avec PNA et UEA-I (graphique 3). Il y a une différence significative entre les valeurs de Con A et WGA et les échantillons témoins où la lectine est neutralisée par le sucre correspondant ( $p < 0,005$ ), par contre il n'y a pas de différence entre les valeurs des lectines PNA et UEA-I et ceux des groupes témoins ; aucune différence n'a été trouvée entre les valeurs en RAS et en RAI.



**Graphique 3. Étude de l'agglutination :** Avec les lectines Con-A et WGA on a beaucoup moins de spermatozoïdes non agglutinés qu'avec PNA et UEA-I. Les groupes témoins (lectine neutralisée) montrent un grand pourcentage de cellules non agglutinés. Dans tous les cas il n'y a pas de différence entre RAS et RAI. Le 100 % correspond à 5 000 cellules.

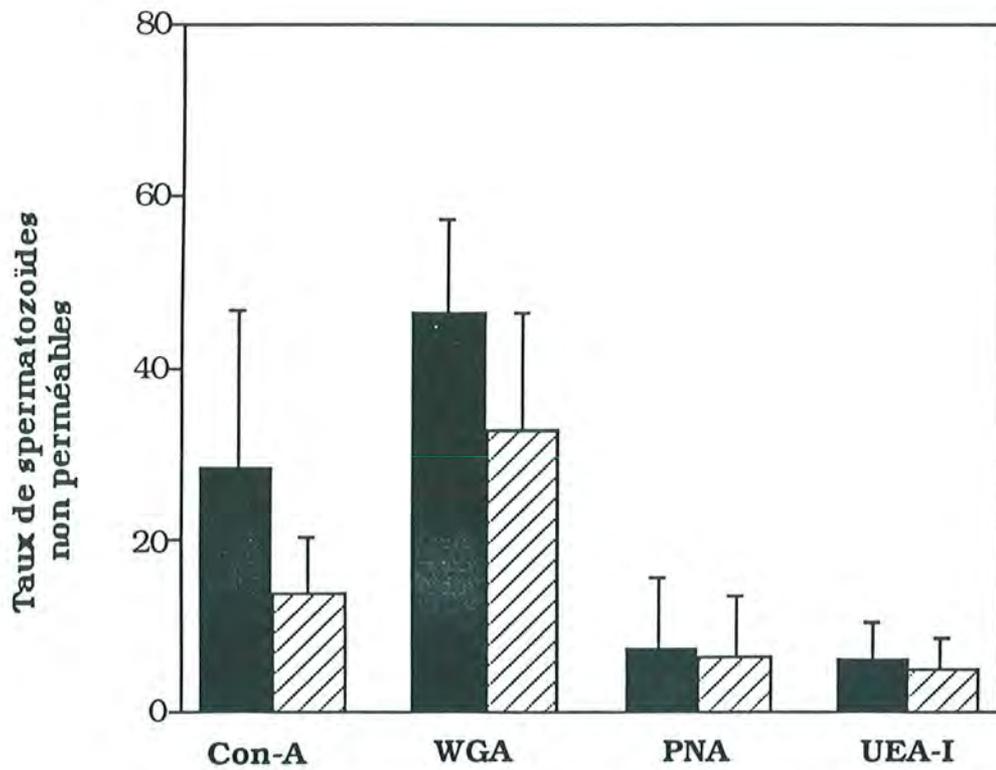
▨ Témoins  
■ Lectine

La vitalité (spermatozoïdes non perméables), a été mesurée avec l'iodure de propidium, Il y a une diminution de spermatozoïdes non perméables en RAI et la différence est significative ( $p < 0,005$  pour Con-A et WGA et  $p < 0,05$  pour PNA et UEA-I). Il est important de signaler une variation inter-individuelle selon la lectine testée (graphique 4). Nous avons fait en parallèle une coloration avec l'éosine et la nigrosine (Test de Williams) et nous avons trouvé beaucoup plus de spermatozoïdes "vivants" par ce test de vitalité qu'avec l'iodure de propidium : 60 % en RAS et 45 % en RAI.

Les valeurs du marquage par GB24 et par les lectines ont été mesurées en unités d'index de fluorescence. Les groupes traités avec WGA montrent une augmentation du marquage avec GB24 en RAI et une diminution du marquage par la lectine (graphique 5). Les groupes témoins (lectine neutralisée) montrent la même tendance mais le marquage diminue de façon significative par rapport aux marquages avec les lectines avec une valeur de  $p < 0,005$  (graphique 6).

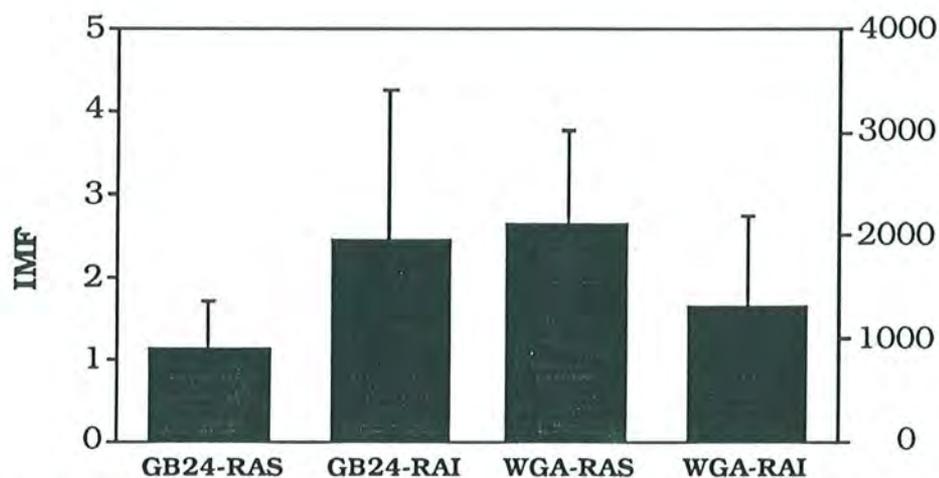
En ce qui concerne la lectine UEA-I, les valeurs de GB24 sont plus élevées que pour les autres traitements et il y a une différence entre RAS et RAI ; les valeurs de la lectine diminuent en RAI (graphique 7 ). Les différences sont significatives ( $p < 0,005$ ).

Les groupes témoins (graphique 8) montrent une augmentation de GB24 en RAI et les valeurs de la lectine diminuent beaucoup en RAS et en RAI par rapport aux valeurs où la lectine n'a pas été neutralisée.

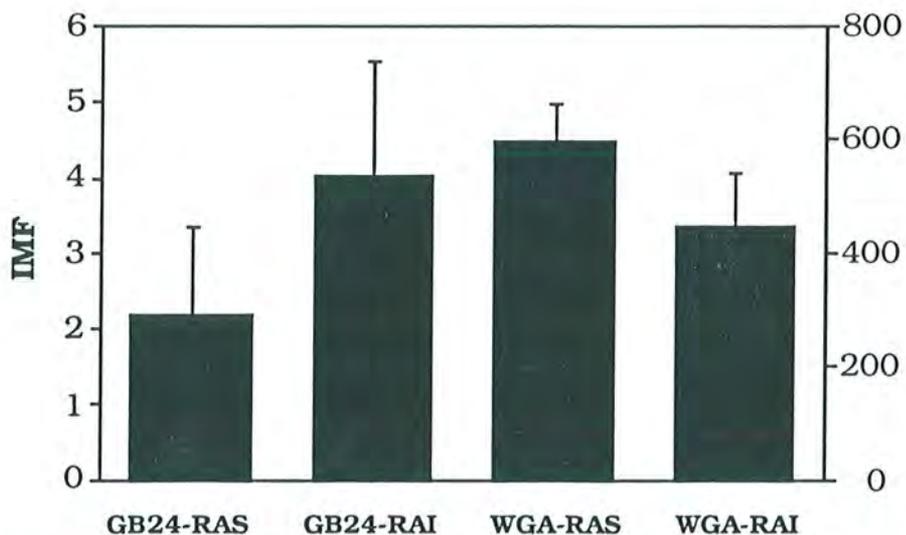


**Graphique 4. Étude de la vitalité estimée à l'iodure de propidium en présence de GB24 et en fonction des lectines utilisées :** Le taux de spermatozoïdes non perméables a une valeur plus haute en RAS par rapport à RAI. Il y a une variation inter-individuelle très considérable selon le traitement.

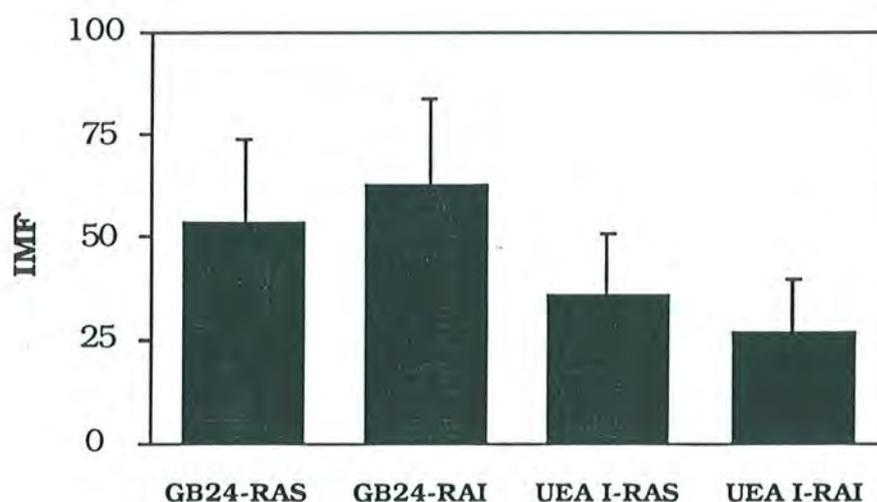
- RAS
- ▨ RAI



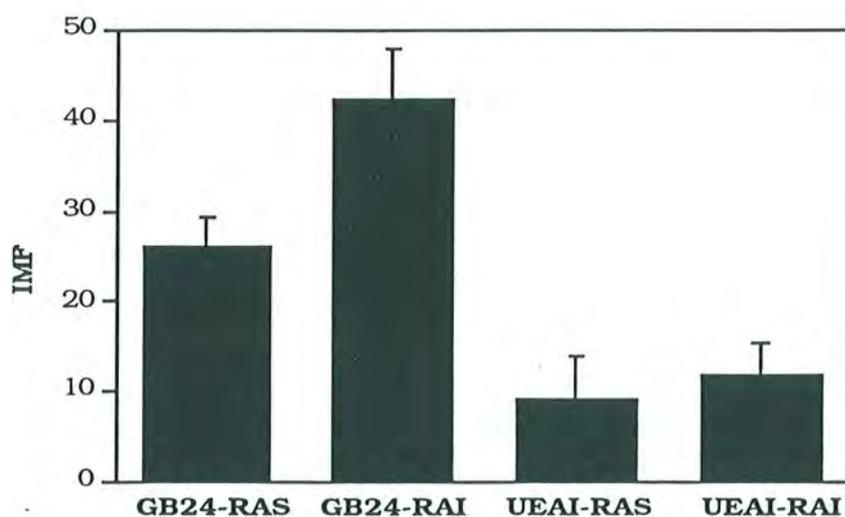
**Graphique 5.** Les valeurs de GB24 augmentent en RAI (coté gauche de l'échelle) et ceux de la lectine WGA diminuent (coté droit).



**Graphique 6.** Valeurs des témoins (avec neutralisation de la lectine). Les valeurs diminuent très considérablement (coté droit de l'échelle par rapport aux valeurs de la lectine non neutralisée, par contre, les valeurs de GB24 ne varient pas (coté gauche) par rapport aux valeurs où la lectine n'a pas été neutralisée.



**Graphique 7.** Il y a une augmentation du marquage de GB24 en RAI et le marquage par la lectine diminue. Les différences sont significatives ( $p < 0,005$ ).

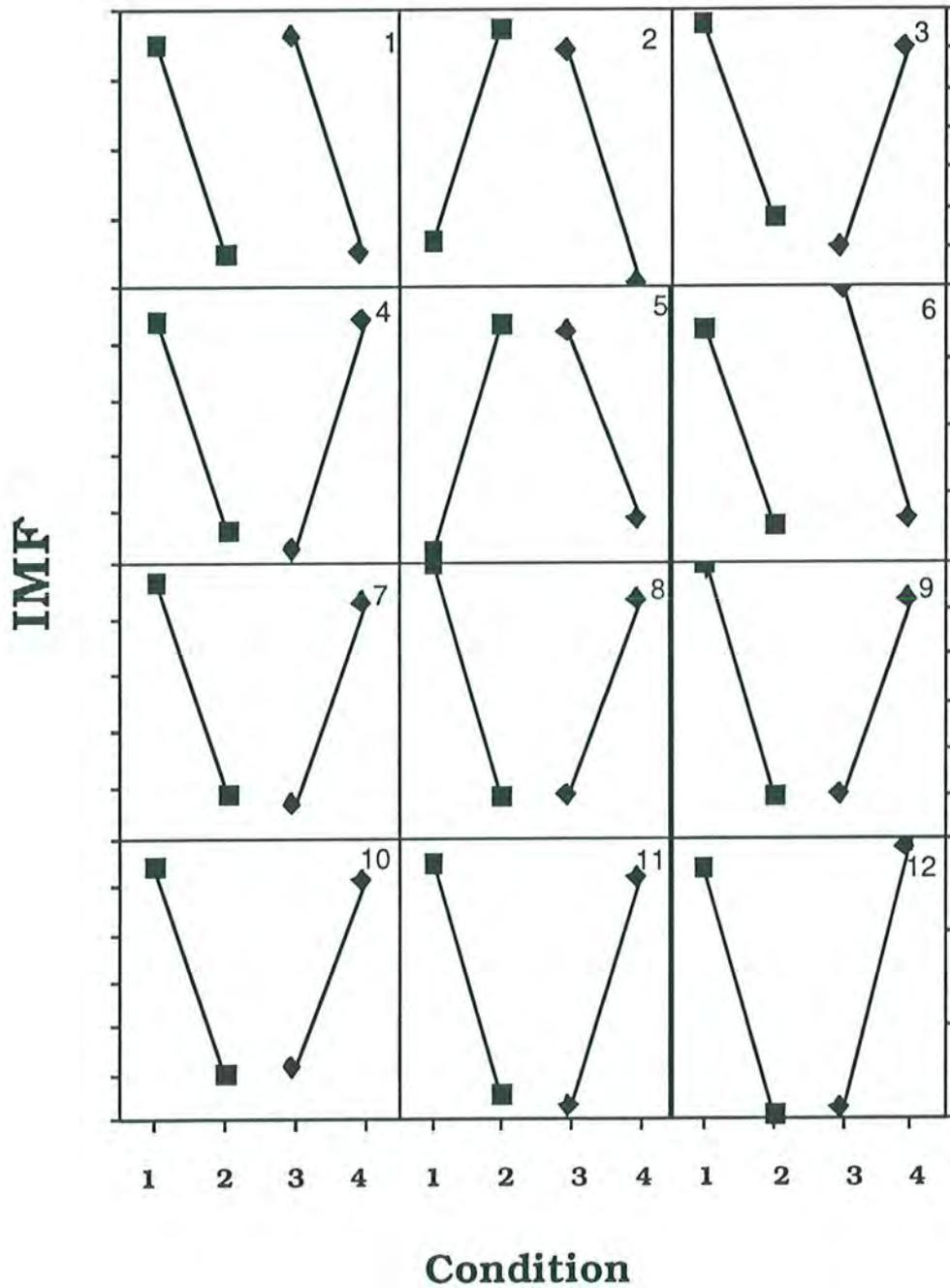


**Graphique 8.** Parmi les groupes témoins (lectine neutralisée) il y a une augmentation de GB24 en RAI et la différence est significative ( $p < 0,05$ ). Les valeurs de la lectine ne montrent pas de variation en RAI par rapport à RAS.

Avec Con-A et PNA, pour l'ensemble des échantillons il n'y a pas de différence significative de l'expression de GB24 et de la lectine en RAS et en RAI. Cependant, quand on analyse individuellement l'évolution de GB24 et celle de la lectine pour chaque patient (graphiques 9, 9 bis, 13 et 13 bis), on constate deux groupes dans lesquels l'évolution de l'IMF de GB24 et de la lectine sont inverses.

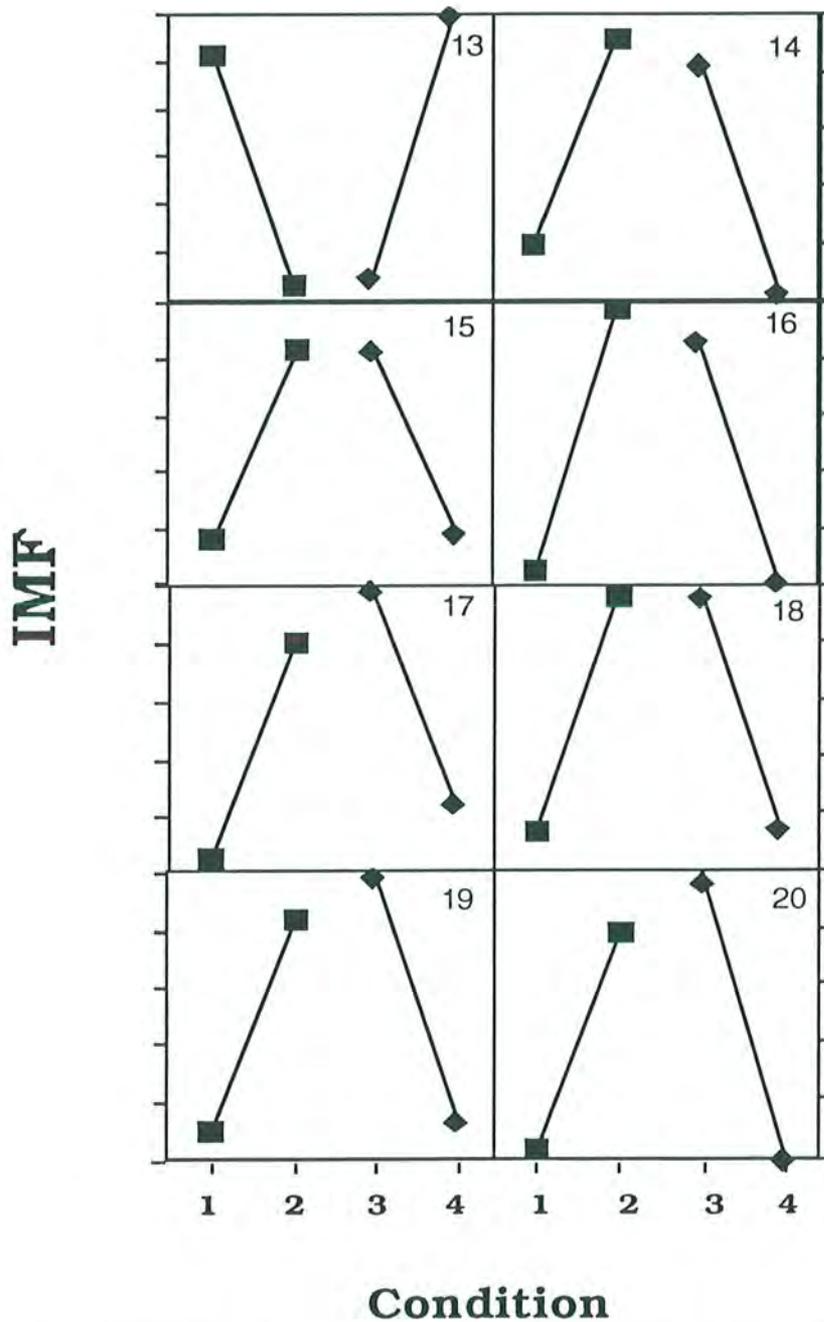
Pour toutes les données (sauf pour le patient 1 et 6) deux groupes de valeurs sont apparus ; l'un pour lequel les valeurs de GB24 en RAI augmentent alors que le marquage par la lectine diminue (graphique 10), et un autre pour lequel il y a un effet contraire (graphique 11). Les groupes témoins montrent une élévation de GB24 en RAI mais par contre, le marquage avec la lectine se montre très bas en RAS et en RAI (graphique 12). ce qui est logique puisqu'il s'agit de la lectine neutralisée.

Le traitement avec PNA montre aussi deux groupes de valeurs (sauf le patient 11) comme dans le cas de Con-A mais avec PNA les valeurs de GB24 sont plus élevées et les valeurs de la lectine sont plus basses (graphiques 14 et 15). Parmi les groupes témoins on trouve aussi une augmentation de GB24 en RAI et le marquage est encore plus bas avec la lectine en RAS et en RAI (graphique 16).



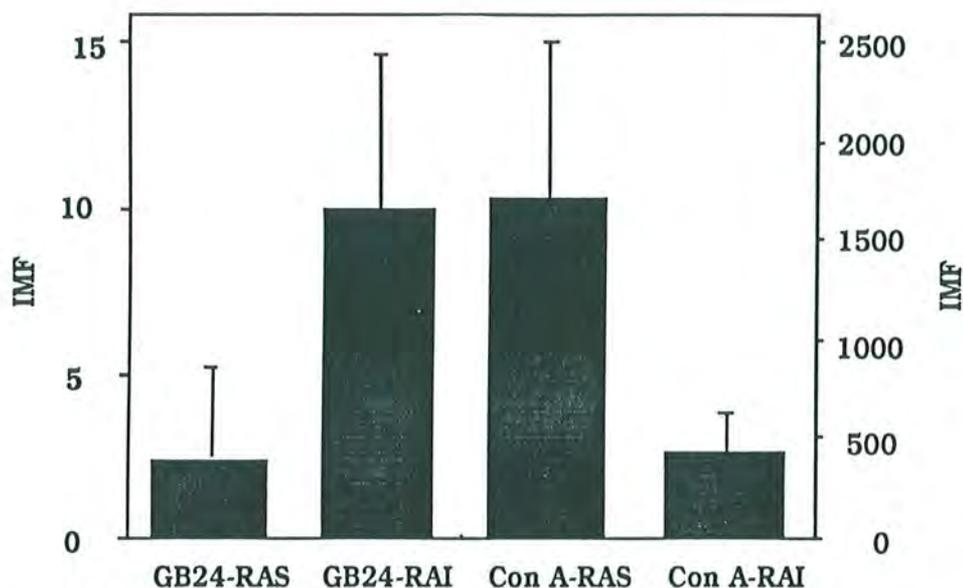
**Graphique 9. Évolution de l'IMF chez les différents patients en RAS et RAI. Condition :**

- 1 = GB24 en RAS
- 2 = GB24 en RAI
- 3 = Con-A en RAS
- 4 = Con-A en RAI

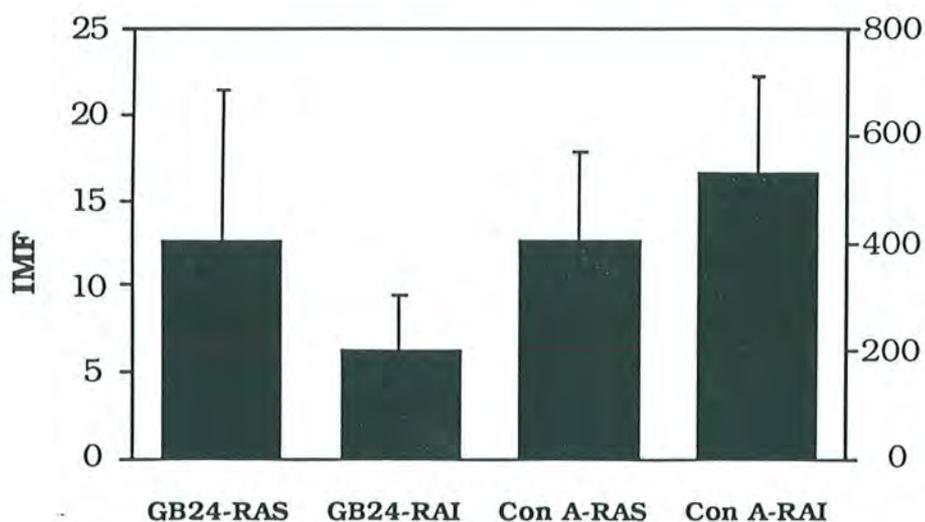


**Graphique 9 bis. Évolution de l'IMF chez les différents patients en RAS et RAI. Condition :**

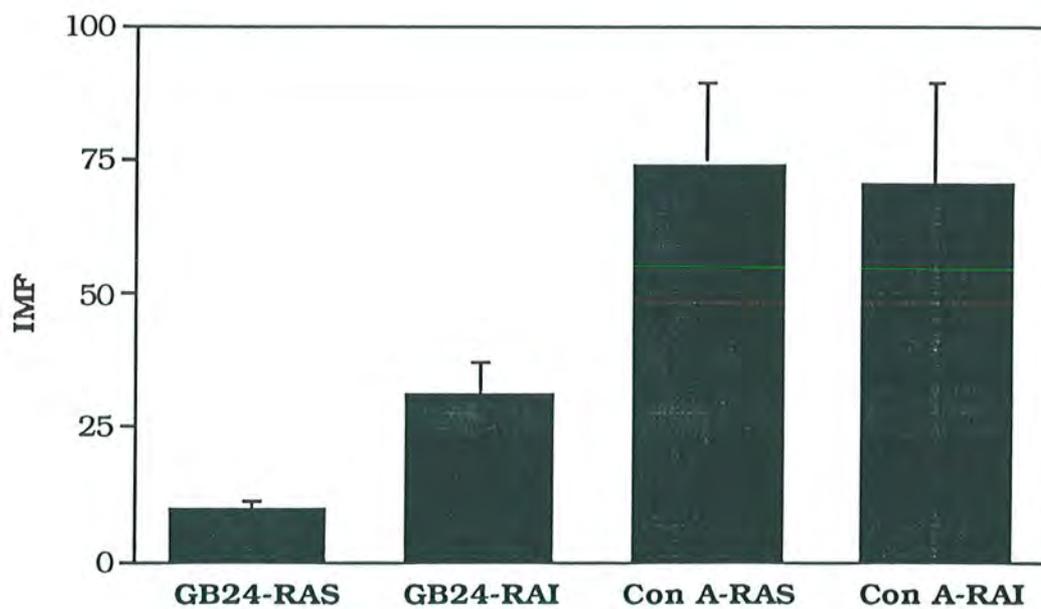
- 1 = GB24 en RAS
- 2 = GB24 en RAI
- 3 = Con-A en RAS
- 4 = Con-A en RAI



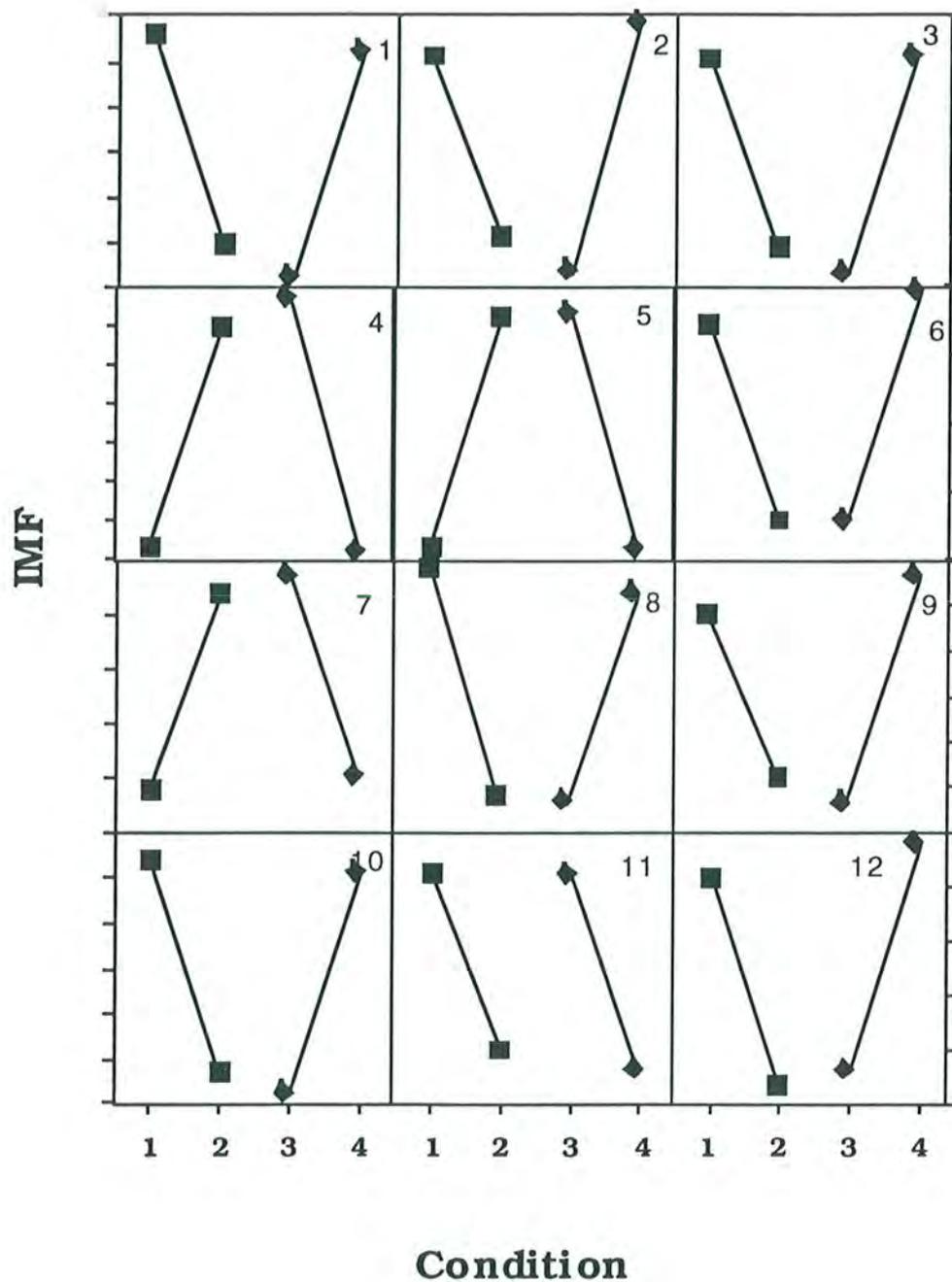
**Graphique 10.** Les valeurs de l'index moyen de fluorescence (IMF) augmentent de façon significative ( $p < 0,005$ ) après l'induction de la réaction acrosomique (échelle gauche). Par contre, les valeurs de la lectine Con-A diminuent aussi de façon significative ( $p < 0,005$ ) (échelle droite).



**Graphique 11.** Cette population de spermatozoïdes traités avec la lectine Con-A montre une diminution de GB24 en RAI (coté gauche de l'échelle) et une augmentation de la lectine (coté droit) au même temps. Ces différences sont statistiquement significatives ( $p < 0,05$  et  $p < 0,005$  respectivement).

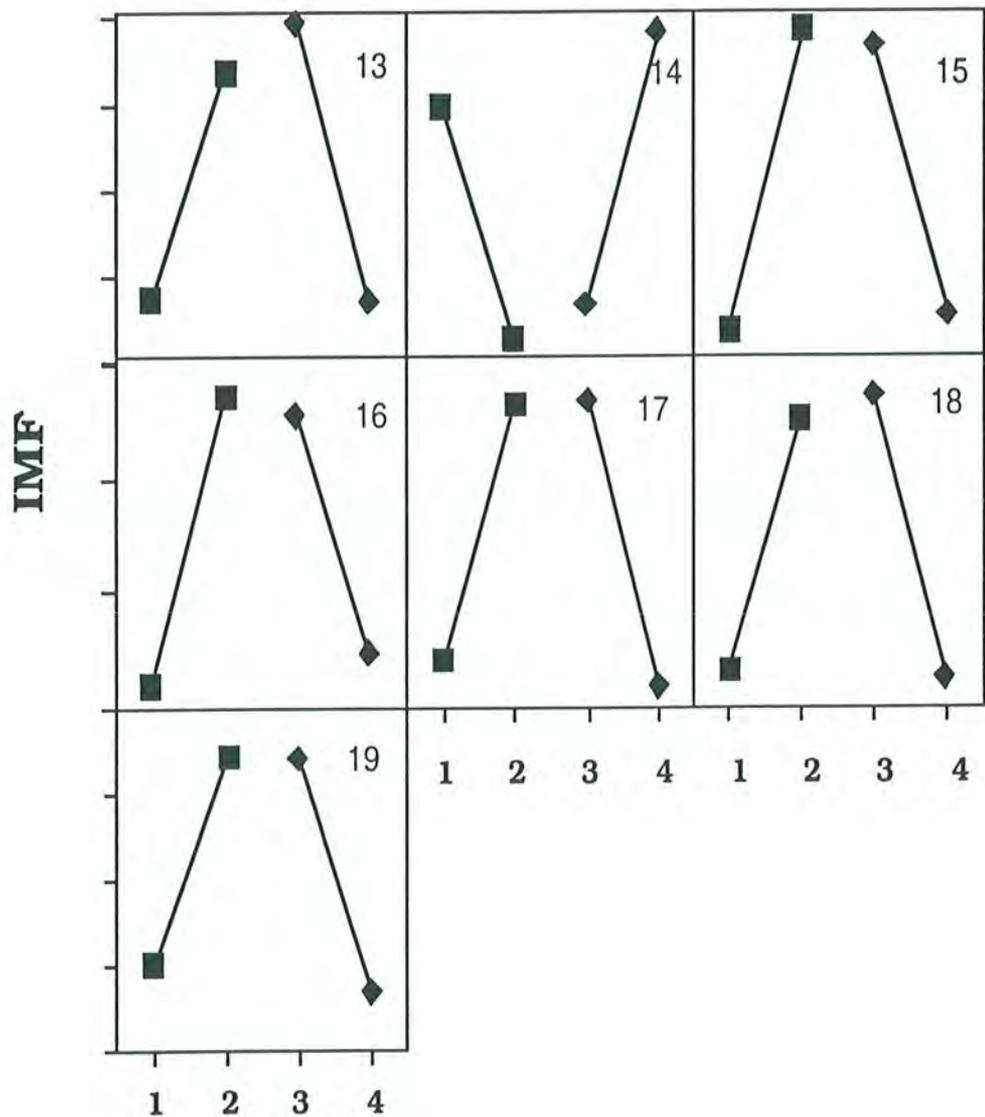


**Graphique 12.** Valeurs de l'Index Moyen de Fluorescence (IMF) après avoir neutralisé la lectine (témoins). Il y a une diminution considérable du marquage par la lectine et le marquage avec GB24 augmente.



**Graphique 13. Évolution de l'IMF chez les différents patients en RAS et RAI. Condition :**

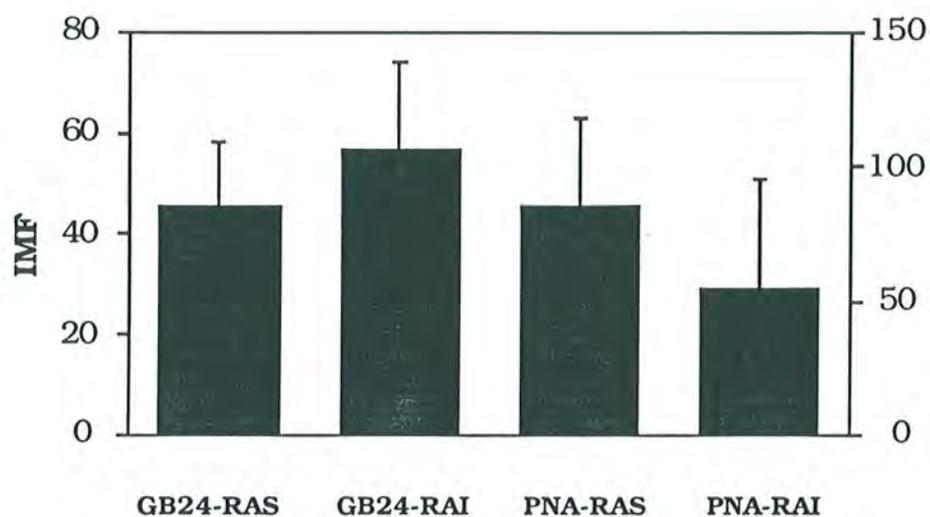
- 1 = GB24 en RAS
- 2 = GB24 en RAI
- 3 = PNA en RAS
- 4 = PNA en RAI



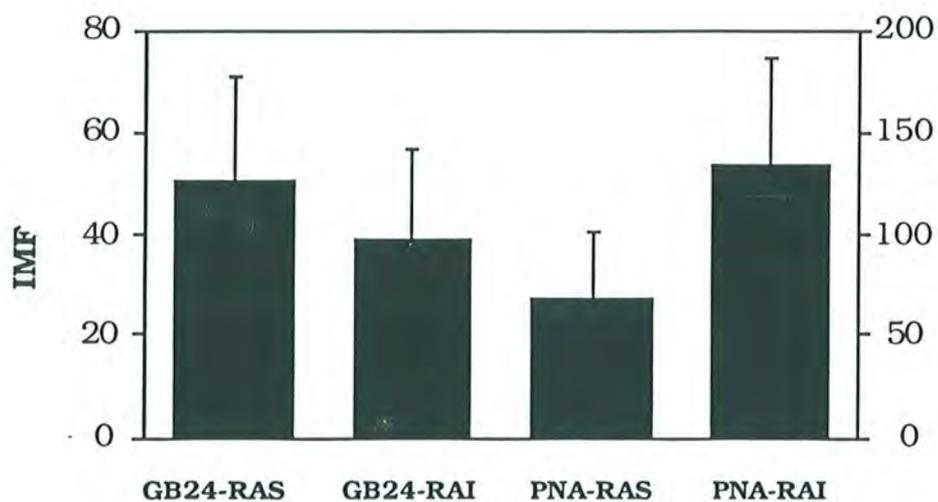
### Condition

**Graphique 13bis. Évolution de l'IMF chez les différents patients en RAS et RAI. Condition :**

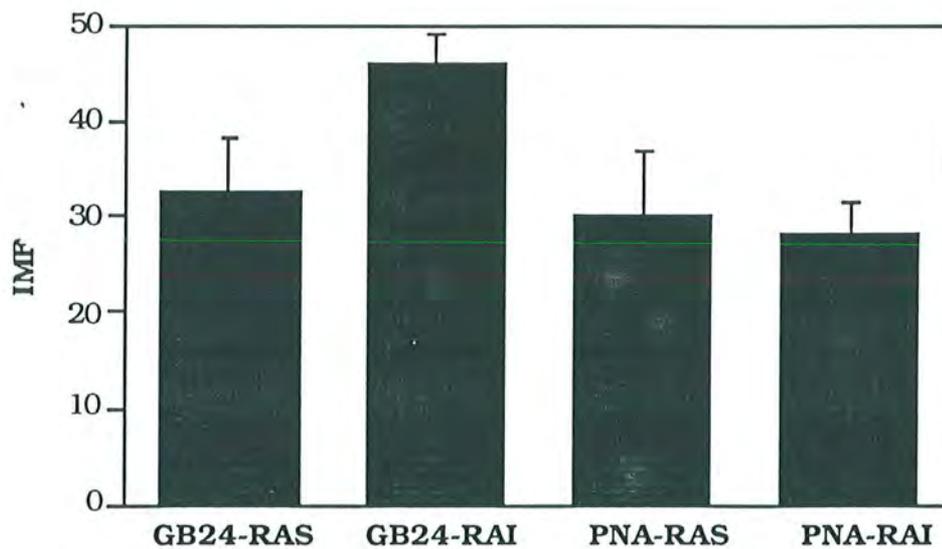
- 1 = GB24 en RAS
- 2 = GB24 en RAI
- 3 = PNA en RAS
- 4 = PNA en RAI



**Graphique 14.** L'Index Moyen de Fluorescence (IMF) de GB24 augmente en RAI (coté gauche de l'échelle) et pour la PNA diminue par rapport à RAS (coté droit). Les différences entre RAS et RAI sont statistiquement significatives ( $p < 0,005$ ).



**Graphique 15.** Dans ce cas, les valeurs de GB24 diminuent en RAI (coté gauche de l'échelle) et les valeurs de PNA augmentent (coté droit). Les différences entre RAS et RAI son significatives ( $p < 0,05$ ).



**Graphique 16.** Les groupes témoins montrent une augmentation de GB24 en RAI et la différence est significative ( $p < 0,05$ ). Avec la lectine neutralisée, les valeurs sont basses en RAS et RAI par rapport aux valeurs où la lectine n'a pas été neutralisée ( $p < 0,005$ ).

## **5) DISCUSSION**

L'analyse des échecs de la fécondation *in vitro* permet de se représenter les causes probables des échecs de la fécondation *in vivo*. Après la pénétration des spermatozoïdes dans le massif des cellules folliculeuses, tous les stades ultérieurs sont susceptibles d'être bloqués ou de se dérouler de façon anormale; les causes des perturbations peuvent être rapportées soit à l'ovocyte, soit aux spermatozoïdes.

La fécondation ne peut aboutir à son terme en cas de faillite de l'une des réactions qui précèdent la pénétration de l'ovocyte: capacitation et réaction acrosomique entre autres. La technique la plus utilisée actuellement pour améliorer le recueil du sperme et sa mobilité est la centrifugation dans un gradient de densité de Percoll. Le Percoll est composé de particules de silice enrobées de polyvinylpyrrolidone, un polymère à site hétérogène qui a été utilisé pour le sperme humain pour la première fois par Gorus et Pipeleers en 1981 (Gorus et Pipeleers, 1981). Les auteurs ont montré que les spermatozoïdes immobiles et les éléments séminaux restaient au niveau de couches de densité comprise entre 1,06 et 1,09 alors que les spermatozoïdes mobiles se trouvaient dans les couches de densité entre 1,10 et 1,14. Dans un deuxième temps en 1983, Forster *et al* (Forster, *et al.*, 1983) simplifièrent la méthode en proposant un gradient discontinu de Percoll en une étape, technique adoptée par tous les auteurs. On réalise ce gradient en versant successivement dans un tube des aliquotes de 1 à 1,5 ml de solutions de Percoll dilué dans du milieu de culture de concentrations

décroissantes (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, et 40 %) de façon à ce que les interfaces soient visibles entre les couches.

Les spermatozoïdes immobiles, le plasma séminal et les autres cellules du sperme restent dans les fractions 40 et 80 % tandis que les spermatozoïdes mobiles migrent jusqu'aux fractions 100 et 90 % que l'on récupère. Plusieurs auteurs (Ord, *et al.*, 1990 ; Tanphaichitr, *et al.*, 1988) ont simplifié au maximum cette technique en proposant un gradient de Percoll avec seulement 2 ou 3 couches. De nombreuses études ont montré que le Percoll améliore le recueil et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et aussi améliore la survie des spermatozoïdes en culture.

Pour apprécier la fécondance d'un sperme humain, le spermogramme doit être complété par des tests fonctionnels basés sur la mobilité des spermatozoïdes, leur capacitation, réaction acrosomique ou la fusion membranaire. La membrane du spermatozoïde est impliquée dans ces étapes, en particulier ses glycoprotéines dont on sait qu'elles jouent un rôle important dans le phénomène de reconnaissance entre membranes cellulaires. Les glucides totaux des membranes plasmiques constituent entre 2 et 10 % du poids total de la membrane. L'étude du rôle des glucides est aujourd'hui d'actualité, surtout en raison de leur implication dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire (Alberts, *et al.* , 1989 ; Gahmberg, *et al.* , 1992).

Des interactions entre les protéines et les glycoconjugués des membranes des gamètes ont été mises en évidence chez l'animal par des

techniques d'inhibition compétitive, en apportant des résidus glucidiques à la surface du spermatozoïde (Macek et Shur, 1988), ces résultats confortent l'hypothèse du rôle des sucres de la membranes du spermatozoïde dans l'expression de ses capacités fonctionnelles.

Le spermatozoïde, après capacitation, peut faire sa réaction acrosomique, condition préalable essentielle à la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte. Elle consiste en la libération des enzymes de l'acrosome. La réaction acrosomique induit des modifications de la capacité de fusionner de la membrane plasmique dépendantes du calcium.

L'induction de la réaction acrosomique *in vitro* est actuellement étudiée en présence de l'ionophore A-23187. Ce cation divalent apporte l'influx de calcium et l'alcalinisation cytoplasmique nécessaires à la réaction acrosomique.

Il y a différentes méthodes pour tester la réaction acrosomique ; les caractéristiques d'un test idéal sont : simplicité, rapidité, précision, fiabilité, et avoir la possibilité de conserver le marquage pour pouvoir différer la lecture (Cross et Meizel, 1989). Talbot et Chacon distinguent les spermatozoïdes vivants ayant fait leur réaction acrosomique, de ceux ayant fait une réaction acrosomique dégénérative (consécutive à la mort cellulaire), grâce à la mise au point d'une triple coloration : bleu de trypan, brun Bismarck et rose Bengale (Talbot et Chacon, 1981). Mandelbaum *et al*, ont analysé la réaction acrosomique des spermatozoïdes dans un milieu de culture avant et après 17 heures

d'incubation en présence ou non d'ovocyte. Cette équipe n'a pu mettre en évidence aucune corrélation entre la capacité des spermatozoïdes à faire leur réaction acrosomique et leur aptitude à féconder (Mandelbaum, *et al.*, 1987).

Des études avec des lectines marquées ont été publiées chez de nombreuses espèces animales comme le crapaud mais surtout chez les mammifères : hamster, cobaye, rat, lapin, taureau, verrat, cheval, etc. (Ahluwalia, *et al.*, 1990 ; Farlin, *et al.*, 1992 ; Martínez-Menárguez, *et al.*, 1992 ; Takamune, 1987 ; Topfer-Petersen, *et al.*, 1984). Dans la plupart des espèces examinées on observe une fixation préférentielle des lectines sur la région acrosomique (PNA, Con-A, SBA, MPA, WGA), ce qui évoque la présence de résidus glucosyl, mannosyl, galactosyl, D-galactoaminosyl et aminoglucosaminosyl (Ahluwalia, *et al.*, 1990 ; Topfer-Petersen, *et al.*, 1984).

Dans l'espèce humaine, des études ont également été poursuivies avec des lectines marquées le plus souvent à la fluorescéine pour observation au microscope à fluorescence ; les études en cytométrie de flux et les études ultrastructurales sont peu nombreuses. Pour chacune des lectines, l'intensité de fluorescence et sa localisation sur les spermatozoïdes varient selon les publications, ce qui peut facilement s'expliquer par les différences de technique et surtout la variabilité des spermes étudiés.

Les sites de réactivité préférentiels sont la tête du spermatozoïde, soit toute sa surface (WGA, PHA-E, RCA, LCA), soit préférentiellement

au niveau de la région acrosomique (Con-A, PNA) ou sur la bande équatoriale (SBA) (Cross et Overstreet, 1987 ; Mao-Chi et Damjanov, 1985 ; Singer, *et al.*, 1985).

Quelques équipes ont commencé à corréler les résultats des spermogrammes avec l'apparition ou la disparition de marquage avec des lectines. Par exemple, les spermatozoïdes qui ne fixent pas PNA ont souvent une anomalie de l'acrosome lors d'études en microscopie électronique (Ravid, *et al.*, 1990). Les techniques en microscopie électronique sont lourdes mais elles peuvent permettre de localiser précisément la fixation des lectines marquées au niveau de la membrane plasmique et des membranes acrosomiques externe et interne.

La fixation sur la région acrosomique de SBA, LCA et WGA est abaissée chez les sujets présentant un spermogramme anormal. Ce marquage pourrait donc apporter une information supplémentaire dans les infertilités inexplicables avec un sperme de qualité correcte (Engh, *et al.*, 1991). Une réduction de la fixation sur l'acrosome est également observée après la réaction acrosomique induite par l'ionophore A-23187 (Miyazaki, *et al.*, 1990). Il est possible que la réduction de fixation des lectines chez les sujets ayant un sperme de mauvaise qualité puisse être due à une réaction acrosomique prématurée.

La fixation de PSA, PNA et SBA est plus faible sur du sperme congelé en attente d'insémination que sur du sperme frais mais il est

impossible de dire si ces résultats ont une incidence sur la fécondance du sperme (Vasquez, *et al.*, 1990).

Notre étude a démontré que la fixation des lectines sur la membrane des spermatozoïdes humains dépend du temps d'incubation avec l'ionophore A-23187, donc de l'induction de la réaction acrosomique.

La lectine WGA reconnaît les résidus de N-Acetylglucosamine (NAc-Glc) et d'acide sialique. Un marquage sur toute la membrane plasmique a été décrit ; il semblerait que cette fixation a une relation avec la présence d'acide sialique car WGA se fixe sur les spermatozoïdes intacts. La succinyl-WGA reconnaît seulement NAc-Glc et se fixe seulement sur 10 % de spermatozoïdes intacts (Lassalle et Testart, 1994 ; Lee et Damjanov, 1985).

Nous avons trouvé en microscopie électronique un bon marquage sur toute la membrane plasmique (y comprend le flagelle) et un index de fluorescence important au cytofluoromètre. Au cours du temps d'incubation avec l'ionophore, le marquage diminue, ce qui peut indiquer qu'il y a des modifications de la membrane plasmique surtout dues à une perte de résidus d'acide sialique.

La lectine Con-A se fixe sur le glucide D-mannose et elle est souvent utilisée pour déterminer l'intégrité de l'acrosome. La fixation de la Con-A sur la région acrosomique a été observé dans des spermatozoïdes de hamster, cheval, boeuf, mouton et d'homme

(Runnebaum, *et al.*, 1995). Il a été rapporté la fixation préférentielle de la lectine sur la membrane interne de l'acrosome (Mladenovic, *et al.*, 1993). Des études en microscopie optique montrent une importante augmentation de la fluorescence sur la région antérieure de la tête entre 1 et 5 h de capacitation (Cross et Overstreet, 1987) et en microscopie électronique une fixation sur la membrane interne de l'acrosome après une heure d'incubation avec l'ionophore A-23187 (Holden, *et al.*, 1990).

Nos résultats sont en concordance avec les précédents parce que nous n'avons pas trouvé de marquage sur la membrane plasmique des spermatozoïdes qui n'avaient pas encore fait la réaction acrosomique; un faible marquage apparaît à 30 min lequel augmente visiblement sur la membrane interne de l'acrosome à partir d'une heure pour quasiment disparaître à 3 heures. Cette diminution est peut être due à cause de la détérioration de la membrane au cours de la réaction acrosomique.

Bains *et al* (Bains, *et al.*, 1992) ont rapporté que la lectine PNA se fixe sur la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes. Des études au microscope optique et électronique montrent que le marquage avec PNA diminue lorsque les spermatozoïdes perdent leur acrosome, ce qui suggère la fixation de la lectine sur la membrane externe de l'acrosome (Aitken et Brindle, 1993 ; Mladenovic, *et al.*, 1993 ; Mortimer, *et al.*, 1989 ; Mortimer, *et al.*, 1987). Nous avons trouvé un bon marquage à 1 h d'incubation sur la membrane externe de l'acrosome, spécifiquement sur les vésicules acrosomiques ; ce marquage diminue à partir de 2 h d'incubation. L'initiation de la réaction acrosomique dans le spermatozoïde humain est caractérisée

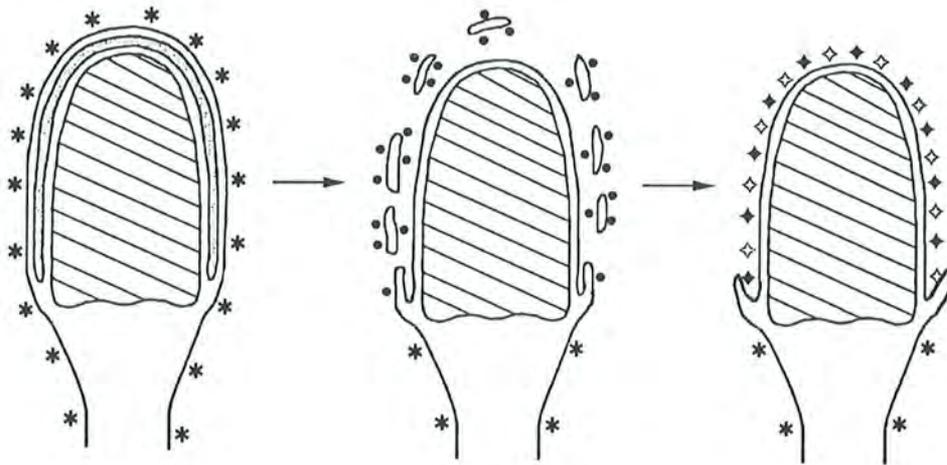
par la formation de vésicules à partir de l'invagination de la membrane acrosomique externe (Nagae, *et al.*, 1986). Les résultats que nous avons obtenus sont en concordance avec les précédents car nous avons trouvé un marquage préférentiel des vésicules. La cytométrie de flux a montré aussi une concordance.

Avec la lectine UEA-I aucun marquage n'a été trouvé sur les spermatozoïdes éjaculés (Lee et Damjanov, 1985). Au moyen de la microscopie optique et électronique on a observé un faible marquage du col, de la région postacrosomique et de la région postérieure de la pièce intermédiaire du spermatozoïde après capacitation (Bains, *et al.*, 1992) ; des récepteurs aux résidus de fucose ont été observé sur les mêmes régions du spermatozoïde (De Cerezo, *et al.*, 1996).

Cette lectine est très peu étudiée dans le sperme humain. Nous n'avons trouvé aucun marquage sur la membrane plasmique après 30 min d'incubation ; avec l'ionophore nous avons trouvé un faible marquage mais à 1 et 2 h il y a un bon marquage sur la membrane interne de l'acrosome et sur quelques vésicules ; en cytométrie de flux nous avons trouvé une cinétique similaire. Des études sur le développement des acrosomes de rats ont démontré que leurs glycoprotéines acrosomiques contiennent des résidus de fucose (Martínez-Menárguez, *et al.*, 1992) et que les résidus de L-fucose peuvent être importants dans la reconnaissance entre gamètes (Huang, *et al.*, 1982). Dans une étude en cytométrie de flux, D'Cruz et Haas ont trouvé aussi des résidus de fucose dans 92 % de spermatozoïdes humains après induction de la réaction acrosomique avec l'ionophore

A-23187 (D'Cruz et Haas, 1996). Nos résultats suggèrent que, avec cette lectine, on peut suivre les étapes de la réaction acrosomique pour évaluer des échantillons de sperme de patients atteints d'un problème d'hypofertilité et ainsi pouvoir établir un diagnostic.

Le schéma 1 montre la cinétique des modifications glucidiques au cours de la capacitation et la réaction acrosomique du spermatozoïde humain que nous avons observé dans cette étude. Des résidus de N-Acetylglucosamine et d'acide sialique sur toute la membrane plasmique (y compris le flagelle),  $\beta$ -D-galactose sur les vésicules acrosomiques, D-mannose et L-fucose sur la membrane interne de l'acrosome.



**Schéma 1. Localisation des résidus au cours de la réaction acrosomique**

**Acide sialique et N-Acetylglucosamine \***

**β-D-galactose •**

**D-mannose ◊**

**L-fucose ✦**

Des anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants antigéniques définis peuvent aussi renseigner sur la réaction acrosomique. Fénichel *et al* ont proposé une nouvelle technique avec un anticorps monoclonal pour évaluer la réaction acrosomique : le GB24, spécifique pour la membrane interne de l'acrosome (Fénichel, *et al.*, 1989). Cette technique permet le marquage de la membrane interne de l'acrosome et de quantifier la fluorescence (Parinaud, *et al.*, 1993). Nous avons trouvé une augmentation de l'intensité de fluorescence en rapport avec le temps d'incubation avec l'ionophore A-23187. Il y a un pic à 2 h, qui diminue à 3 h peut être à cause de la dégradation de la membrane acrosomique. Ces résultats sont en concordance avec des études précédentes qui ont été faites avec les spermatozoïdes de souris (Tao, *et al.*, 1993) et également avec nos résultats de l'étude des lectines.

D'autre part, il a été démontré que certaines fixations acrosomiques étaient liées à une perméabilité membranaire défectueuse (spermatozoïdes anormaux ou morts). En incubant les spermatozoïdes avec les lectines marquées et un colorant vital, par exemple l'iodure de propidium, on élimine donc facilement les spermatozoïdes perméables ou morts qui prennent le colorant (Cross et Overstreet, 1987). Cette méthode de double marquage a déjà été évaluée pour tester la réaction acrosomique par Fénichel *et al* (Fénichel, *et al.*, 1989) et D'Cruz *et Haas* (D'Cruz et Haas, 1992).

Nous avons testé pour la première fois à notre connaissance, une méthode de triple marquage en cytométrie de flux en utilisant des lectines, un colorant vital (l'iodure de propidium) et l'anticorps GB24 pour essayer de discerner les interactions entre eux au cours de la réaction acrosomique.

Beaucoup de lectines possèdent le terme agglutinine dans leur nom car elles sont capables d'agglutiner des cellules portant des glucides appropriés du fait de leur valence multiple (tétravalence pour la plupart), puisque les sites peuvent être occupés simultanément. Des études avec la PNA montrent que cette lectine agglutine environ 70 % de la population des spermatozoïdes et que cette population a des caractéristiques qui correspondent à un sperme fertile (Ravid, *et al.*, 1990). Nous avons trouvé un pourcentage très élevé (plus de 95 %) de spermatozoïdes non agglutinés avec PNA et UEA-I tandis qu'avec Con-A et WGA il y a environ 60 % de spermatozoïdes non agglutinés. Il semblerait que les lectines Con A et WGA exercent une influence plus prononcée sur l'agglutination des spermatozoïdes normospermiques. En conséquence la population dans laquelle l'expression de GB24 et des lectines est mesurée varie en fonction de la quantité de spermatozoïdes non agglutinés.

La vitalité des spermatozoïdes peut être mesurée par des colorants comme l'iodure de propidium. Ce colorant s'intercale de façon non covalente à la molécule de DNA des cellules dont la membrane n'est plus intègre. L'iodure de propidium nous a permis alors de comptabiliser le nombre de spermatozoïdes morts et vivants.

Cependant, nous ne parlerons pas de spermatozoïdes vivants et morts, mais de non perméables et perméables.

Nos résultats montrent une diminution des spermatozoïdes non perméables en RAI pour tous les groupes. Elle peut être due à l'action toxique de l'ionophore A-23187 ou parce qu'une population de spermatozoïdes est devenue perméable à cause de la réaction acrosomique (modifications moléculaires expliquant la perméabilité).

Nous avons trouvé des pourcentages de spermatozoïdes non perméables très variables entre groupes traités comme si la lectine favorisait l'expression du colorant. Henley rapporte une étude avec l'iodure de propidium dans laquelle le nombre de spermatozoïdes non viables a diminué après addition de la lectine PSA marquée à la fluorescéine (Henley, *et al.*, 1994).

D'autres travaux où l'on compare l'iodure de propidium (IP) avec un autre colorant vital : étidium monoazide (EM), montrent une grande variabilité des résultats avec l'IP en rapport avec le temps d'incubation et le nombre de lavages. Le pourcentage de spermatozoïdes non viables avec un seul lavage s'élève à 80 % avec IP tandis qu'il est de 40 % seulement avec l'EM (Henley, *et al.*, 1994 ; Riedy, *et al.*, 1991). Tous ces résultats sont en concordance avec les nôtres car pour le même échantillon on trouve des valeurs très élevées de spermatozoïdes perméables (interprétés comme morts) par rapport à la coloration avec éosine-nigrosine. Il faut ne pas oublier que l'utilisation de l'iodure de propidium suppose que la lecture soit immédiate car la coloration du

noyau des cellules altérées ne persiste pas comme la fluorescéine (Fénichel, 1991).

Par rapport au marquage avec GB24 et les lectines, les résultats sont aussi intéressants: Avec Con-A et PNA nous avons trouvé deux groupes de valeurs qui se comportent de manière différente : un marqueur augmente en même temps que l'autre diminue. C'est à dire que lorsque les valeurs de GB24 augmentent, la lectine diminue et viceversa ; puisqu'il s'agit de marqueurs (lectines et GB24) qui se fixent sur les membranes acrosomiques, il semblerait qu'il y ait encombrement d'un marqueur vis-à-vis de l'autre au niveau de ces sites de fixation. Il serait intéressant de pouvoir isoler ces deux populations afin de rechercher si elles sont différentes du point de vue morphologique ou si cet encombrement n'a aucune préférence et est distribué au hasard.

L'association GB24-WGA donne des résultats différents. La WGA se comporte de façon indépendante par rapport à GB24, peut être parce qu' il s'agit d'une lectine qui se fixe sur la membrane plasmique intacte et qui n'a presque aucune relation avec les membranes acrosomiques.

Par contre, la lectine UEA-I montre aussi une relation très étroite avec la fixation de GB24 ce qui est attendu car cette lectine se fixe de façon préférentielle sur la membrane interne de l'acrosome. Cette relation peut être aussi affectée par le phénomène d'encombrement dont nous avons parlé plus haut.

Quoi qu'il en soit, nos résultats en triple marquage démontrent que la réaction acrosomique s'est déroulée et que ces résultats sont en concordance avec ceux que nous avons obtenus en simple marquage. Il faudrait approfondir cette étude pour essayer de trouver les causes de l'encombrement entre GB24 et les lectines Con-A, PNA et UEA-I et pouvoir aussi utiliser pour la cytométrie de flux un autre colorant vital plus stable, par exemple l'étidium monoazide pour établir des comparaisons. Il serait aussi d'une grande utilité de compléter ce travail avec une étude en microscopie électronique à transmission.

## **6) CONCLUSION**

Parmi les différentes fonctions du spermatozoïde, la réaction acrosomique est importante à étudier, tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel.

Les lectines sont un excellent moyen d'étude des glucides membranaires par leur simplicité d'emploi et leur spécificité glucidique. Elles permettent de suivre les modifications des constituants membranaires au cours des différentes étapes de la fécondation.

L'anticorps monoclonal GB24 a été aussi d'une grande utilité par sa spécificité pour une glycoprotéine de la membrane interne de l'acrosome.

L'apport de la microscopie électronique destinée à apporter un jugement sur la qualité de fécondance d'un sperme est capital pour l'étude de l'intégrité des membranes du spermatozoïde, qui seraient restées très énigmatique sans la microscopie électronique.

D'autre part, la cytométrie de flux permet l'étude quantitative qui a été très importante pour compléter ce travail. Les études en microscopie électronique et cytométrie de flux ne sont pas nombreuses et elles doivent être développées afin de mieux préciser la localisation membranaire des résidus glycosylés.

En effet, différentes techniques sont employées pour appréhender ce phénomène. Chacune met en évidence une étape différente de la réaction acrosomique. Des interprétations différentes en résultent, ce qui complique la comparaison des résultats des différentes équipes.

Il semblerait que les résidus de fucose jouent un rôle important dans le phénomène de fécondation, cependant, les études avec la lectine UEA-I ne sont pas nombreuses car les chercheurs ne trouvaient pas de marquage dans le sperme éjaculé. Maintenant il y a de plus en plus de travaux sur ce domaine. Nous avons trouvé pour la première fois un bon marquage avec UEA-I, spécifique de la membrane interne de l'acrosome.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude sont très importants car nous avons mis au point des méthodes pour étudier la réaction acrosomique en vue du pronostic de réussite de l'assistance médicale à la procréation pour les patients ayant un problème d'hypofertilité. Nous avons trouvé que les lectines Con-A et UEA-I sont les plus adéquates pour évaluer si les spermatozoïdes sont capables de réaliser la réaction acrosomique. Si la réaction acrosomique est normale, le sujet est soumis à la FIV, par contre, si elle est anormale, on doit passer à la microinjection.

Nous avons trouvé aussi que la lectine WGA permet de repérer l'intégrité de la membrane plasmique du spermatozoïde et la PNA donne une idée du bon déroulement de la réaction acrosomique puisqu'elle se fixe sur les vésicules formés dès le début de la réaction acrosomique.

La méthode de triple marquage nous a permis de confirmer nos premiers résultats sur les modifications glucidiques au cours de la réaction acrosomique et de mettre en évidence l'interaction entre différents marqueurs. Il est conseillé d'essayer cette méthode avec un colorant vital plus stable que l'iodure propidium.

**III) LOCALISATION DE  
RÉCEPTEURS AUX  
CYTOKINES  
À LA SURFACE DES  
SPERMATOZOÏDES  
HUMAINS**

# **1) INTRODUCTION**

La réponse immunitaire est le fruit de l'interaction entre des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes/macrophages. Cette coopération peut aboutir à la prolifération cellulaire, la production d'anticorps, la différenciation de cellules cytotoxiques, l'augmentation de l'activité bactericide, et à l'accroissement de l'hématopoïèse. La communication entre les cellules est assurée par des facteurs solubles : **les cytokines**. Toute cellule dont l'activité est modifiée à la suite du message que constitue une cytokine, possède à sa surface un récepteur spécifique. Le monde des cytokines est donc constitué tant par des facteurs solubles que par des constituants membranaires (Cavaillon, 1996).

Les cytokines sont des protéines sécrétoires régulatrices qui contrôlent la survie, le développement et la différenciation d'un certain nombre de cellules, en particulier dans le système immunitaire. Les cytokines comprennent les facteurs de croissance, les interleukines, lymphokines, monokines, les facteurs stimulateurs de colonies et les interférons (Nicola, 1994b).

La première découverte d'une cytokine date de 1957, il s'agit de l'interféron ; à l'époque on ne parlait pas encore de cytokines mais d'activités biologiques et d'activité antivirale. Puis le lymphocyte va être identifié comme cellule responsable pour certaines d'entre elles et le terme de lymphokine sera introduit en 1969. Le terme de monokine sera alors employé pour décrire les médiateurs produits par les monocytes/macrophages. Par la suite, cette dichotomie va s'avérer inexacte puisque des lymphokines peuvent parfaitement être produites

par des monocytes/macrophages et que l'inverse est également vrai. On préféra alors le terme de cytokine proposé dès 1974 par Cohen *et al.*

Les cytokines sont regroupées en différents sous-groupes. Pour ce qui est du groupe des interleukines, ces médiateurs n'ont en commun que l'appellation. Les interleukines n'ont ni parenté biochimique, ni spectre d'action unique, et peuvent aussi bien être impliquées dans la réponse immunitaire, que dans la stimulation de l'hématopoïèse. Une approche plus rationnelle s'est basée sur la structure moléculaire des cytokines ainsi que sur celle de leurs récepteurs

## **Classification**

Selon leur structure, les cytokines sont classées en quatre groupes appelés groupe 1, 2, 3 et 4. Les cytokines qui ont été étudiées dans ce travail appartiennent au groupe 1 :

Groupe 1.- Cette famille de cytokines comprend des molécules formées de 4 hélices de type  $\alpha$  ; elle a été subdivisée en 2 sous-groupes : le premier composé de molécules à chaînes courtes (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF et IFN $\gamma$ ) et le deuxième composé de molécules à chaînes longues (IL-6, IL-12, EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, IL-11, GH, PRL, IFN  $\alpha$  et  $\beta$ , IL-10) (Nicola, 1994b).

Il existe une relation entre la structure d'une cytokine et le type de récepteur auquel elle se fixe. Presque toutes les cytokines du groupe 1 s'attachent aux récepteurs qui possèdent un ou plusieurs domaines de 200 acides aminés. Les IFN et l'IL10 se fixent sur les protéines réceptrices à l'IFN (Hilton, 1994 ; Nicola, 1994b).

## **Cytokines formées de 4 hélices de type $\alpha$ à chaînes courtes**

### **a) Interleukine-2 (IL2)**

L'IL2 humaine est une glycoprotéine de 15,5 kDa, produite par des lymphocytes de type T. Elle est responsable de nombreuses fonctions dont les principales sont la maturation et la prolifération de lymphocytes de type B, T et natural killer (Goldsmith et Greene, 1994).

L'IL2 agit au moyen d'un récepteur trans-membranaire (IL2r). Ce récepteur est composé de 3 chaînes glycoprotéiques  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de masses moléculaires respectives 55, 70-75 et 64 kDa. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  forment un complexe récepteur-IL2 d'affinité réduite. Elles sont reconnues spécifiquement et respectivement par les anticorps monoclonaux CD25 et CD122. La chaîne  $\gamma$  ne forme pas de complexe avec IL2 mais stabilise les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  pour former un complexe récepteur-IL2 d'affinité importante. Elle fait la particularité de son sous-groupe, car elle est commune aux récepteurs à IL2, IL4, IL7, IL9 et IL13 (Voss et Robb, 1994).

### **b) Interleukine-3 (IL3)**

L'interleukine-3 est une protéine de masse moléculaire 20-32 kDa, selon le degré de glycosylation dont nous ne connaissons

pas la fonction biologique. L'IL3 est produit par des lymphocytes de type T. Elle est le facteur d'hématopoïèse le plus diversifié. Elle est responsable de la prolifération, de la différenciation, de la survie des précurseurs communs des cellules sanguines et de nombreux précurseurs spécifiques (à part les lymphocytes) ainsi que d'un bon nombre de cellules arrivées à maturité. Sa faculté de régénérer des cellules hématopoïétiques, en fait un adjuvant de choix dans les traitements chimiothérapeutiques de cancers (Schrader, 1994).

L'IL3 agit par l'intermédiaire d'un récepteur trans-membranaire (IL3r) composé de deux chaînes. La chaîne  $\alpha$  de 60-70 kDa est celle où s'attache l'IL3. La chaîne  $\beta$  de 120-140 kDa est commune aux récepteurs à IL5 et GM-CSF. Cette seconde chaîne où ne se fixe pas l'IL3, confère une affinité plus importante au complexe IL3-chaîne  $\alpha$ . Elle est reconnue par l'anticorps GP130 (Ogorochi et Miyajima, 1994).

### **c) Interleukine-5 (IL5)**

L'interleukine-5 est une protéine de 40-45 kDa, produite par des lymphocytes de type T et en plus faible quantité par les éosinophiles ; elle n'est active que sous forme de dimère. Sa principale fonction réside dans la régulation de la production d'éosinophiles. On peut constater une augmentation du taux d'IL5 sérique dans les pathologies impliquant les éosinophiles, telles que l'asthme, l'éosinophilie et les infections parasitaires (Sanderson, 1994).

L'IL5 agit au moyen d'un récepteur trans-membranaire (IL5r) composé de deux chaînes. La chaîne  $\alpha$ , spécifique, de 60 kDa est celle où s'attache l'IL5. La chaîne  $\beta$  de 120-140 kDa est commune aux

récepteurs à IL3 et GM-CSF. Cette seconde chaîne qui ne lie pas l'IL5 confère une affinité plus importante au complexe IL5-chaîne  $\alpha$  (Tavernier, 1994).

#### **d) Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)**

Le GM-CSF est une protéine de 20-30 kDa qui a une activité diversifiée en induisant la prolifération, la différenciation et la survie de cellules hématopoïétiques (Nicola, 1994a). Elle agit au moyen d'un récepteur trans-membranaire (GM-CSFr) composé de deux chaînes : la chaîne  $\alpha$  de 75-85 kDa où se lie le GM-CSF et la chaîne  $\beta$  commune aux récepteurs à IL3 et IL5.

#### **e) Interféron $\gamma$ (IFN $\gamma$ )**

C'est une protéine de 20-25 kDa produite par des lymphocytes de type T. Elle a, entre autres fonctions, une activité antivirale et antitumorale ; elle intervient dans l'élimination de parasites intracellulaires. Elle agit au moyen d'un récepteur trans-membranaire composé de deux chaînes. La chaîne  $\alpha$  de 65 kDa est identifiée spécifiquement par l'anticorps CD119 (Gray, 1994 ; Schreiber et Aguet, 1994).

## **Cytokines formées de 4 hélices de type $\alpha$ à chaînes longues**

### **Interleukine-6 (IL6)**

L'interleukine-6 est une glycoprotéine de 26 kDa, produite par des lymphocytes T. L'IL6 induit la prolifération de nombreuses cellules, entre autres des lymphocytes B et T et la synthèse de protéines par les hépatocytes (Kishimoto, *et al.*, 1992 ; Narazaki et Kishimoto, 1994a). L'IL6 agit au moyen d'un récepteur trans-membranaire (IL6r) composé de deux chaînes. La chaîne  $\alpha$  spécifique de 80 kDa, sur laquelle se fixe l'IL6 et la chaîne  $\beta$  de 130 kDa. Les 2 chaînes du récepteur sont identifiées spécifiquement et respectivement par les anticorps CD126 et CD130 (Narazaki et Kishimoto, 1994b).

## **2) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

Dans l'espèce humaine, une immunisation dirigée contre des antigènes spermatiques peut être un facteur d'infertilité qu'elle soit présente chez l'homme (auto-immunité) ou chez la femme (iso-immunité). La plupart des études faites sur cette immunité se sont limitées à la recherche des anticorps circulants dirigés contre des spermatozoïdes. La fréquence de ces anticorps est très variable selon les séries des sujets infertiles étudiés (Bronson, *et al.*, 1984).

Certaines observations telles que la présence de macrophages autour des cellules de Sertoli (Calkins, *et al.*, 1988), de lymphocytes T dans l'épididyme (El-Demiry et James, 1988), de macrophages dans les éjaculats (Wolff et Anderson, 1988) et une corrélation entre une leucospermie et une mauvaise qualité du sperme (Wolff, *et al.*, 1990) suggèrent de liens entre le système immunitaire et le système reproducteur.

Tout cela nous a orienté vers la recherche d'une intervention des cytokines dans l'altération des propriétés des spermatozoïdes qui permet d'expliquer la perte de sa fécondance. Nous nous sommes alors orientés vers la mise en évidence de récepteurs qui traduirait la sensibilité des spermatozoïdes aux cytokines. Les objectifs de cette étude sont :

a) Chercher des récepteurs aux cytokines sur la membrane des spermatozoïdes humains, en particulier les récepteurs aux chaînes  $IL2\alpha$ ,  $IL2\beta$ ,  $IL6\alpha$ ,  $IFN\gamma\alpha$ , et la chaîne  $\beta$  qui est commune à  $IL3r$ ,  $IL5r$  et GM-CSFr.

b) Faire une étude quantitative en cytométrie de flux et comparer la présence de ces récepteurs avant et après lavage avec le Percoll.

c) Déterminer la localisation des récepteurs par microscopie électronique à transmission.

### **3) MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Les spermatozoïdes étudiés proviennent de 20 patients du CECOS (Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme Humains) de la Maternité Régionale de Nancy. Les échantillons ont été recueillis par masturbation, après un délai d'abstinence sexuelle de trois à cinq jours, qui assure un volume d'éjaculat et une concentration de spermatozoïdes optimaux pour étudier les raisons d'une stérilité ou en vue d'une FIV.

## **A) Analyse du sperme**

L'analyse du sperme a été faite selon protocole déjà décrit ci-dessus.

## **B) Préparation des spermatozoïdes**

Deux conditions ont été étudiées, le **sperme frais** et le sperme passé à travers d'un gradient de Percoll, nommé : **sperme lavé**.

## C) Anticorps

Les anticorps anti-récepteurs aux cytokines de l'homme utilisés (anticorps primaires) sont :

CD25 Anticorps monoclonal de souris. spécifique du récepteur à la chaîne  $\alpha$  de l'IL2 (DAKO, Glostrup, Danemark).

CD122 Anticorps monoclonal de souris spécifique du récepteur à la chaîne  $\beta$  de l'IL2 (Imunotech. Marseille, France).

CD126 Anticorps polyclonal de lapin spécifique du récepteur à la chaîne  $\alpha$  de l'IL6 (Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA).

GP130 Anticorps polyclonal de lapin spécifique du récepteur à la chaîne  $\beta$  commune à l'IL3, IL5 et GM-CSF (Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA).

CD119 Anticorps polyclonal de lapin spécifique du récepteur à la chaîne  $\alpha$  de l'IFN $\gamma$  (Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA).

Pour la cytométrie de flux l'anticorps secondaire a été :

Anticorps polyclonal anti-IgG de souris conjugué à la fluorescéine (DAKO, Glostrup, Danemark), pour CD25 et CD122.

Anticorps polyclonal anti-IgG de lapin conjugué à la fluorescéine (Institut Pasteur Production, Marne la Coquette, France) pour CD126, GP130 et CD119.

Pour la microscopie électronique l'anticorps secondaire a été :

Anticorps polyclonal anti-IgG de souris conjugué à l'or colloïdal (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) pour CD25 et CD122.

Anticorps polyclonal anti-IgG de lapin conjugué à l'or colloïdal (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) pour CD126, GP130 et CD119.

## **D) Cytométrie de flux**

L'étude en cytométrie de flux a été menée au cytomètre EPICS XL (Epics Division Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) utilisé au Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine. L'analyse statistique a permis de calculer les moyennes des différents échantillons, de faire la comparaison avec les témoins et de comparer les résultats entre les spermatozoïdes frais et les spermatozoïdes lavés. Pour apprécier la signification statistique des différences nous avons utilisé le test t de Student.

Le test du coefficient de corrélation a été appliqué pour établir la relation entre les données de la fluorescence et les données des spermogrammes (numération, mobilité, vitalité et formes anormales et immatures). Pour les comparaisons comme pour les corrélations la valeur "p" est considérée comme significative lorsqu'elle est inférieure à 0.05.

Les spermatozoïdes ont été incubés avec l'anticorps primaire pendant 30 minutes à 37 °C, Ensuite, ils ont été lavés avec du PBS et re-incubés avec l'anticorps secondaire dans les mêmes conditions.

Après lavage avec du PBS et centrifugation pendant 5 minutes à 600 g, le culot est remis en suspension, puis fixé au paraformaldéhyde 1 %. Finalement, la lecture au cytomètre a été faite.

Nous avons sélectionné la population de spermatozoïdes par la taille en abscisse (FS) et la densité cellulaire en ordonnée (SS).

La proportion des spermatozoïdes marqués et l'intensité de la fluorescence ont été mesurées par le cytomètre. Par multiplication de ces deux données nous avons obtenu une troisième valeur : l'index de fluorescence. Deux mille spermatozoïdes ont été analysés par échantillon.

## **E) Microscopie électronique à transmission**

Pour l'étude en microscopie électronique, deux méthodes ont été employées : Marquage avant inclusion (pre-embedding) et marquage après inclusion (post-embedding).

### **a) Marquage avant inclusion (pre-embedding)**

Des échantillons de sperme ont été incubés pendant 1 h avec l'anticorps primaire dilué au 1/30ème dans du PBS. Après un lavage avec du PBS (37 °C) et centrifugation pendant 5 minutes à 600 g, les spermatozoïdes ont été re-incubés avec l'anticorps secondaire conjugué à l'or colloïdal, dans les mêmes conditions.

Après lavage, les spermatozoïdes sont immédiatement fixés pendant au minimum 2 h à température ambiante avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4. Les spermatozoïdes sont encore lavés et post-fixés avec du tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 30 minutes à température ambiante. L'échantillon est lavé et centrifugé; le culot est inclus en agarose 2 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA).

L'inclusion en épon est faite selon le protocole décrit ci-dessus. Les coupes ultra-fines d'épaisseur de 60-70 nm ont été réalisées avec un ultra microtome Reichert-Jung avec et un couteau de diamant.

Les coupes sont colorées à l'acétate d'uranyle 2 % pendant 10-20 minutes à 37 °C au noir, et au colorant de Reynolds (sels de plomb) de 10 à 20 minutes à température ambiante au noir. Finalement les coupes sont analysées au Microscope Électronique à Transmission Philips CM12.

### **b) Marquage après inclusion (post-embedding)**

Les spermatozoïdes sont fixés dans un mélange paraformaldéhyde à 4 %, glutaraldéhyde à 0,1 % dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M pendant 3 h.

Une déshydratation progressive est faite : alcool 75°, 90° et 100°, 15 minutes chaque bain. Une pre-imprégnation avec le bioacryl, de deux fois une heure à température ambiante sous agitation lente, précède l'imprégnation avec du bioacryl frais toute la nuit à température ambiante.

Chaque prélèvement est disposé dans un tube Eppendorff rempli de bioacryl. La polymérisation se fait pendant 72 h en chambre froide dans une boîte à UV. Les coupes ultrafines sont recueillies sur grilles de nickel de 400 mesh recouvertes d'un film de formvar-carbon.

Après réhydratation des coupes avec du PBS, une pré-incubation a été faite avec le sérum bloquant (BSA) pendant 30 minutes à température ambiante sous légère agitation. Ensuite, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire pendant toute la nuit à 4 °C, puis rincées avec du PBS.

Une deuxième incubation a été faite avec l'anticorps secondaire pendant une heure à température ambiante. Après rinçage avec du

PBS, les coupes ont été fixées dans du glutaraldéhyde 1 % pendant 5 minutes, et rincées trois fois avec de l'eau distillée.

Les coupes sont colorées avec de l'acétate d'uranyle 2 % pendant 10-20 minutes à 37 °C au noir, et du Reynolds 5 minutes à température ambiante au noir. Finalement les coupes sont analysées au Microscope Électronique à Transmission Philips CM12.

## **F) Témoins**

Pour la cytométrie de flux et pour la microscopie électronique, des témoins ont été préparés pour chaque échantillon, après incubation avec l'anticorps secondaire seulement. (anti-souris ou anti-lapin) pour vérifier la spécificité du marquage.

## **4) RÉSULTATS**

## **A) Caractéristiques des spermés**

L'âge des patients était compris entre 27 et 47 ans, la numération des spermés entre 15 et  $420 \times 10^6/\text{ml}$  et la mobilité 1 h après l'éjaculation entre 35 et 69 %. Le détail des spermogrammes peut être visualisé dans le tableau 6.

Pour le calcul des corrélations avec les paramètres du spermogramme, il existe des données sur au moins 15 spermés pour chaque paramètre.

## **B) Cytométrie de flux**

Le pourcentage des spermatozoïdes et l'intensité de fluorescence moyenne ont été multipliés entre eux pour obtenir l'index de fluorescence. Les moyennes et les écarts types des résultats des échantillons ont été établis avant et après Percoll, pour chaque anticorps et pour chaque paramètre.

Les différentes données du marquage avec l'anticorps ont été comparées à celles des témoins afin de vérifier la spécificité du marquage. Il existe cependant une fluorescence "bruit de fond" de faible intensité.

Les résultats seront étudiés en détail par la suite pour chaque anticorps, mais une première observation permet de constater un pourcentage de spermatozoïdes marqués à peu près équivalent pour tous les anticorps et une différence importante avec les témoins, en dehors des spermatozoïdes frais marqués par CD25 et CD122.

Les intensités de fluorescence sont plus élevées avec l'anticorps que sans l'anticorps (témoin) dans tous les cas, mais nous pouvons constater des différences entre les anticorps séparés en deux groupes : CD25 et CD122 avec des valeurs plus élevées, et CD126, GP130 et CD119 avec des valeurs plus basses. L'index de fluorescence montre le même comportement car les groupes traités avec les anticorps sont plus élevés que les témoins ; et les valeurs de CD25 et CD122 plus importantes que celles des trois autres anticorps.

Le coefficient de corrélation a été calculé entre l'index de fluorescence et les données du spermogramme (tableau 6) ; ce test statistique est très utile pour établir l'importance de la relation entre les paramètres étudiés. Une corrélation négative signifie que tandis qu'un paramètre augmente, l'autre diminue (relation inverse) ; une corrélation positive veut dire que les deux paramètres se comportent de la même façon (relation directe).

Une corrélation négative a été trouvée entre les anticorps CD25, CD122, CD126 et GP130 sur sperme frais et la mobilité une et trois heures après émission et quatre heures après Percoll, c'est à dire, une fluorescence importante a été observée dans les échantillons à mobilité diminué ; avec les mêmes anticorps une corrélation positive a été trouvé

avec le pourcentage de spermatozoïdes immatures et de forme pathologique. Les anticorps CD25, CD122 et GP130 sur sperme lavé présentent également une corrélation négative avec la mobilité une heure après émission et quatre heures après Percoll. La numération est corrélée négativement avec CD25 et CD122 sur sperme frais et la vitalité avec CD126 sur sperme frais et CD25 sur sperme lavé .

## Données des Spermogrammes

Echantillon	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
Numération (/ml)	15200	27200	21800	64400	35800	18000	51600	69200	56400	62400	64000	54400	73600	34000	47200	420000	39400	70400	325200	94400
Mobilité 1h (F) (%)	35	36	56	55	52	42	55	60	41	63	ND	50	60	63	51	60	64	69	56	58
Mobilité 3h (F) (%)	ND	20	47	50	50	40	50	45	39	60	ND	ND	55	60	35	37	60	63	45	56
Mobilité 6h (F) (%)	ND	20	ND	40	40	31	40	35	38	58	ND	ND	45	ND	34	23	58	50	43	46
Mobilité 4h (L) (%)	60	50	ND	70	67	50	65	60	60	75	ND	70	72	ND	64	70	75	75	80	70
Mobilité 7h (L) (%)	ND	50	ND	0	0	0	0	54	60	70	ND	ND	64	ND	62	70	70	70	70	65
Mobilité 24h (L) (%)	ND	5	ND	0	0	0	0	48	39	35	ND	ND	61	ND	55	26	65	40	30	25
Vitalité (%)	ND	71	88	80	72	68	72	80	74	80	ND	ND	87	83	76	83	87	83	70	81
Formes anormales (%)	ND	79	79	38	63	52	73	28	45	29	ND	ND	43	20	46	32	26	56	37	36
Formes immatures (%)	ND	16	6	8	10	6	14	10	8	6	ND	ND	5	8	11	5	4	3	8	5
Âge (années)	27	30	34	33	30	28	39	47	31	47	36	31	36	31	29	35	36	29	40	30

**Tableau 6.** Données du spermogramme.

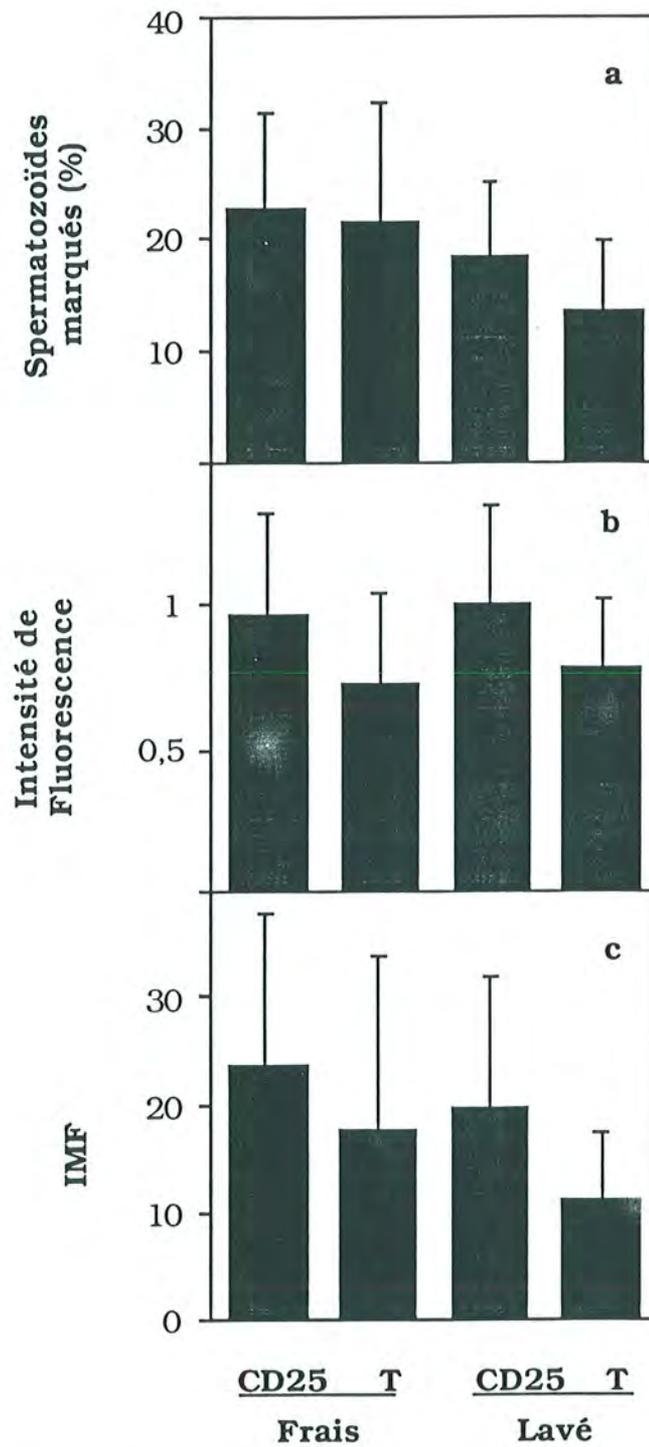
ND = No data, F= Sperme Frais, L = Sperme lavé

## Anticorps CD25

Pour le sperme frais nous ne constatons pas de différences notables entre les pourcentages de spermatozoïdes marqués avec l'anticorps (23 %) et le témoin (21 %). La valeur de l'index de fluorescence est plus importante avec l'anticorps que pour le témoin (23,9 et 17,9). Après Percoll (sperme lavé), les différences entre les échantillons marqués et les témoins sont très importantes : 18 % et 13 % de spermatozoïdes respectivement (différence statistiquement significative,  $p < 0,005$ ), et pour l'index de fluorescence 19,9 et 11,5 pour le témoin (différence significative  $p < 0,005$ ) (graphique 15 a, b, c).

L'index de fluorescence est corrélé avec un certain nombre de données du spermogramme : relation négative avec la numération ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,05$ ), et la mobilité 4 et 7 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,64$ ,  $p < 0,01$  et  $r = -0,59$ ,  $p < 0,05$  respectivement) et relation positive avec le pourcentage de spermatozoïdes de forme anormale ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,05$ ).

Sur le sperme lavé, l'index de fluorescence est fortement corrélé négativement avec la mobilité du sperme frais 1 h après éjaculation ( $r = -0,72$ ,  $p < 0,001$ ), mais également avec la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll et avec la vitalité des spermatozoïdes ( $r = -0,62$ ,  $p < 0,01$  et  $r = -0,56$ ,  $p < 0,05$  respectivement).



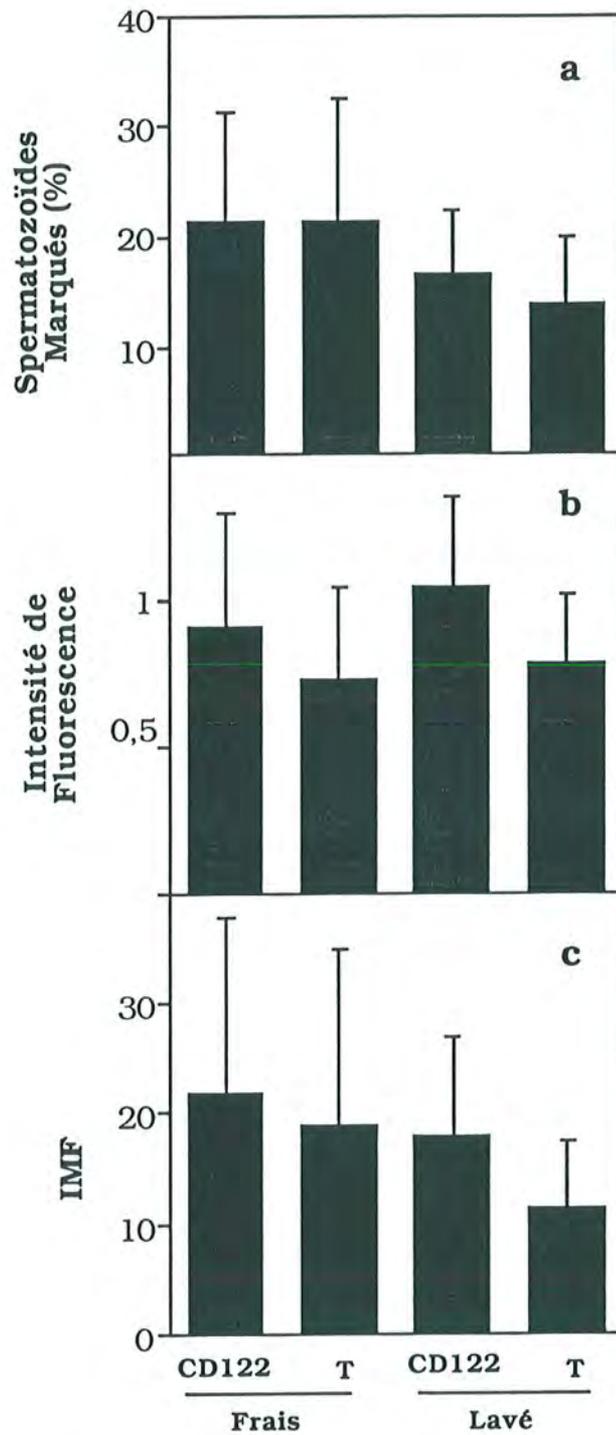
**Graphique 17.** Marquage des spermatozoïdes avec l'anticorps CD25. a : Pourcentage moyen de spermatozoïdes marqués ; b : Intensité moyenne de fluorescence ; c : Index Moyen de Fluorescence (IMF) ; T : Témoin.

## CD122

Pour le sperme frais nous constatons une égalité entre les pourcentages moyens de spermatozoïdes marqués avec l'anticorps et le témoin : 21 %. L'index de fluorescence est plus important pour les spermatozoïdes traités avec l'anticorps que pour le témoin (21,9 et 17,8). Pour le sperme lavé, les différences entre les échantillons traités et les témoins sont importantes pour le pourcentage de spermatozoïdes marqués : 16 % et 13 % et pour l'index de fluorescence : 17,9 et 11,5 ( $p < 0,005$ ) (graphique 16 a, b, c).

Sur le sperme frais, l'index de fluorescence est corrélé avec un certain nombre de données du spermogramme : relation négative avec la numération ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ ), la mobilité du sperme frais 1 h après éjaculation ( $r = -0,58$ ,  $p < 0,01$ ) et la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,60$ ,  $p < 0,05$ ) et corrélation positive avec le pourcentage de spermatozoïdes de forme anormale et le pourcentage de spermatozoïdes immatures ( $r = 0,60$ ,  $p < 0,05$  et  $r = 0,52$ ,  $p < 0,05$  respectivement).

Sur le sperme lavé, l'index de fluorescence est corrélé négativement avec la mobilité du sperme frais 1, 3 et 6 h après éjaculation ( $r = -0,49$ ,  $p < 0,05$ ,  $r = -0,52$ ,  $p < 0,05$  et  $r = -0,56$ ,  $p < 0,05$  respectivement), la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,01$ ) et positivement avec le pourcentage de spermatozoïdes immatures ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,01$ ).

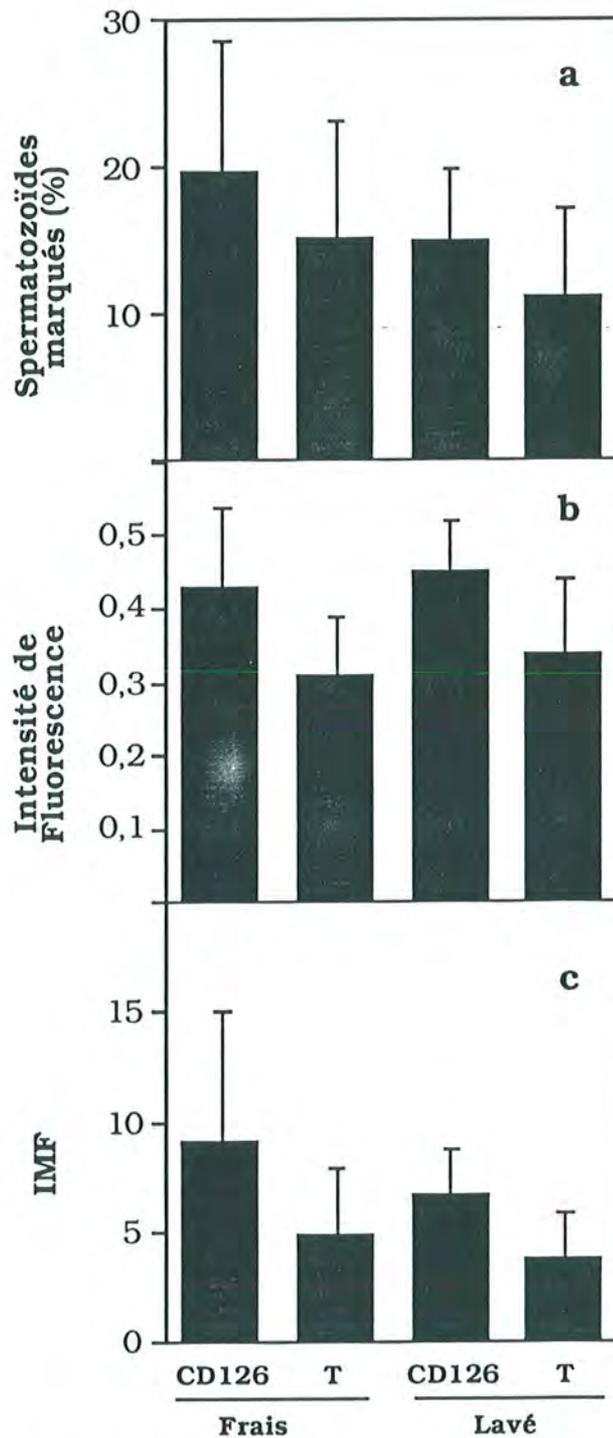


**Graphique 18.** Marquage des spermatozoïdes avec l'anticorps CD122. a : Pourcentage moyen de spermatozoïdes marqués ; b : Intensité moyenne de fluorescence ; c : Index Moyen de Fluorescence (IMF) ; T : Témoin.

## CD126

Pour le sperme frais ainsi que pour le sperme lavé, les différences entre les spermatozoïdes marqués avec l'anticorps et les témoins sont très importantes ; a) pour le pourcentage : 19 % et 15 % pour le sperme frais (différence significative  $p < 0,005$ ) et 14 % et 11 % pour le sperme lavé (différence significative  $p < 0,005$ ). b) Pour l'index de fluorescence : 9,1 et 4,8 ( $p < 0,005$ ) et 6,7 et 3,7 ( $p < 0,005$ ) respectivement (graphique 17 a, b, c).

Sur le sperme frais, l'index de fluorescence est fortement corrélé avec la majorité des données du spermogramme : relation négative avec la mobilité du sperme frais 1, 3 et 7 h après éjaculation ( $r = -0,77$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = -0,67$ ,  $p < 0,01$  et  $r = -0,57$ ,  $p < 0,05$  respectivement), la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,69$ ,  $p < 0,01$ ) et la vitalité des spermatozoïdes ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,05$ ) ; une corrélation positive avec le pourcentage de spermatozoïdes de forme anormale et le pourcentage de spermatozoïdes immatures ( $r = 0,67$ ,  $p < 0,01$  et  $r = 0,70$ ,  $p < 0,01$  respectivement). Sur le sperme lavé, il n'y a aucune corrélation entre les données du spermogramme et l'index de fluorescence.

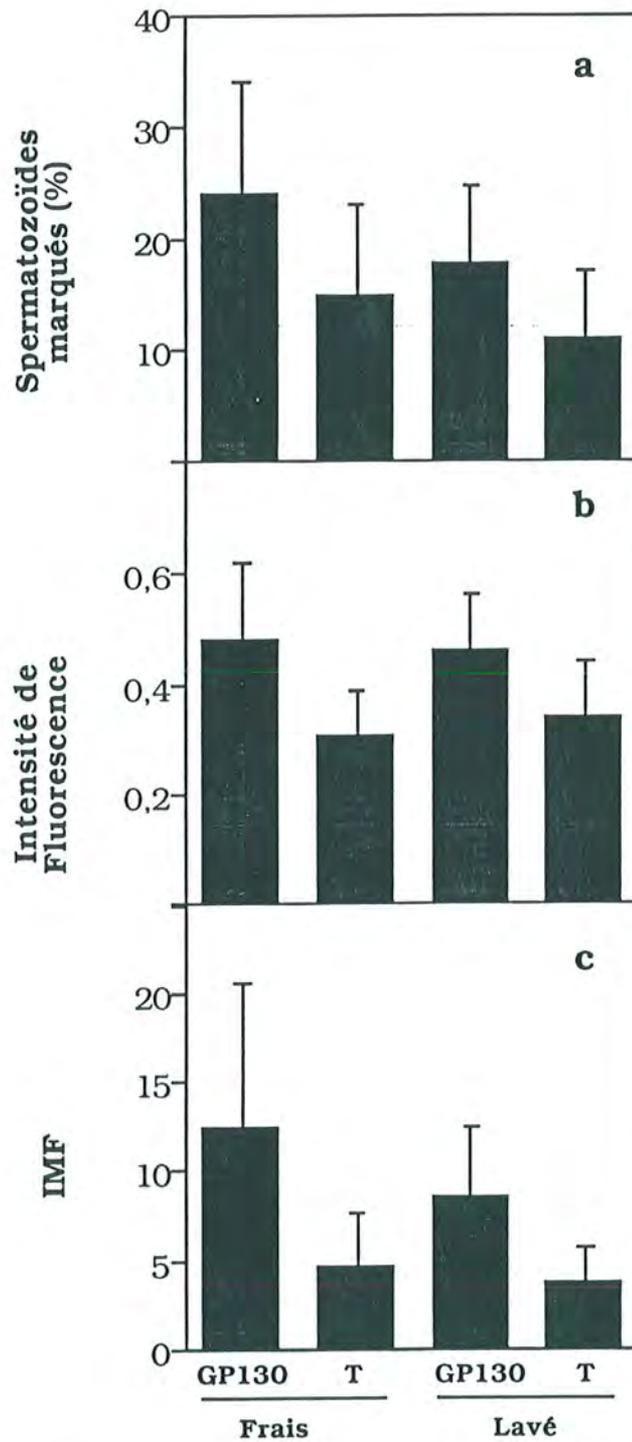


**Graphique 19.** Marquage des spermatozoïdes avec l'anticorps CD126. a : Pourcentage moyen de spermatozoïdes marqués ; b : Intensité moyenne de fluorescence ; c : Index Moyen de Fluorescence (IMF) ; T : Témoin.

## GP130

Pour le sperme frais ainsi que pour le sperme lavé, les différences entre les spermatozoïdes marqués avec l'anticorps et les témoins sont très importantes ; a) pour le pourcentage : 24 % et 15 % pour le sperme frais (différence significative  $p < 0,0005$ ) et 17 % et 11 % pour le sperme lavé (différence significative  $p < 0,0005$ ). b) Pour l'index de fluorescence : 12,5 et 4,8 ( $p < 0,0005$ ) et 6,7 et 3,7 ( $p < 0,0005$ ) respectivement (graphique 18 a, b, c).

Sur le sperme frais l'index de fluorescence est corrélé avec la majorité des données du spermogramme : relation négative avec la mobilité du sperme frais 1 et 3 h après éjaculation ( $r = -0,75$ ,  $p < 0,001$  et  $r = -0,64$ ,  $p < 0,01$  respectivement), et la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,62$ ,  $p < 0,01$ ) et une corrélation positive avec le pourcentage de spermatozoïdes de formes anormales et le pourcentage de spermatozoïdes immatures ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,01$  et  $r = 0,69$ ,  $p < 0,01$  respectivement). Sur le sperme lavé l'index de fluorescence est corrélé négativement avec la mobilité du sperme frais 1 h après éjaculation ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,05$ ) et la mobilité 4 h après centrifugation sur gradient de Percoll ( $r = -0,69$ ,  $p < 0,01$ ).

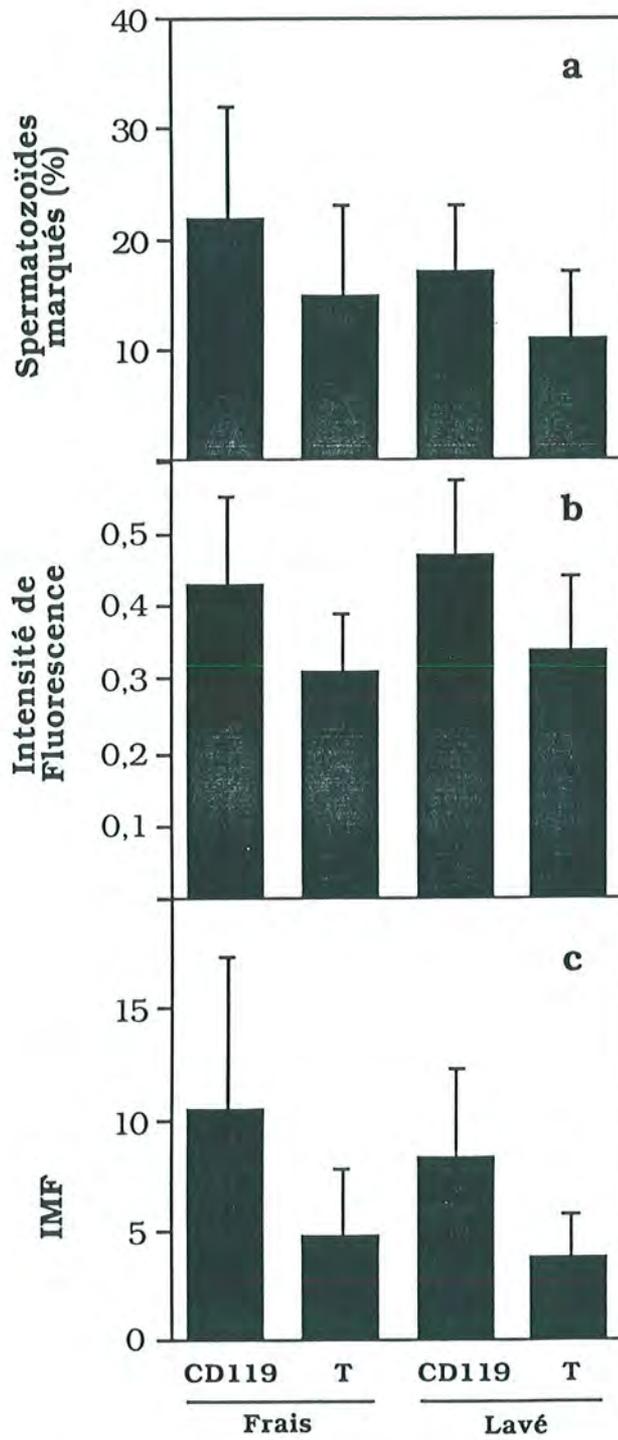


**Graphique 20.** Marquage des spermatozoïdes avec l'anticorps GP130. a : Pourcentage moyen de spermatozoïdes marqués ; b : Intensité moyenne de fluorescence ; c : Index Moyen de Fluorescence (IMF) ; T : Témoin.

## CD119

Avec cet anticorps, les différences entre les spermatozoïdes marqués avec l'anticorps et les témoins sont significatives pour le sperme frais ainsi que pour le sperme lavé ; a) pour le pourcentage : 22 % et 15 % pour le sperme frais (différence significative  $p < 0,0005$ ) et 17 % et 11 % pour le sperme lavé (différence significative  $p < 0,0005$ ). b) Pour l'index de fluorescence : 12,5 et 4,8 ( $p < 0,0005$ ) et 6,7 et 3,7 ( $p < 0,0005$ ) respectivement (graphique 19 a, b, c).

Sur le sperme frais l'index de fluorescence est corrélé négativement avec la mobilité du sperme frais 1 h après éjaculation ( $r = -0,55$ ,  $p < 0,05$ ). Sur le sperme lavé, par contre, il n'y a aucune corrélation entre les données du spermogramme et l'index de fluorescence.



**Graphique 21.** Marquage des spermatozoïdes avec l'anticorps CD119. a : Pourcentage moyen de spermatozoïdes marqués ; b : Intensité moyenne de fluorescence ; c : Index Moyen de Fluorescence (IMF) ; T : Témoin.

## **C) Microscopie électronique à transmission**

Les résultats en microscopie électronique montrent un marquage relativement peu important, surtout sur la pièce intermédiaire et sur la pièce principale des spermatozoïdes mais certaines différences entre les anticorps ont pu être observées (tableau 7). Le pourcentage des spermatozoïdes marqués est faible dans tous les cas, pas plus de 10 %.

### **CD25**

Un marquage significatif a été trouvé sur la pièce intermédiaire (figure 20) ainsi que sur la pièce principale. Il n'y a pas eu de différence entre le sperme frais et le sperme lavé.

### **CD122**

Pour cet anticorps un meilleur marquage a été trouvé mais limité seulement à la pièce intermédiaire (figure 17). Les résultats ont été les mêmes pour le sperme frais que pour le sperme lavé.

## **CD126**

Le marquage a été le même que celui trouvé avec l'anticorps CD25 ; nous avons trouvé un marquage significatif sur la pièce intermédiaire du sperme frais et lavé (figure 18) et aussi sur la pièce principale.

## **GP130**

Avec cet anticorps nous avons trouvé des billes d'or sur la pièce intermédiaire du sperme frais et lavé, et sur la pièce principale du sperme frais (figure 19) mais pas de marquage sur la pièce principale du sperme lavé.

## **CD119**

En ce qui concerne le CD119, nous avons trouvé un marquage significatif sur la pièce intermédiaire avant et après percoll mais aucun marquage n'a été trouvé sur la pièce principale, ni avant ni après percoll.

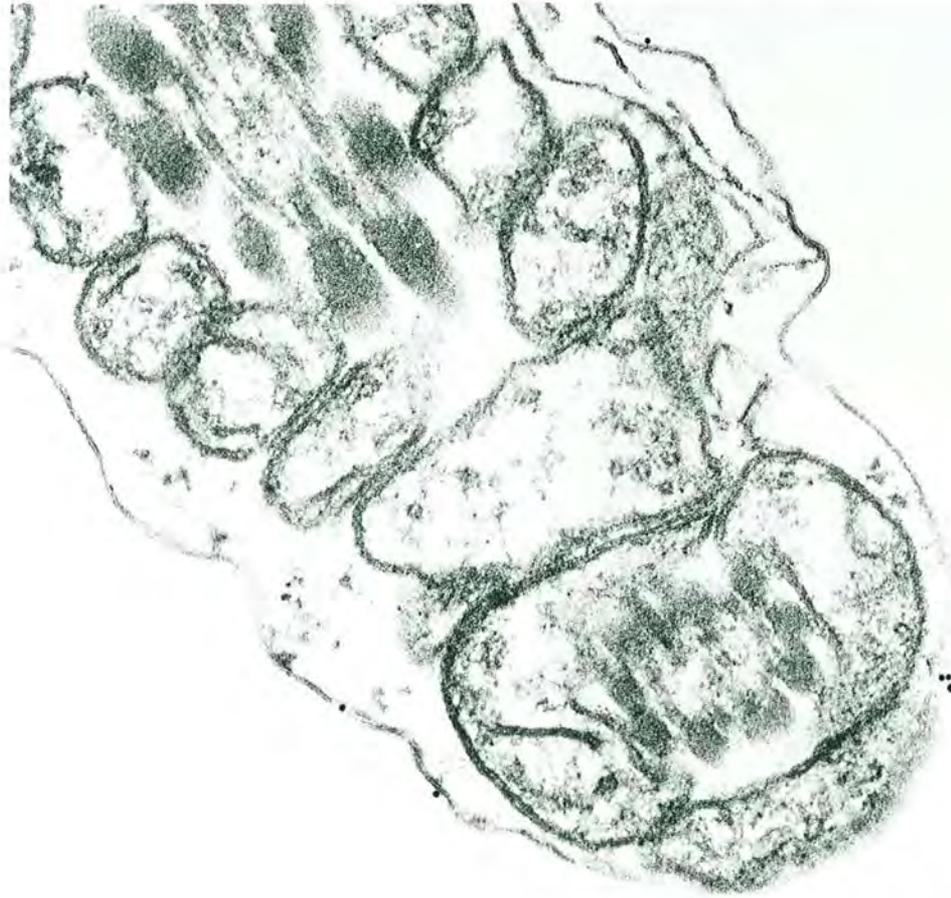
Marquage	Anticorps									
	CD25		CD122		CD126		GP130		CD119	
Localisation	PI	PP	PI	PP	PI	PP	PI	PP	PI	PP
Sperme frais	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Sperme lavé	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-

**Tableau 7.** Localisation du marquage des spermatozoïdes avec les anticorps testés en microscopie électronique à transmission. P I : Pièce Intermédiaire ; P P : Pièce Principale.

# PLANCHE

**Figure 17.** Marquage positif avec l'anticorps CD122 (anticorps monoclonal de souris spécifique du récepteur à la chaîne  $\beta$  de l'IL2) sur la pièce intermédiaire du spermatozoïde.

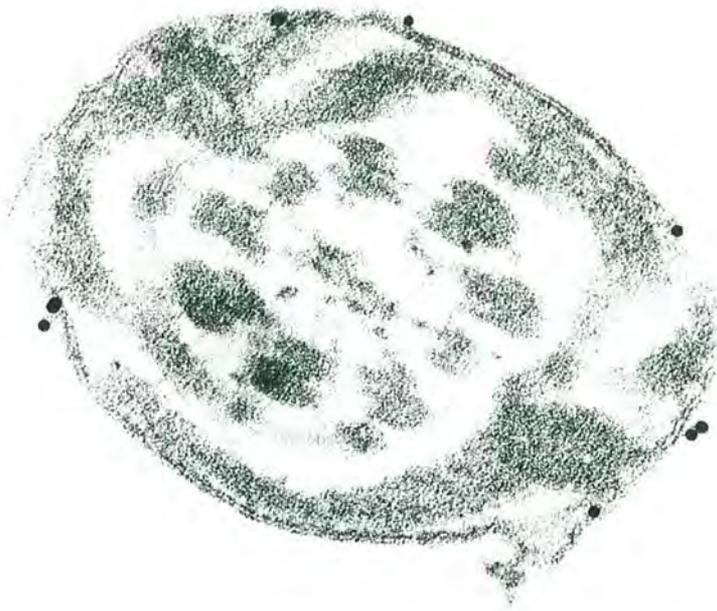
**Figure 18.** Marquage significatif localisé sur la pièce intermédiaire du sperme frais et lavé avec l'anticorps CD126 (anticorps polyclonal de lapin spécifique du récepteur à la chaîne  $\alpha$  de l'IL6).



# PLANCHE

**Figure 19.** Marquage significatif avec l'anticorps GP130 (anticorps polyclonal de lapin spécifique du récepteur à la chaîne  $\beta$  commune à l'IL3, IL5 et GM-CSF) sur la pièce principale du flagelle.

**Figure 20.** Présence de billes d'or sur la pièce intermédiaire avec l'anticorps CD25 (anticorps monoclonal de souris spécifique du récepteur à la chaîne  $\alpha$  de l'IL2).



19



20

## **5) DISCUSSION**

Les cytokines, découvertes initialement dans le système immunitaire, apparaissent aujourd'hui produites dans de très nombreux organes et remplissent des fonctions biologiques très diverses. C'est ainsi que de nombreuses données récentes établissent le rôle important de plusieurs cytokines dans différents aspects de la fonction de reproduction. Les cytokines peuvent influencer les fonctions neuroendocrines, ovariennes, le contrôle de l'implantation, de la gestation et les gamétogenèses mâle et femelle.

Vingt pour cent des stérilités inexplicables pourraient découler d'un problème immunitaire ; le chiffre attendrait 85 % de fausses couches répétées inexplicables (Hill, 1991). Des anticorps dirigés contre des spermatozoïdes et des ovocytes sont des facteurs contribuant à l'infertilité (Bronson, *et al.*, 1984).

Il est bien connu qu'un certain nombre de situations pathologiques, stress, infection ou inflammation, liées à une production anormale des cytokines sont à l'origine des dysfonctionnements ovariens et modifient le déroulement du cycle ovulatoire.

Naz *et al* ont trouvé des taux plus élevés d'INF $\gamma$  dans le mucus cervical de femmes avec un problème d'immuno-infertilité que dans celui des femmes fertiles (Naz, *et al.*, 1995).

La production de TNF $\alpha$  dans le follicule en développement, en réaction à une infection, provoque l'expression des antigènes de classe I et II du MHC et par cela une perte de tolérance immunitaire. Cela pourrait être à l'origine de dérèglements de l'ovulation ou même d'une insuffisance ovarienne (Hill, 1990). De plus le TNF $\alpha$  peut affecter les cellules de la granulosa et ainsi neutraliser la production de progestérone (Adashi, 1990).

L'IL6 fait partie de l'environnement immunologique ovarien. Elle stimule la production de prostaglandines et peut jouer un rôle dans les accouchements précoces suite à une infection (Buyalos, *et al.*, 1990 ; Gibbs, *et al.*, 1992). Elle est également impliqué dans la spermatogénèse comme l'IL1 (Syed, *et al.*, 1993).

L'étude des cytokines dans le testicule a fait progresser de façon importante les connaissances sur le fonctionnement normal et pathologique du testicule. Ces avancées se traduiront par des progrès décisifs dans la compréhension de l'étiologie et du diagnostic des infertilités masculines.

Dès 1985 des concentrations élevées d'IL1 plasmatique avaient été détectées chez la femme après l'ovulation (Cannon et Dinarello, 1985). L'IL1 est impliquée dans la production de progestérone chez la femme (Halme, *et al.*, 1985) et intervient dans la régulation de la production de testostérone par les cellules de Leydig (Calkins, *et al.*, 1990 ; Calkins, *et al.*, 1988 ; Warren, *et al.*, 1990). De même elle favoriserait la spermatogénèse chez le rat (Syed, *et al.*, 1988), et semblerait activer la méiose ((Parvinen, *et al.*, 1991 ; Pöllänen, *et al.*, 1989)). Plus

spécifiquement, l'IL1 $\beta$  induit la prolifération du trophoblaste mais inhibe la fixation de blastocystes de souris à la fibronectine, *in vitro* (Haimovici, *et al.*, 1991).

L'IFN $\gamma$  a une action comparable à celle du TNF $\alpha$  dans le follicule en développement et peut provoquer une perte de tolérance immunitaire et des dérèglements ovariens (Hill, 1990). A l'inverse de l'IL1 $\beta$ , l'IFN $\gamma$  inhibe le développement du trophoblaste et y provoque des dégénérescences morphologiques (Haimovici, *et al.*, 1991). Chez la souris l'IFN $\gamma$  inhibe la croissance de l'embryon *in vitro* (Hill et Anderson, 1988). Par contre, Austgulen *et al* n'ont observé aucune corrélation entre le taux des cytokines et des récepteurs aux cytokines et la morphologie de l'embryon humain (Austgulen, *et al.*, 1995).

Le GM-CSF inhibe la croissance de l'embryon de souris *in vitro* comme l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  (Hill, *et al.*, 1989) et inhibe la fixation de blastocystes de souris à la fibronectine *in vitro*, comme l'IL1 $\beta$  (Haimovici, *et al.*, 1991).

Le TNF $\alpha$  n'aurait aucune influence sur la sécrétion basale de testostérone mais potentialiserait l'effet inhibiteur de l'IL1 $\beta$ , sur la production de cette hormone stimulée par l'hCG par les cellules de Leydig (Calkins, *et al.*, 1990). A l'inverse, d'autres auteurs mettent en évidence un effet stimulant du TNF $\alpha$  sur la sécrétion de testostérone basale et stimulée par l'hCG par ces cellules (Voss et Robb, 1994).

L'IL2 intervient dans la stéroïdogénèse par les cellules de Leydig (Guo, *et al.*, 1990). Les travaux de El-Demiry n'ont pas pu mettre en

évidence l'anticorps CD25 à la surface de lymphocytes provenant de différentes parties du tractus génital de patients sains (El-Demiry et James, 1988).

L'IL2 est une des cytokines dont l'action sur les spermatozoïdes a été la plus étudiée. Des études ont montré que des concentrations importantes d'IL2, d'BCGF (IL4 et IL5) et du TNF $\alpha$  empêchaient la pénétration de spermatozoïdes humains dans l'ovule de hamster. Il n'y a pas d'influence sur la mobilité des spermatozoïdes avec l'IL2 et BCGF mais seulement une baisse de mobilité des spermatozoïdes en présence de TNF $\alpha$  et du TNF $\alpha$  (Hill, *et al.*, 1989 ; Hill, *et al.*, 1987). Ces mêmes chercheurs ont trouvé que le TNF $\alpha$  inhibait la croissance de l'embryon de souris *in vitro* (Hill et Anderson, 1988). Les travaux d'Eiserman *et al* confirment l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la mobilité spermatique *in vitro* (Eiserman, *et al.*, 1989).

Huleihel *et al* n'ont pas trouvé de différence entre les taux d'IL1, TNF $\alpha$  et IL6 des liquides séminaux d'hommes fertiles et d'hommes stériles (Huleihel, *et al.*, 1996).

Les travaux de Hussenet *et al* n'ont pu démontrer aucune corrélation entre le taux de TNF $\alpha$  et les paramètres du sperme (numération, mobilité et morphologie). Dans les liquides séminaux stériles une corrélation entre les taux de TNF $\alpha$  et de IL2  $\alpha$  a toutefois été mise en évidence. Ils ont trouvé des taux plus faibles d'IL2 dans des liquides séminaux infectés. Dans les spermés non infectés une corrélation a été trouvée entre les taux d'IL2 et de TNF $\alpha$ . Cependant aucune corrélation n'a été démontrée entre le taux de ces cytokines et

les paramètres du spermogramme (numération, mobilité ou pourcentage de spermatozoïdes anormaux) (Hussenet, *et al.*, 1993).

De même Haney *et al* n'ont pu montrer aucune influence du  $TNF\alpha$ , de l' $IFN\gamma$  et de l' $IL1\alpha$  sur la mobilité du sperme humain *in vitro* (Haney, *et al.*, 1992).

Les études menées par Wincek *et al* sont en contradiction avec celles d'Eiserman et de Hill. En effet selon Wincek le  $TNF\alpha$  n'aurait pas d'influence sur la mobilité du sperme, sur la pénétration de spermatozoïdes dans l'ovule de hamster ou sur le développement de l'embryon de souris avant implantation (Wincek, *et al.*, 1991).

Des études ont également été menées pour étudier le rôle des récepteurs à l' $IL2$  dans les phénomènes de reproduction. Miska et Mahmoud ont montré un lien entre le taux d'élastase dans les polynucléaires du liquide séminal et la concentration en  $sIL2r$  d'une part et le taux d'élastase et la mobilité des spermatozoïdes d'autre part (Miska et Mahmoud, 1993).

Shimonovitz *et al* ont montré une élévation du taux de  $sIL2r$  dans le liquide séminal de patients atteints d'asthénospermie par rapport aux patients ayant des spermés normaux ou souffrant du syndrome OAT (Oligo-Asthéno-Téatospermie). Ils ont trouvé aussi la présence de l' $IL1$ , l' $IL6$  et le  $sIL2r$  dans les éjaculats qui présentent une mobilité basse (Shimonovitz, *et al.*, 1994).

D'autres travaux ont montré une corrélation entre les taux d'IL1 $\beta$  et d'IL6 dans le liquide séminal. Le taux de ces deux cytokines n'était pas corrélé à la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes, mais il est plus élevé lors d'une inflammation des glandes accessoires. Par contre le taux de récepteurs solubles (sIL6r) présentait une corrélation positive avec la numération du sperme (Comhaire, *et al.*, 1994).

Liabakk *et al* ont mis en évidence des taux élevés de récepteurs solubles au TNF $\alpha$  dans le liquide séminal. Ces taux sont légèrement plus bas dans les spermatozoïdes pathologiques (Liabakk, *et al.*, 1993).

Buch *et al* rapportent que l'addition de TNF $\alpha$  stimule le taux de peroxydation lipidique des membranes des spermatozoïdes de donneurs fertiles (Buch, *et al.*, 1994). Le taux de peroxydation lipidique des membranes est un reflet de l'augmentation des taux de radicaux libres oxygénés. Ces derniers sont indispensables à un déroulement normal de la capacitation. Cependant un taux trop important de radicaux libres peut être responsable d'une perte de l'intégrité membranaire et d'une disparition des fonctions spermatiques (Aitken, 1995 ; Lamirande et Gagnon, 1995 ; Oehninger, *et al.*, 1995).

Le stress oxydant peut provenir d'une infiltration leucocytaire dans l'éjaculat ou bien de défauts structurels qui pourraient augmenter l'excrétion endogène de radicaux libres oxygénés toxiques. Ce dernier peut impliquer en partie la rétention de l'excès de cytoplasme résiduel durant les phases terminales de la spermiogenèse et l'augmentation de la génération de substrats pour la formation de radicaux libres

oxygénés (Aitken, 1995)). Une telle augmentation du taux des radicaux libres pourrait donc représenter un des mécanismes par lesquels les cytokines altèrent la fertilité masculine.

Nos résultats en cytométrie de flux montrent une différence significative entre les spermatozoïdes marqués avec les anticorps et les témoins (avec l'anticorps secondaire seulement), donc il y a une fixation spécifique des anticorps sur les spermatozoïdes. Nous pouvons donc dire qu'il y a un marquage significatif des récepteurs aux cytokines par les anticorps testés, c'est à dire, anti-récepteurs aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'IL2, à la chaîne  $\alpha$  de l'IL6, à la chaîne  $\beta$  commune de l'IL3, de l'IL5 et du GM-CSF et à la chaîne  $\alpha$  de l'IFN $\gamma$ .

L'étude en microscopie électronique a confirmé ces résultats puisque nous avons trouvé un marquage faible mais bien localisé sur la pièce intermédiaire et la pièce principale du spermatozoïde.

Une étude en microscopie UV a été faite de façon parallèle par Schwed et un marquage sur la pièce intermédiaire a été trouvé, ce qui concorde avec nos résultats en microscopie électronique ; de même, la spécificité des anticorps a été confirmée par électrophorèse et Western-blot (Schwed, communication personnelle).

La pièce intermédiaire apparaît par ailleurs effectivement comme l'endroit le plus approprié pour l'expression des récepteurs et ceci pour deux raisons :

a) A sa sortie du testicule, le spermatozoïde n'est plus capable de synthétiser de l'ARN messager, donc de nouvelles protéines. Or, les

récepteurs qui ont une durée de vie courte, de quelques heures, ne devraient plus se trouver sur le spermatozoïde plusieurs jours après leur formation. Ces récepteurs continuent à être synthétisés dans le seul endroit possédant encore des restes cytoplasmiques et pouvant donc avoir stocké de l'ARN messager, la pièce intermédiaire.

b) Les restes cytoplasmiques contenus dans la pièce intermédiaire contiennent des enzymes responsables de la production de radicaux libres (Aitken, 1995). La fixation de cytokines sur leurs récepteurs devrait déclencher une suite de phénomènes métaboliques entraînant l'activation de ces enzymes et la production des radicaux libres. Afin que le signal puisse être transmis des récepteurs aux enzymes il faut une certaine proximité physique et surtout que ces différents éléments se trouvent dans la même partie du spermatozoïde, la pièce intermédiaire.

Pour les 5 récepteurs, nous n'observons pas de différences significatives entre les données de sperme frais et de sperme lavé ni en cytométrie de flux ni en microscopie électronique. Une possible explication de ce fait pourrait être que le passage dans le gradient de Percoll élimine essentiellement des constituants de la surface de la tête des spermatozoïdes et non de la pièce intermédiaire et de la pièce principale du flagelle ; ces régions sont toujours marquées avant et après Percoll.

Le calcul des coefficients de corrélation (test statistique qui permet de mesurer la relation entre deux paramètres) entre les données du spermogramme et le taux des récepteurs montre une corrélation négative avec la qualité de sperme, c'est à dire qu'il y a un meilleur

marquage dans les échantillons de mauvaise qualité. Ainsi nous retrouvons pour tous les récepteurs sur sperme frais ou lavé, une relation négative avec la numération, la mobilité et la vitalité ; par contre, une relation positive a été trouvée avec le pourcentage de spermatozoïdes de forme anormale et le pourcentage de spermatozoïdes immatures. Il est possible que les spermatozoïdes immatures soient porteurs des récepteurs aux cytokines.

Ces observations sont en concordance avec des études impliquant l'IL2, l'IL5, l'IFN $\gamma$  dans l'inhibition de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule de hamster et l'IFN $\gamma$  dans l'inhibition de la mobilité spermatique (Hill, *et al.* , 1989 ; Hill, *et al.* , 1987). L'action de ces cytokines sur les spermatozoïdes implique la présence de leurs récepteurs.

D'autres travaux sont également en accord avec nos résultats : Ainsi Eiserman confirme l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$  sur la mobilité des spermatozoïdes *in vitro* (Eiserman, *et al.* , 1989), et Shimonovitz observe la présence de l'IL1, l'IL6 et le sIL2r dans les éjaculats avec une faible mobilité (Shimonovitz, *et al.* , 1994).

Par contre, Haney *et al* n'ont pu montrer aucune influence du TNF $\alpha$ , de l'IFN $\gamma$  et de l'IL1 $\alpha$  sur la mobilité du sperme humain *in vitro* (Haney, *et al.* , 1992).

Les études de Comhaire et Hussenet visant entre autres à comparer le taux des cytokines et des récepteurs solubles dans le liquide séminal avec les paramètres du spermogramme n'ont pas

réussi à mettre en évidence de corrélations mais un lien relativement faible entre le taux de récepteurs solubles à l'IL6 et la numération du sperme a été trouvé (Comhaire, *et al.* , 1994 ; Hussenet, *et al.* , 1993),

Comme on peut le constater, les résultats obtenus dans les travaux sur les cytokines sont encore très controversés. D'autres dosages sur des groupes plus importants et mieux sélectionnés seraient utiles pour expliquer ces discordances.



## **6) CONCLUSION**



Les analyses quantitatives réalisées ont permis de comparer le taux des récepteurs avant et après centrifugation sur gradient de Percoll. Ces comparaisons n'ont pas révélé de différences significatives au niveau des récepteurs se situant sur la pièce intermédiaire et la pièce principale du flagelle, le passage en Percoll affectant principalement la tête du spermatozoïde. Cependant, des différences significatives ont été trouvées entre les spermatozoïdes marqués avec les anticorps anti-récepteurs aux cytokines et les groupes témoins (sans anticorps primaire).

Les analyses qualitatives en microscopie électronique ont permis de corroborer les résultats en cytométrie de flux et en plus ils ont permis de reconnaître la localisation précise du marquage.

Nos résultats ont également permis de mettre en évidence une corrélation entre le taux des récepteurs et les paramètres du spermogramme. Il existe une corrélation négative avec la numération, la mobilité et la vitalité, et une corrélation positive avec le nombre de formes anormales et immatures.

Il serait intéressant de comparer les taux d'expression de ces récepteurs dans des spermés normaux de donneurs fertiles et des spermés déficients. Il conviendrait aussi établir le taux d'expression des récepteurs aux cytokines au cours de la réaction acrosomique pour

avoir un panorama plus complet de l'apparition ou disparition des récepteurs.

Pour compléter cette étude, il est important de faire également un marquage avec des anticorps anti-cytokines et comparer les résultats de marquage avec des anticorps anti-récepteurs aux cytokines.

L'originalité de ce travail réside en outre, dans le fait que nous avons mis en évidence l'existence et la localisation précise des récepteurs aux cytokines sur la membrane plasmique du spermatozoïde humain, qui à notre connaissance n'avait jusqu'à présent pas été clairement décrite.

En conclusion, les travaux actuels montrent l'évidence de l'influence des cytokines sur les paramètres spermatiques. Nos résultats se situent dans cette perspective et mettent notamment l'accent sur la corrélation de la présence des récepteurs aux cytokines avec le nombre de spermatozoïdes et leur mobilité, ainsi qu'avec la présence de formes immatures et anormales.

## **IV) BIBLIOGRAPHIE**



1. ADASHI, E. Y. (1990). The potential relevance of cytokines to ovarian physiology : the energizing role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr. Rev.* **11** : 454-464.
  
2. AHLUWALIA, B., FARSHORI, P., JAMUAR, M., BACCETTI, B., ANDERSON, W. A. (1990). Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **22** : 53-62.
  
3. AITKEN, J. (1995). Mechanisms and prevention of lipid peroxidation in human spermatozoa. In *Human Sperm Acrosome Reaction*. Eds. Fénichel, P., J. Parinaud. Paris, INSERM/Jhon Libbey Eurotext Ltd. pp. 339-353.
  
4. AITKEN, J., BUCKINGHAM, D., HARKISS, D. (1994). Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assays of the acrosome reaction and sperm-oocyte fusion. *Hum. Reprod.* **9** : 1867-1874.
  
5. AITKEN, R. J., BRINDLE, J. P. (1993). Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **8** : 1663-1669.

6. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. (1989). Molecular biology of the cell. New York, Garland Publishing, Inc.

7. ANDERSON, R. A., FEATHERGILL, K., ZANEVELD, L. (1991). Evidence for modulation of the human sperm acrosome reaction by G-proteins. J. Androl. **43** : 25-32.

8. AUSTGULEN, R., ARNTZEN, K. J., VATTEN, L. J., KAHN, J., SUNDE, A. (1995). Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor-beta and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during *in vitro* fertilization. Hum. Reprod. **10** : 171-176.

9. BAILY, M. L., GROGAN, W. M. (1986). Protein kinase-mediated activation of temperature-labile and temperature stable cholesteryl ester hydrolases in the rat testis. J. Biol. Chem. **261** : 7717-7722.

10. BAINS, H. K., SEHGAL, S., BAWA, S. R. (1992). Human sperm surface mapping with lectins. Acta Anat. **145** : 207-211.

11. BAKER, T. G. (1982). Oogénesis y Ovulación. In Células germinales y fertilización. Eds. Austin, C. R., R. V. Short. Mexico, La Prensa Médica Mexicana. pp. 15-48.

12. BARRATT, C. L. R., HORNBY, D. P. (1995). Induction of the human acrosome reaction by rhuZP3. In Human Sperm Acrosome Reaction. Eds. Fénichel, P., J. Parinaud. Paris, INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. pp. 105-122.
13. BARRIÈRE, P., HAMAMAH, S., LANSAC, J., LE LANNOU, D., ROYÈRE, D. (1996). Pratique de l'Assistance Médicale à la Procréation. Paris, MASSON.
14. BARTOOV, B., ELTES, F., WEISSENBERG, R., LUNENFELD, B. (1980). Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. Arch. Androl. **5** : 305-322.
15. BEARER, E. L., FRIEND, D. S. (1990). Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation and capacitation. J. Electron Microsc. Tech. **16** : 281-297.
16. BENHAMOU, N. (1989). Preparation and application of lectin-gold complexes. In Colloidal Gold : Principles, Methods and Applications. Ed. Hayat, M. A. San Diego, Academic Press, Inc. pp. 95-143.
17. BENSON, M. C., MAC DOUGAL, D. L., COFFEY, D. S. (1984). The application of perpendicular and forward light scatter to assess nuclear and cellular morphology. Cytometry. **5** : 512-522.
18. BERRUTI, G. (1988). Calpactin-like proteins in human spermatozoa. Exp. Cell Res. **179** : 374-384.

19. BETANCOURT, M., FIERRO, R., AMBRIZ, D. (1993). *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*. **40** : 1155-1160.

20. BRONSON, R., COOPER, G., ROSENFELD, D. (1984). Sperm antibodies : their role in infertility. *Fertil. Steril.* **42** : 171-183.

21. BUCH, J. P., KOLON, T. F., MAULIK, N., KREUTZER, D. L., DAS, D. K. (1994). Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm. *Fertil. Steril.* **62** : 186-188.

22. BURKS, D. J., CARBALLADA, R., MOORE, H. D. M., SALING, P. M. (1995). Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science*. **269** : 83-86.

23. BUYALOS, R., WATSON, J. M., MARTINEZ-MOZA, O. (1990). Detection of interleukin-6 in human follicular fluid. *Annu. Meet. Fertil. Soc.* : 153.

24. CALKINS, J. H., GUO, H., SIEGEL, M. M., LIN, T. (1990). Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances inhibitory effects of interleukin- $1\beta$  on Leydig cell steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166** : 131-138.

25. CALKINS, J. H., SIGEL, M. M., NANKIN, H. R., LIN, T. (1988). Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology*. **123** : 1605-1610.

26. CANNON, J. G., DINARELLO, C. A. (1985). Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation. *Science*. **227** : 1247-1249.
  
27. CAVAILLON, J. M. (1996). Le monde des cytokines. In *Les cytokines*. Ed. Cavaillon, J. M. Paris, MASSON. 2, ed. pp. 1-12.
  
28. CHEN, H. Y., BRINSTER, R. L., MERZ, E. A. (1980). Changes in protein synthesis following fertilization of the mouse ovum. *J. Exp. Zool.* **212** : 355-360.
  
29. COMHAIRE, F., BOSMANS, E., OMBELET, W., PUNJABI, U., SCHOONJANS, F. (1994). Cytokines in semen of normal men and of patients with andrological diseases. *Am. J. Reprod. Immunol.* **31** : 99-103.
  
30. CROSS, N. L., MEIZEL, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* **41** : 635-641.
  
31. CROSS, N. L., OVERSTREET, J. W. (1987). Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* **16** : 23-35.
  
32. CROZET, N. (1991). La fécondation *in vivo* et *in vitro*. In *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Eds. Thibault, C., M. C. Levasseur. Paris, Collection Ellipses INRA. pp. 315-337.

33. CROZET, N. (1994). Réaction acrosomique et fécondation. *Contracept. Fertil. Sex.* **22** : 334-336.
34. CROZET, N., DUMONT, M. (1984). The site of the acrosome réaction during *in vivo* penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res.* **10** : 97-105.
35. CZYBA, J., MONTELLA, A. (1993). *Biologie de la reproduction humaine*. Montpellier, Sauramps medical. 345.
36. D'CRUZ, O. J., HAAS, G. G. (1992). Flow cytometric quantification of the expression of membrane cofactor protein as a marker for the human sperm acrosome reaction. *Fertil. Steril.* **58** : 633-636.
37. D'CRUZ, O. J., HAAS, G. G. J. (1996). Fluorescence-labeled fucolectins are superior markers for flow cytometric quantification of the human sperm acrosome reaction. *Fertil. Steril.* **65** : 843-851.
38. DAMJANOV, I. (1987). Biology of disease : lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* **57** : 5-20.
39. DE ALMEIDA, M. (1989). Anticorps antispermatozoïdes chez l'homme : IAC ou FIV ? In *Stérilité masculine et procréations médicalement assistées*. Eds. Englert, Y., J. F. Guérin, P. Jouannet. Paris, DOIN Editeurs. pp. 101-112.

40. DE ALMEIDA, M. (1991). Procréations médicalement assistés et infertilités immunologiques. *L'Information du Technicien Biologiste*, **4** : 180-183.
41. DE ALMEIDA, M. (1993). Les stérilités masculines d'origine immunologique et leurs traitements. *Rev. Prat.* **43** : 956-959.
42. DE CEREZO, J. M., MARQUINEZ, A. C., SARCHI, M. I., CEREZO, A. S. (1996). Fucosylated glycoconjugates of the human spermatozoon. Comparison of the domains of these glycoconjugates with the alpha-fucosyl binding sites, and with lactosaminic glycoconjugates and beta-D-galactosyl binding site domains. *Biocell.* **20** : 11-20.
43. EISERMAN, J., REGISTER, K. B., STRICKLER, R. C., COLLINS, J. L. (1989). The effect of tumor necrosis factor on human sperm mobility *in vitro*. *J. Androl.* **10** : 270-274.
44. EL-DEMIRY, M., JAMES, K. (1988). Lymphocytes subsets and macrophages in the male genital tract in health and disease. *Eur. Urol.* **14** : 226-235.
45. EMILIOZZI, C., PHILIP, P., CIAPA, B., FÉNICHEL, P. (1995). Protein phosphorylation on tyrosine during human sperm capacitation. In *Human Sperm Acrosome Reaction*. Eds. FénicHEL, P., J. Parinaud. Paris, INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. pp. 392.

46. ENGH, E., CLAUSEN, O. P. F., PURVIS, K. (1991). Acrosomal integrity assessed by flow cytometry in men with variable sperm quality. *Hum. Reprod.* **6** : 1129-1134.

47. EPEL, D. (1978). Le programme de la fécondation. *Pour Sci.* : 34-45.

48. FARLIN, M. E., JASKO, D. J., GRAHAM, J. K., SQUIRES, E. L. (1992). Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **32** : 23-27.

49. FÉNICHEL, P. (1991). Test d'exploration de la fonction acrosomique : application en infertilité masculine. *Contraception, Fertilité Sexualité.* **19** : 811-818.

50. FÉNICHEL, P., DOHR, G., GRIVAUX, C., CERVONI, F., DONZEAU, M., HSI, B. L. (1990). Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **27** : 173-178.

51. FÉNICHEL, P., HSI, B. L., FARAHIFAR, D., DONZEAU, M., BARRIER-DELPECH, D., YEH, C. J. C. (1989). Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *J. Reprod. Fertil.* **87** : 699-706.

52. FIERRO, R., BONILLA, E., CASAS, E., JIMÉNEZ, I., DUCOLOMB, Y., BETANCOURT, M. (1994). Inhibition of pig oocyte *in vitro* fertilization by the action of components of the zona pellucida. *Theriogenology*. **42** : 227-234.
53. FOLIGUET, B., TOUATI, F., CORDONNIER, J. L. (1991). Stratégies des examens biologiques dans l'étude des stérilités masculines. *Feuill. Biol.* **32** : 61-71.
54. FORSTER, M. S., SMITH, W. D., LEE, W. I., BERGER, R. E., KARP, L. E., SCHENCHEVER, M. A. (1983). Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. *Fertil. Steril.* **40** : 655-660.
55. FOURNIER-DELPECH, S., THIBAULT, C. (1991). Acquisition de la fécondance du spermatozoïde : maturation épидидymaire, glandes annexes et capacitation. In *La reproduction chez les mammifères et chez l'homme*. Eds. Thibault, C., M. C. Levasseur. Paris, Collection Ellipses INRA. pp. 251-271.
56. FRASER, R. L. (1989). Sperm capacitation and its modulation. In *Fertilization in mammals*. Eds. Bavister, B. D., J. Cummings, E. R. S. Roldan. Massachusetts, Serono. pp. 141-153.
57. GAHMBERG, C. G., KOTOVUORI, P., TONTTI, E. (1992). Cell surface carbohydrate in cell adhesion. Sperm cells and leukocytes bind to their target cells through specific oligosaccharide ligands. *APMIS*. **100** : 39-52.

58. GHETLER, Y., JAFFE, R., BEN-NUN, I., GRUBER, A., KANETI, H., FEJGIN, M. (1990). Effect of sperm preincubation with follicular fluid on the fertilization rate in human *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* **54** : 944-946.

59. GIBBS, R. S., ROMERO, R., HILLIER, D. L., ESCHENBACH, D. A., SWEET, R. L. (1992). A review of premature birth and subclinical infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166** : 1515-1528.

60. GMACHI, M., SAGAN, S., KETTER, S., KREIL, G. (1993). The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Letts.* **336** : 545-548.

61. GOLDSMITH, M. A., GREENE, W. C. (1994). Interleukin-2 (IL-2). In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 27-30.

62. GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, S. (1980). What should be called a lectin? *Nature.* **285** : 66.

63. GORUS, F. K., PIPELEERS, D. G. (1981). A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil. Steril.* **35** : 662-665.

64. GRAY, P. W. (1994). Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ). In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 118-119.

65. GRIFFITHS, G. (1993). Fine structure immunocytochemistry. Berlin, Springer-Verlag. pp. 307-320.

66. GRIGNON, G. (1996). Histologie. Paris, Ellipses. 366 pp.

67. GUO, H., CALKINS, J. H., SIGEL, M. M., LIN, T. (1990). Interleukin-2 is a potent inhibitor of Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*. **127** : 1234-1239.

68. HAGEGE, R., HAGEGE, J. (1980). La Pratique du Microscope Electronique Conventionnel. Paris, MASSON.

69. HAIMOVICI, F., HILL, J. A., ANDERSON, D. J. (1991). The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events *in vitro*. *Biol. Reprod.* **44** : 69-75.

70. HALME, J., HAMMOND, M., SYROP, C. H., TALBERT, L. M. (1985). Peritoneal macrophages modulate human granulosa-luteal cell progesterone production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61** : 912-916.

71. HANEY, A. F., HUGHES, S. F., WEINBERG, J. P. (1992). The lack of effect of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  on human sperm motility *in vitro*. *J. Androl.* **13** : 249-253.

72. HENLEY, N., BARON, C., ROBERTS, D. (1994). Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa : a new method using a photoactivated supravital stain. *Int. J. Androl.* **17** : 78-84.

73. HERMO, L., OKO, R., MORALES, C. R. (1991). Endocytosis and secretion of proteins in the extratesticular duct system of the adult male rat. *Bull. Assoc. Anat.* **75** : 147-151.

74. HILL, J. A. (1990). Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: A critique of theories and therapy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **22** : 33-42.

75. HILL, J. A. (1991). Implications of cytokines in male and female sterility. In *Cellular and Molecular Biology of the Materno-Fetal Relationship*. Eds. Chaouat, G., J. Mowbray. Paris, INSERM/Jhon Libbey Eurotext Ltd. pp. 123-129.

76. HILL, J. A., ANDERSON, D. J. (1988). The embryo as an immunologic target in infertility and recurrent abortion. In *Perspectives in immunoreproduction: conception and contraception*. Eds. Mathur, C. W., C. W. Fredericks. New York, Hemisphere Pub Corp. pp. 261-267.

77. HILL, J. A., COHEN, J., ANDERSON, D. J. (1989). The effects of lymphokines and monokines on human sperm fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **160** : 1154-1159.

78. HILL, J. A., HAIMOVICI, F., POLITCH, J. A., ANDERSON, D. J. (1987). Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil. Steril.* **47** : 460-465.

79. HILTON, D. J. (1994). An introduction to cytokine receptors. In Guidebook to cytokines and their receptors. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 8-16.

80. HOLDEN, C. A. (1991). Staining of the inner acrosomal membrane of human spermatozoa with concanavalin A lectin as an indicator of potential egg penetration ability. *Fertil. Steril.* **56** : 967-974.

81. HOLDEN, C. A., HYNE, R. V., SATHANANTHAN, A. H., TROUNSON, A. O. (1990). Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol. Reprod. Dev.* **25** : 247-257.

82. HOSHI, K., SASAKI, H., YANAGIDA, K., SATO, A., TSUIKI, A. (1994). Localization of fibronectin on the surface of human spermatozoa and relation to the sperm-egg interaction. *Fertil. Steril.* **61** : 542-547.

83. HUANG, T. T. F., OHZU, E., YANAGIMACHI, R. (1982). Evidence suggesting that L-fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. *Gamete Res.* **5** : 355-361.

84. HULEIHEL, M., LUNENFELD, E., LEVY, A., POTASHNIK, G., GLEZERMAN, M. (1996). Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* **66** : 135-139.

85. HUSSENET, F., DOUSSET, B., CORDONNIER, J. L., JACOB, C., FOLIGUET, B., GRIGNON, G., NABET, P. (1993). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in normal and infected human seminal fluid. *Hum. Reprod.* **8** : 409-411.
86. JOUANNET, P., SERRES, C. (1995). Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. *m/s.* **11** : 555-563.
87. JOUANNET, P. (1989). Intérêts des inséminations artificielles en cas de perturbation de l'éjaculation. In *Stérilité masculine et procréations médicalement assistées*. Eds. Englert, Y., J. F. Guérin, P. Jouannet. Paris, DOIN Editeurs. pp. 73-81.
88. KATZ, D. F., DROBNIS, E. Z., OVERSTREET, J. W. (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.* **22** : 443-469.
89. KISHIMOTO, T., HIBI, M., MURAKAMI, M., NARAZAKI, M., SAITO, M., TAGA, T. (1992). The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Foundation Symposium.* **167** : 5-13.
90. KRAUSZ, C., BONACCORSI, L., LUCONI, M., FUZZI, B., CRISCUOLI, L., PELLEGRINI, S., FORTI, G., BALDI, E. (1995). Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with *in vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* **10** : 120-124.

91. LAMIRANDE, E., GAGNON, C. (1995). Dérivés actifs de l'oxygène et fonctions du spermatozoïde. *m/s.* **11** : 564-570.

92. LANGLAIS, J., KAN, F. W. K., RAYMOND, L., BLEAU, G., ROBERTS, K. D. (1988). Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.* **20** : 185-220.

93. LASSALLE, B., TESTART, J. (1994). Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J. Reprod. Fertil.* **101** : 703-711.

94. LEE, M., DAMJANOV, I. (1985). Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat. Rec.* **212** : 282-287.

95. LIABAKK, N. B., LIEN, E., SUNDAN, A., SUNDE, A., AUSTGULEN, R., ESPEVIK, T. (1993). High concentration of the soluble p55 tumour necrosis factor receptor in human seminal plasma. *Hum. Reprod.* **8** : 1837-1842.

96. LIN, Y., MAHAN, K., LATHROP, W. F., MYLES, D. G., PRIMAKOFF, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* **125** : 1157-1163.

97. MAC COY, J. P. (1987). The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell population. *Cancer Metastasis Rev.* **6** : 595-613.

98. MACEK, M. B., SHUR, B. D. (1988). Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gamete Res.* **20** : 93-109.

99. MANDELBAUM, J., PLACHOT, M., JUNCA, A. M. (1987). Comment apprécier le pouvoir fécondant du sperme avant FIV ? In *La part de l'homme et la part de la femme dans la stérilité du couple.* . Paris, MASSON. pp. 187-198.

100. MAO-CHI, L., DAMJANOV, I. (1985). Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat. Rec.* **212** : 282-287.

101. MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ, J. A., BALLESTA, J., AVILÉS, M., CASTELLS, M. T., MADRID, J. F. (1992). Cytochemical characterization of glycoproteins in the developing acrosome of rats. *Histochemistry.* **97** : 439-449.

102. MEIZEL, S. (1995). Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone. In *Human Sperm Acrosome Reaction.* Eds. Fénichel, P., J. Parinaud. Paris, INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. pp. 151-164.

103. MÉTÉZEAU, P., DELAMARE, G. (1988). Les principes techniques. In *La Cytométrie en Flux.* Eds. Métézeau, P., X. Ronot, G. Le Noan-Merdrignac, M. H. Ratinaud. Paris, MEDSI/McGraw-Hill. pp. 15-29.

104. MEYERS, S. A., OVERSTREET, J. W., LIU, I. K., DROBNIS, E. Z. (1995). Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone induced acrosome reaction in fertile and subfertile males. *J. Androl.* **16** : 47-54.

105. MISKA, W., MAHMOUD, M. (1993). Determination of soluble interleukin-2 receptor in human seminal plasma. *Arch. Androl.* **30** : 23-28.

106. MIYAZAKI, R., FUKUDA, M., TAKEUCHI, S. (1990). Flow cytometry to evaluate acrosome reacted sperm. *Arch. Androl.* **25** : 243-251.

107. MLADENOVIC, I., HAJDUKOVIC, L., GENBACEV, O., CUPERLOVIC, M., MOVSESIJAN, M. (1993). Lectin binding as a biological test *in vitro* for the prediction of functional activity of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **8** : 258-265.

108. MORTIMER, D., CURTIS, E. F., CAMENZID, A. R., TANAKA, S. (1989). The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated *in vitro*. *Hum. Reprod.* **4** : 57-62.

109. MORTIMER, D., CURTIS, E. F., MILLER, R. G. (1987). Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.* **81** : 127-135.

110. NAGAE, T., YANAGIMACHI, R., SRIVASTAVA, P. N., YANAGIMACHI, H. (1986). Acrosome reaction in human sperm. *Fertil. Steril.* **45** : 701-707.

111. NARAZAKI, M., KISHIMOTO, T. (1994a). Interleukin-6 (IL6). In Guidebook to cytokines and their receptors. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 56-58.

112. NARAZAKI, M., KISHIMOTO, T. (1994b). Receptors for interleukin-6 (IL6R). In Guidebook to cytokines and their receptors. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 59-61.

113. NAZ, R. K., BUTLER, A., WITT, B. R., BARAD, D., MENGE, A. C. (1995). Levels of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in sera and cervical mucus of fertile and infertile women: implication in infertility. *J. Reprod. Immunol.* **29** : 105-117.

114. NICOLA, N. A. (1994a). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). In Guidebook to cytokines and their receptors. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 171-173.

115. NICOLA, N. A. (1994b). An introduction to the cytokines. In Guidebook to cytokines and their receptors. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 1-7.

116. O'RAND, M. G. (1979). Changes in sperm surface properties correlated with capacitation. In *The spermatozoon : maturation, motility, surface properties and comparative aspects.* Eds. Fawcett, D. W., J. M. Bedford. Baltimore, Urban and Schwarzenberg. pp. 195-204.

117. OCHS, D., WOLF, D. P., OCHS, R. L. (1986). Intermediate filament proteins in human sperm heads. *Exp. Cell Res.* **167** : 495-504.

118. OEHNINGER, S., BLACKMORE, P., MAHONY, M., HODGEN, G. (1995). Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* **12** : 41-47.

119. OGOROCHI, T., MIYAJIMA, A. (1994). Receptors for interleukin-3 (IL-3R). In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 40-44.

120. ORD, T., PATRIZIO, P., MARELLO, E., BALMACEDA, J. P., ASCH, R. H. (1990). Mini-percoll : a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum. Reprod.* **5** : 987-989.

121. PARINAUD, J., LABAL, B., VIEITEZ, G., RICHOILLEY, G., GRANDJEAN, H. (1993). Comparison between fluorescent peanut agglutinin lectin and GB24 antibody techniques for the assessment of acrosomal status. *Hum. Reprod.* **8** : 1685-1688.

122. PARKKILA, S., RAJANIEMI, H., KELLOKUMPU, S. (1993). Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biol. Reprod.* **49** : 326-331.

123. PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J. L., FIRSTN, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin : inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* **41** : 683-699.

124. PARVINEN, M., SÖDER, O., RITZEN, E. M. (1991). Interleukin-1 regulates DNA synthesis during spermatogenesis. Proceeding of the 11 North American Testis Workshop. **9** : 34.

125. PHILLIPS, D. M., SHALGI, R. M. (1980). Surface properties of the zona pellucida. *J. Exp. Zool.* **213** : 1-8.

126. PLACHOT, M. (1988). La fécondation : du niveau cellulaire au niveau moléculaire. *Contracept. Fertil. Sex.* **16** : 749-756.

127. PLACHOT, M., JUNCA, A. M., MANDELBAUM, J., COHEN, J., SALAT-BAROUX, J., DA LAGE, C. (1986). Timing of *in vitro* fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed human oocytes. *Hum. Reprod.* **1** : 237-242.

128. PÖLLANEN, P., SÖDER, O., PARVINEN, M. (1989). Interleukin 1 $\alpha$  stimulation of spermatogonial proliferation *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* **1** : 85-87.

129. PRIMAKOFF, P., HYATT, H., MYLES, D. G. (1985). A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* **101** : 2239-2244.

130. RAVID, A., SAGIV, M., BARTOOV, B., ELTES, F., NOVOGRODRODSKI, A., ALLALOUF, D., LEVINSKY, H., SINGER, R. (1990). Separation of sub-populations of sperm with higher fertility potential from normal and pathological semen by PNA. *Andrologia.* **22** : 225-260.

131. RIEDY, M. C., MUIRHEAD, K. A., JENSEN, C. P., STEWART, C. C. (1991). Use a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell population. *Cytometry*. **12** : 133-139.

132. ROBLERO, L., GUADARAMA, A., ORTIZ, M. E., FERNANDEZ, E.-H., F (1988). High potassium concentration improves the rate of acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* **49** : 676-680.

133. RUFO, G. A., SCHOFF, P. K., BABCOCK, D. F., LARDY, H. A. (1982). Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* **257** : 4627-4632.

134. RUIZ-ARGÜELLES, A. (1992). Flox cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Ann. Biol. Clin.* **50** : 735-743.

135. RUNNEBAUM, I. B., SCHILL, W. B., TOPFER-PETERSEN, E. (1995). Con-A binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia.* **27** : 81-90.

136. SALING, P. M., BURKS, D. J., CARBALLADA, M. R., DOWDS, C. A., LEYTON, L., MCLESKEY, S. B., ROBINSON, A., TOMES, C. N. (1995). Sperm interaction with the zona pellucida : the role of ZRK. In *Human Sperm Acrosome Reaction*. Eds. Fénichel, P., J. Parinaud. Paris, INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. pp. 85-104.

137. SALING, P. M., STOREY, B. T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization *in vitro*. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse acrosome reaction. *J. Cell Biol.* **83** : 544-555.

138. SANDERSON, C. J. (1994). Interleukin-5 (IL-5). In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 49-52.

139. SCHOYSMAN, R., BERTIN, G., VAN DER ZWALMEN, P., SEGAL, L. (1989). Utilisation du sperme épидидymaire dans un programme de fécondation *in vitro*. In *Stérilité masculine et procréations médicalement assistées*. Eds. Englert, Y., J. F. Guérin, P. Jouannet. Paris, DOIN Editeurs. pp. 137-145.

140. SCHRADER, J. W. (1994). Interleukin-3 (IL-3). In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 38-40.

141. SCHREIBER, R. D., AGUET, M. (1994). The interferon  $\gamma$  receptor. In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 120-123.

142. SCHULTZ, G. A., GIFFORD, D. J., MAHADEVAN, M. M., FLEETHAM, J. A., TAYLOR, P. J. (1988). Protein synthetic patterns in immature and mature human oocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **541** : 237-247.

143. SERRES, C., FENEUX, D., BERTHON, B. (1991). Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **18** : 228-240.

144. SHARON, N., HALINA, L. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* **268** : 82-89.

145. SHIMONOVITZ, S., BARAK, V., ZACUT, D., EVER-HADANI, P., BEN-CHETRIT, A., RON, M. (1994). High concentration of soluble interleukin-2 receptors in ejaculate with low sperm motility. *Hum. Reprod.* **9** : 653-655.

146. SINGER, S. L., LAMBERT, H., CROSS, N. L., OVERSTREET, Z. (1985). Alteration of the human sperm surface during *in vitro* capacitation as assessed by lectin-induced agglutination. *Gamete Res.* **12** : 291-299.

147. SUAREZ, S. S., KATZ, D. F., OWEN, D. H., ANDREW, J. B., POWELL, R. L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* **44** : 375-381.

148. SYED, V., GERARD, N., KAIPIA, A., BARDIN, C. W., PARVINEN, M., JEGOU, B. (1993). Identification, ontogeny and regulation of an interleukin 6 like factor in the rat testis. *Endocrinology.* **132** : 293-299.

149. SYED, V., SODER, O., ARVER, S., LINDH, M., KAHN, S., RITZEN, E. M. (1988). Ontogeny and cellular origin of an interleukin 1 like factor in the reproductive tract of the male rat. *Int. J. Androl.* **11** : 437-448.

150. TAKAMUNE, K. (1987). Detection of acrosome-reacted toad sperm based on specific lectin binding to the inner acrosomal membrane. *Gamete Res.* **18** : 215-223.

151. TALBOT, P., CHACON, R. (1981). A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* **215** : 201-211.

152. TANPHAICHITR, N., MILLETTE, C. F., AGULNICK, A., FITZGERALD, L. M. (1988). Egg-penetration ability and structural properties of human sperm prepared by Percoll-gradient centrifugation. *Gamete Res.* **20** : 67-81.

153. TAO, J., CRITSER, E. S., CRITSER, J. K. (1993). Evaluation of mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **36** : 183-194.

154. TASH, J. S., MEANS, A. R. (1983). Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* **28** : 75-104.

155. TAVERNIER, J. (1994). The interleukin 5 receptor. In *Guidebook to cytokines and their receptors.* Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 52-56.

156. TESARIK, J., TESTART, J., NOMÉ, F. (1990). Effects of prolonged administration of anti-cumulus oophorus antibody on reproduction in mice. *J. Reprod. Fertil.* **90** : 605-610.

157. TOPFER-PETERSEN, E., JANUSCHKE, E., SCHMOECKEL, C., SCHILL, W. B. (1984). Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. *Andrologia.* **16** : 539-547.

158. VASQUEZ, J. M., MAGARGEE, S. F., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R. H. (1990). Lectins and heparin-binding features of human spermatozoa as analyzed by flow cytometry. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163** : 2006-2012.

159. VILLARROYA, S., SCHOLLER, R. (1987). Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and the induction of acrosome reaction *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **80** : 545-562.

160. VIRTANEN, I., BADLEY, R. A., PASSIVUO, R., LEHTO, V. P. (1984). Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell Biol.* **99** : 1083-1091.

161. VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G. D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G. S. (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein phosphorylation. *Development.* **121** : 1129-1137.

162. VISCONTI, P. E., MOORE, G. D., BAILEY, J. L., PAN, D., LECLERC, P., CONNORS, S. A., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G. S. (1995b). Capacitation in mouse spermatozoa. II. Capacitation and protein tyrosine phosphorylation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. **121** : 1139-1150.

163. VOSS, S. D., ROBB, R. J. (1994). The interleukin 2 receptor. In *Guidebook to cytokines and their receptors*. Ed. Nicola, N. A. Oxford, Oxford University Press. pp. 27-37.

164. WARREN, D. W., PASUPULETI, V., LU, Y., PLATER, B. W., HORTON, R. (1990). Tumor necrosis factor and interleukin 1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells *in vitro*. *J. Androl.* **11** : 353-360.

165. WASSARMAN, P. M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science*. **235** : 553-560.

166. WHITE, D. R., AITKEN, R. J. (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated mobility. *Gamete Res.* **22** : 163-177.

167. WINCEK, T. J., MEYER, T. K., MEYER, M. R., KUEHL, T. J. (1991). Absence of a direct effect of recombinant Tumor Necrosis Factor-alpha on human sperm function and murine preimplantation development. *Fertil. Steril.* **56** : 332-339.

Nom : FIERRO-PASTRANA

Prénom : Reyna-Carmen

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 14 AVR 1997 UHP 017/97

Le Président de l'Université



**NOM et Prénom :** FIERRO-PASTRANA Reyna-Carmen

**SUJET DE LA THÈSE :** Étude de l'architecture moléculaire de la membrane plasmique et des membranes acrosomiques du spermatozoïde humain. Leurs modifications au cours des phénomènes de capacitation et de la réaction acrosomique.

**THÈSE :** Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

**MOTS-CLES :** Réaction acrosomique, spermatozoïde humain, microscopie électronique, cytométrie de flux, lectines, GB24, iodure de propidium

**RÉSUMÉ :** Ce travail a été mené en utilisant la technique de cytofluorométrie et la technique de microscopie électronique. La première partie met en évidence la localisation des résidus N-Acétyleglucosamine au niveau de la membrane plasmique, galactose au niveau de la membrane externe de l'acrosome, et mannose et fucose au niveau de la membrane interne de l'acrosome. On a mis au point une technique de triple marquage en utilisant simultanément trois fluorochromes différents (iodure de propidium, GB24 et lectine). Ces résultats ouvrent une orientation vers des applications pratiques pour l'exploration des qualités fonctionnelles du sperme dans le cadre des études des hypofertilités et des indications cliniques des techniques d'assistance médicale à la procréation.

La deuxième partie du travail aborde l'étude de l'influence des cytokines sur la fécondance du sperme. Les résultats montrent qu'il existe chez l'homme des corrélations entre la fixation de certaines cytokines sur les spermatozoïdes et des altérations du spermogramme (nombre, mobilité et formes immatures des spermatozoïdes). Les données obtenues permettent une meilleure connaissance des relations cytokine-spermatozoïde et d'envisager des applications à l'exploration de la fécondance du sperme et de ses mécanismes.