



HAL
open science

Le rôle des phospholipases A2 sécrétées dans la fertilité: action sur la réaction acrosomique des spermatozoïdes humains

Julien Bessonnat

► To cite this version:

Julien Bessonnat. Le rôle des phospholipases A2 sécrétées dans la fertilité: action sur la réaction acrosomique des spermatozoïdes humains. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01213928

HAL Id: dumas-01213928

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01213928>

Submitted on 9 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.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/juridique/droit-auteur>

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

Année : 2015

N°

**LE RÔLE DES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES DANS LA
FERTILITE : ACTION SUR LA REACTION ACROSOMIQUE DES
SPERMATOZOÏDES HUMAINS**

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT

Julien BESSONNAT

Né(e) le 20/04/1986 à Loudéac (22)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Le 05/10/2015

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. le Professeur MORAND Patrice

Membres : Mme le Professeur HENNEBICQ Sylviane

M. le Professeur MOSSUZ Pascal

M. le Docteur ARNOULT Christophe

M. le Docteur TERRIER Nicolas

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
PU-PH	BETTEGA Georges	Chirurgie maxillo-faciale, stomatologie
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
MCU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie

PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
MCU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETAÑTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GODFRAIND Catherine	Anatomie et cytologie pathologiques (type clinique)
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation

Mise à jour le 14 novembre 2014

PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
PU-PH	LANTUEJOUL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU-PH	LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé

Mise à jour le 14 novembre 2014

MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophthalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury

Au Pr MORAND qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens doublement à le remercier car, en tant que responsable du DES de Biologie Médicale, il a toujours su se montrer disponible et à l'écoute.

Je remercie également le Pr MOSSUZ d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr Sylviane HENNEBICQ pour m'avoir permis de réaliser ce projet ainsi que pour son soutien tout au long de mon parcours depuis mon arrivée jusqu'à la fin de mon internat en passant par l'année-recherche et, je l'espère, pour quelques années de plus. Je tiens à la remercier pour l'encadrement très formateur qu'elle m'apporte depuis que je suis arrivé au sein du laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS du CHU de Grenoble.

Mes remerciements vont aussi au Docteur ARNOULT pour son aide et ses conseils apportés lors de ce projet. Je le remercie d'avoir accepté d'intégrer ce jury de thèse.

Au Dr TERRIER pour sa participation à ce jury de thèse, pour son actuelle et je l'espère future et longue collaboration.

A tous ceux qui m'ont accompagné durant mon internat

Au Dr BERGUES qui m'a accueilli au sein de son UF et qui a donné beaucoup de sa personne pour me permettre de poursuivre mon aventure grenobloise.

Aux Dr THOMAS-CADI et BROUILLET pour leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur tout au long de ces trois années au sein du laboratoire.

Un grand merci tout particulièrement à Guillaume et Roland pour le temps qu'ils ont su m'accorder pour me permettre de mener à bien ce projet. Je leur souhaite la plus grande réussite qu'ils méritent dans la poursuite de leur parcours et leurs travaux.

Au Dr LAMBEAU, de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR6097 de l'Université Nice-Sophia Antipolis qui a fourni les sPLA2 pour permettre la réalisation de ce projet.

Un grand merci à JP et Kévin pour leur participation à ce projet. Je leur souhaite à tous deux la réussite dans la poursuite de leurs études.

Merci à Bernadette, Claudine, Emilie, Hono, JB, Lynda, Magalie, Martine, Mylène, Nath, Pierre, Solange et toutes mes collègues gynécologues, endocrinologues et sages-femmes. Les trois ans passés en leur compagnie furent un réel plaisir.

Merci à Alice, Céline, Elise, Pauline, Piou-Piou, Santo, Youki et je pense pouvoir ajouter Alex à cette liste. Une belle amitié est née de cet internat et j'espère qu'elle durera bien après la fin de notre cursus.

Et tous les anciens,

A mes amis de Bretagne, de Paris et tous les autres délocalisés. Je leur promets de redevenir plus assidu pour donner de mes nouvelles. Une pensée toute particulière pour Cyril avec qui j'ai débuté l'aventure médicale en 2004.

A ma famille, je ne saurais exprimer à quel point je la remercie pour son soutien, sa gentillesse et son affection. A mes parents et ma sœur que je regrette de ne pouvoir voir aussi souvent que je le voudrais.

A ma belle-famille pour son accueil des plus chaleureux (même mes belles-sœurs...) dans son cercle.

Enfin je terminerai bien sûr par cette jeune et belle Bretonne qui a eu la cette idée folle de traverser la France pour me rejoindre. Merci à toi Marion pour cette belle histoire qui dure depuis maintenant 5 ans...

Table des matières

TABLE DES ABREVIATIONS.....	9
AVANT-PROPOS.....	11
CHAPITRE 1. FECONDATION.....	13
I. LES GAMETES.....	13
A. Le spermatozoïde.....	13
B. L'ovocyte.....	16
II. LA CAPACITATION.....	17
A. Elimination des inhibiteurs.....	17
B. Traversée des voies génitales féminines.....	18
1. Déstabilisation de la membrane et efflux de cholestérol.....	18
2. Hyperactivation.....	20
C. Le réservoir spermatique.....	25
III. LA REACTION ACROSOMIQUE.....	27
A. Induction de la réaction acrosomique.....	28
B. Les protéines de fusion des membranes.....	30
C. Mécanistique moléculaire de fusion membranaire.....	32
D. Signalisation calcique biphasique.....	33
E. Rôle des acides gras et lysophospholipides.....	35
F. La réaction acrosomique précoce.....	36
IV. INTERACTION GAMETIQUE.....	37
A. Fusion gamétique.....	37
B. Activation de l'ovocyte.....	40
C. Blocage de la polyspermie.....	41
CHAPITRE 2. LES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES.....	42
I. CLASSIFICATION DES PHOSPHOLIPASES.....	42
II. LES sPLA2 SONT IMPLIQUEES DANS DE NOMBREUSES FONCTIONS.....	44
A. Immunité et réaction inflammatoire.....	44
B. Maladies cardiovasculaires.....	45
C. Régulation du métabolisme.....	45
D. Physiopathologie neuronale.....	46
E. Homéostasie cutanée.....	46
F. Oreille interne.....	47
G. Données chez l'Homme.....	47
III. sPLA2 ET FERTILITE.....	48
A. Des enzymes présentes dans le tractus génital mâle.....	48
B. Activité PLA2 et réaction acrosomique.....	49
C. Principales sPLA2 impliquées dans la physiologie spermatique.....	52

CHAPITRE 3. OBESITE, DYSLIPIDEMIE ET INFERTILITE MASCULINE.....	54
I. IMPACT DU SURPOIDS SUR LA FERTILITE MASCULINE.....	54
A. Effet sur les chances de grossesse	54
B. Effet sur les paramètres spermatiques	55
C. Obésité et réaction acrosomique	55
II. ANOMALIES LIPIDIQUES ET FERTILITE.....	55
A. Anomalies lipidiques et paramètres spermatiques.....	55
B. Anomalies lipidiques et réaction acrosomique	56
III. LES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	57
A. Perturbations hormonales	57
B. Stress oxydatif	57
C. Contenu lipidique des spermatozoïdes et du liquide séminal	57
D. Modifications épigénétiques.....	58
OBJECTIFS	59
MATERIEL ET METHODE.....	61
I. RECRUTEMENT DES PATIENTS.....	61
II. PRODUCTION DES sPLA2	61
III. EVALUATION DES PARAMETRES SPERMATIQUES.....	62
IV. CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES	62
V. EVALUATION DE LA REACTION ACROSOMIQUE.....	64
VI. EVALUATION DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE (TUNEL)	65
VII. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	66
RESULTATS.....	67
I. PATIENTS	67
II. Evaluation de la réaction acrosomique.....	69
A. Effet des phospholipases sur réaction acrosomique.....	69
B. Effet de la mGX H48Q.....	70
C. Comparaison de 3 milieux de capacitation	71
D. Paramètres spermatiques, type d'infertilité et induction de la RA par les sPLA2.	72
E. Obésité, dyslipidémie et induction de la RA par les sPLA2	75
DISCUSSION	76
I. ECHANTILLON PATIENTS	76
II. REACTION ACROSOMIQUE	77
III. CARACTERISATION DES PATIENTS AYANT DES SPERMATOZOÏDES SENSIBLES AUX sPLA2.....	79
CONCLUSION	82
BIBLIOGRAPHIE.....	84

TABLE DES ABREVIATIONS

α SNAP : alpha-soluble NSF attachment protein

ABM : agence de la biomédecine

ADN : acide désoxyribonucléique

AKAP : A-kinase anchor proteins

AMP : assistance médicale à la procréation

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique

ATP : adénosine tri-phosphate

BSA : Bovine serum albumin

CATSPER : cation channel of sperm

CRB : centre de ressources biologiques

DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

DAG : diacyl-glycérol

FSH : Follicle stimulating hormone

FITC : Fluorescein-5-isothiocyanate

GP : globule polaire

HDL(c) : High density lipoprotein (cholesterol)

hGV : phospholipase A2 sécrétée humaine de groupe V

hGX : phospholipase A2 sécrétée humaine de groupe X

ICSI : intra-cytoplasmic sperm injection (fécondation *in vitro* avec micro-injection)

IP3 : inositol tri-phosphate

IMC : Indice de masse corporelle

KO : knock-out (gène invalidé)

LDL(c) : Low density lipoprotein (cholesterol)

LH : Luteinizing hormone

LIFE : Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment

mGX : phospholipase A2 sécrétée murine de groupe X

mGX H48Q : phospholipase A2 sécrétée murine de groupe X mutée (dépourvue d'activité catalytique)

NSF : N-ethylmaleimide sensitive factor

OATS : oligo-astheno-térato-spermie

OEC : cellules épithéliales de l'oviducte

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline

PIP2 : phosphatidyl-inositol 4,5 bi-phosphate

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLA/ PLB/ PLC/ PLD : phospholipase A/ -B/ -C/ -D

PLC : phospholipase C

PSA : Pisum sativum agglutinin

PUFAs : acides gras polyinsaturés

RA : réaction acrosomique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SPM : Sperm Preparation Medium®

SOC : Store operated channel

TRPM8 : Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8

TUNEL : Transferase Uridyl Nick End Labeling

TMS : test de migration-survie

SNAP-25 : synaptosomal-associated protein 25

SNAREs : Soluble NSF attachment protein receptor

sPLA2-x : phospholipases A2 sécrétées du groupe x

SRB1 : Scavenger receptor class B type 1

TESE : Testicular sperm extraction

UDP : uridyl di-phosphate

ZP : Zone pellucide

ZP1/ZP2/ZP3/ZP4 : Zona pellucida sperm-binding protein 1/ -2/ -3/ -4

AVANT-PROPOS

On estime qu'environ 1 couple sur 6 consulte, à un moment de sa vie procréative, pour une question d'infertilité. Les données de l'année 2013 de l'Agence de la Biomédecine montrent qu'en France 2,9% des naissances sont obtenues par Aide Médicale à la Procréation (AMP). Ce recours fréquent est lié d'une part à l'augmentation de l'âge des femmes à la première grossesse et d'autre part à une baisse générale de la fertilité humaine. S'il est complexe d'évaluer l'évolution de la fertilité des couples et de la femme, le déclin des paramètres spermatiques depuis 50 ans a quant à lui été clairement décrit (1,2).

Cette diminution de la fertilité masculine entraîne un recours de plus en plus fréquent à une AMP de type ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection), seule méthode utilisable dans les oligo-astheno-tératospermies (OATS) sévères. Lors de cette technique, les spermatozoïdes sont préparés à l'aide d'un gradient de densité discontinu, constitué d'un milieu dense (PureSperm® par exemple) qui mime la traversée de la glaire cervicale et d'un milieu dit « capacitant » riche en albumine, calcium et bicarbonate (Sperm Preparation Medium® par exemple). Le choix des spermatozoïdes à injecter lors de l'ICSI repose ensuite sur des critères liés à la densité des cellules (par le gradient de densité discontinu), à leur mobilité et à leur aspect morphologique (sélection au microscope à fort grossissement).

Deux inconvénients découlent de cette méthode : premièrement la sélection est peu affinée et potentiellement subjective (mobilité et morphologie) ; deuxièmement, la préparation des spermatozoïdes avant la technique néglige des étapes préalables cruciales à l'interaction gamétique : la capacitation et la réaction acrosomique (RA). Ces étapes sont subies par les spermatozoïdes lors de leur passage dans le tractus génital féminin et au voisinage de l'ovocyte. Seule la fécondation *in vitro* conventionnelle respecte cette maturation préalable à la fécondation.

Les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2) sont des enzymes présentes dans le tractus génital masculin et hydrolysent les phospholipides. L'action des sPLA2 sur ces lipides, en particulier les phospholipides membranaires des spermatozoïdes, est fondamentale tant au plan structural que dans la signalisation cellulaire. Plusieurs équipes ont montré l'impact de

ces enzymes sur la capacitation, la réaction acrosomique, la fécondation ou encore le développement embryonnaire précoce (3–7). L'équipe du Dr Arnoult a notamment montré, chez la souris, la présence dans l'acrosome du spermatozoïde de la phospholipase A2 sécrétée du groupe X (4). Leurs données montrent le rôle majeur de cette enzyme dans ces étapes cruciales de la fécondation (4,5).

Chez l'Homme, l'origine de l'infertilité des couples qui consultent pour une Aide Médicale à la Procréation reste inexpliquée dans 10 à 15% des cas. L'étude de ces phospholipases pourrait expliquer l'origine de l'infertilité de certains patients. De plus, l'utilisation de ces enzymes dans la préparation et la sélection des spermatozoïdes avant une fécondation *in vitro*, conventionnelle ou avec micro-injection (ICSI), permettrait de prendre en considération les modifications lipidiques se déroulant *in vivo* préalablement à la fécondation. Le respect de ces étapes, à ce jour négligées, dans les techniques d'AMP pourrait alors améliorer les performances des techniques d'AMP (à ce jour, environ 25-30% de grossesses par ponction en France).

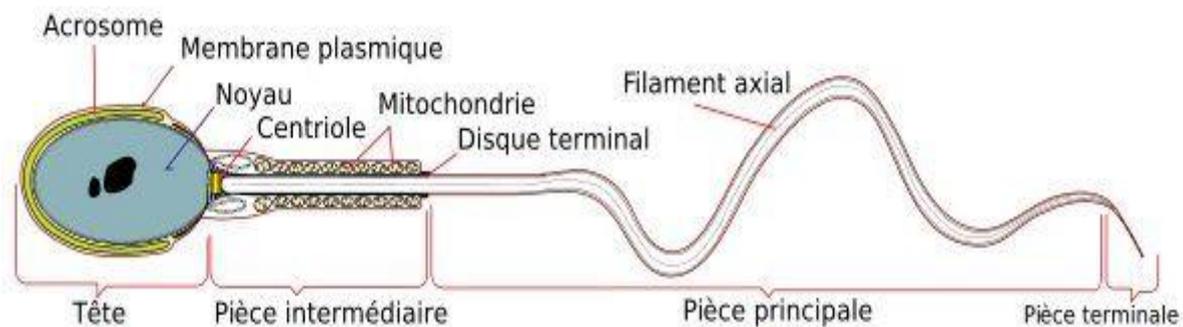
CHAPITRE 1. FECONDATION

I. LES GAMETES

A. Le spermatozoïde

Le gamète mâle est une cellule mobile constituée de 4 segments distincts (*Figure 1*) :

Figure 1 : Représentation schématique du spermatozoïde



- la tête (5µm sur 3µm environ)

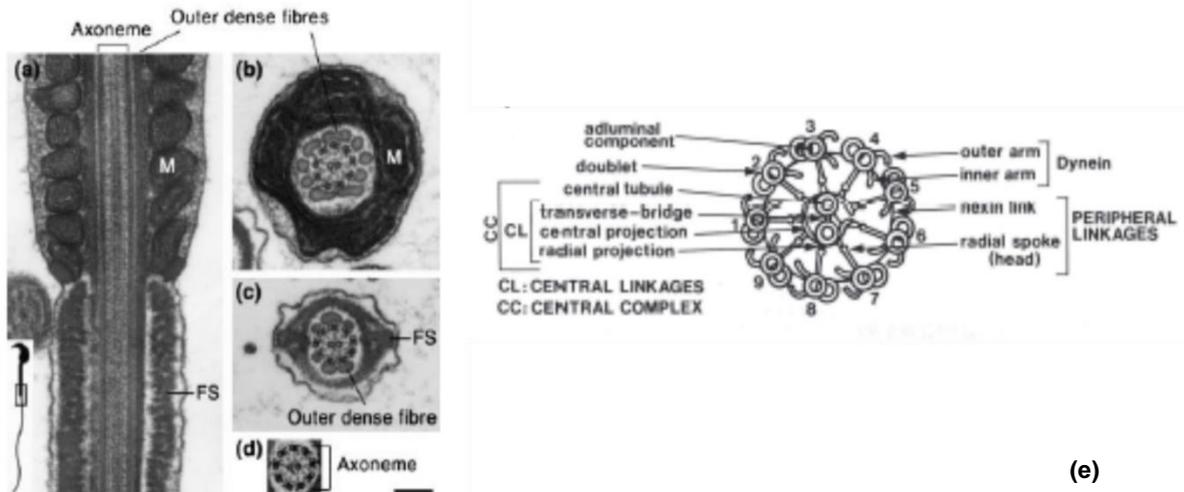
Constituée de 2 éléments principaux : tout d'abord un noyau haploïde, contenant une chromatine compactée grâce aux protamines liées à l'ADN. Lors de la dernière phase de la spermatogénèse (la spermiogénèse) les histones sont successivement remplacées par des protéines de transition puis par ces protamines, de petites protéines riches en ponts disulfures permettant une forte compaction de la chromatine, un des rares moyens de protection de la chromatine du spermatozoïde. Le deuxième élément important de la tête est l'acrosome : une grande vésicule située au-dessus du noyau et dérivant de l'appareil de Golgi. Elle est riche en enzymes protéolytiques et glycolytiques (hyaluronidase, acrosine, neuraminidase, etc) qui sont libérées par exocytose, lors de la réaction acrosomique (RA). A la base de la tête se trouve le centriole proximal qui se dédouble lors de la fécondation pour former le premier fuseau mitotique et le centriole distal, point de départ dans la formation de l'axonème du flagelle.

- la pièce intermédiaire (6 à 10µm de long environ) :

Un manchon mitochondrial engaine l'axonème, pilier central du flagelle du spermatozoïde. Cet axonème est une structure constituée de microtubules organisés sur un modèle 9+2 (8) : 9 doublets de microtubules (1 microtubule A dit « complet » associé à un microtubule B « incomplet ») reliés entre eux par des ponts de nexine et disposés autour d'un doublet central (2 microtubules complets) auxquels ils sont liés par des ponts radiaires (par convention, les doublets périphériques ont été numérotés dans le sens horaire, le doublet 1 étant situé perpendiculairement à l'axe formé par le doublet central) (*Figure 2*). Le mouvement du flagelle est permis grâce aux bras de dynéine (pouvant lier un microtubule A au microtubule B du doublet voisin) et à la gaine de mitochondrie apportant l'ATP nécessaire. Grâce à l'énergie apportée et cette architecture, les bras de dynéine assurent le glissement (par attachement-détachement) des doublets entre eux, ce qui crée une courbure qui se propage le long du flagelle. Cette onde change de plan lors de sa propagation entraînant une rotation de la tête à 180°C. Ce battement flagellaire et cette rotation permettent la progression du spermatozoïde.

Entre les mitochondries et les microtubules, se trouvent les fibres denses, en regard de chaque microtubule. La limite entre la pièce intermédiaire et la pièce principale est marquée par l'annulus (anneau fibreux dense).

Figure 2 : Organisation du flagelle visualisée en microscopie électronique



a) coupe longitudinale (M : mitochondries) ; b) coupe transversale de la pièce intermédiaire ; c) coupe transversale de la pièce principale (FS : gaine fibreuse) ; d) visualisation de l'axonème seul (Ho et Suarez 2001)

e) Schéma de l'organisation des microtubules en « 9+2 » et sa numérotation (Serres et al. 1983)

- La pièce principale (45µm environ) :

Elle est située dans le prolongement de la pièce intermédiaire, avec la même organisation de l'axonème qui est entouré d'une gaine fibreuse. Cette gaine est constituée de piliers latéraux fibreux reliés entre eux par des stries fibreuses circonférentielles. Cette gaine fibreuse est également importante pour la mobilité du spermatozoïde en fournissant de l'ATP (tout comme la gaine de mitochondries) et pour sa participation dans plusieurs voies de signalisation (9,10) avec notamment la présence du récepteur CATSPER (cf II.B.2 hyperactivation).

Les fibres denses sont présentes jusqu'aux 2/3 du flagelle. La disparition de ces fibres denses signe le début du dernier segment du spermatozoïde.

- la pièce terminale :

L'élément principal de ce segment est la queue de l'axonème dont les doublets s'achèvent dans un ordre précis : 3 et 8 puis 4-2-7 et 5-6-9-1 (8).

B. L'ovocyte

Après ovulation, l'ovocyte est une grande cellule (120µm environ) bloquée en métaphase de la deuxième division de méiose et riche en mitochondries qui fourniront le stock mitochondrial du futur embryon. La première division de méiose, lors de l'ovogénèse, a abouti à la formation du premier globule polaire (GP) qui contient la moitié du capital chromosomique. Ce GP reste dans l'espace péri-vitellin (entre l'ovocyte et la zone pellucide).

La membrane plasmique de l'ovocyte présente de nombreuses microvillosités sur sa surface. Des granules corticaux sont situés sous cette membrane. La libération de leur contenu après activation de l'ovocyte, lors de la fécondation, assure le blocage de la polyspermie : la pénétration de plusieurs spermatozoïdes dans l'ovocyte (cf IV.CHAPITRE 1.C). Autour de cet ovocyte, on décrit (*Figure 3*):

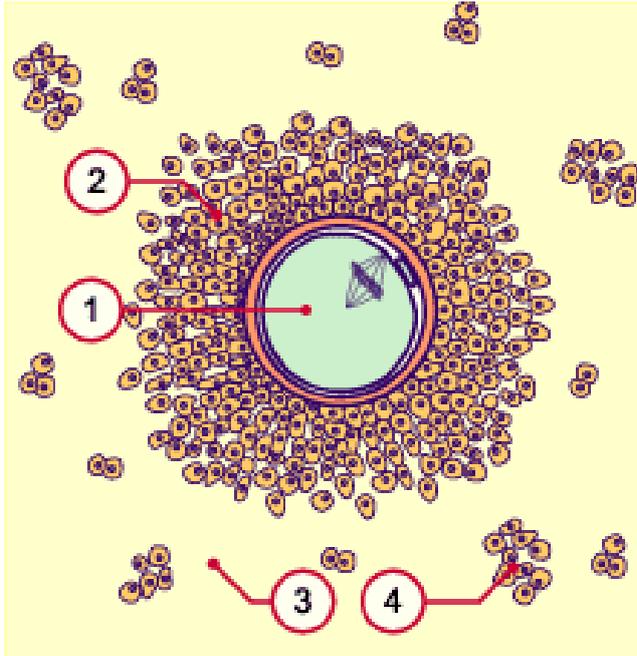
- **la Zone Pellucide (ZP)** :

Elle entoure l'ovocyte et mesure environ 10-20µm d'épaisseur. Elle est constituée de chaînes de glycoprotéines ZP2-ZP3-ZP4 reliées entre elles par la ZP1. Cette couche glycoprotéique permet, par les sucres qu'elle porte, une liaison spécifique d'espèce avec le spermatozoïde. Cette liaison est à l'origine du déclenchement de la réaction acrosomique du spermatozoïde (cf III.A).

- **le cumulus oophorus** :

Il est constitué de cellules folliculaires dont une partie est entraînée avec l'ovocyte après l'ovulation. Ces cellules sont maintenues dans une matrice d'acide hyaluronique et possèdent des prolongements cytoplasmiques qui traversent la ZP pour dialoguer et échanger avec l'ovocyte. Ces prolongements se rétractent lors de l'ovulation.

Figure 3 : Schéma d'un ovocyte ovulé et du cumulus oophorus



1. Ovocyte 2 bloqué en métaphase 2 (visualisation du fuseau mitotique)
2. Cellules du cumulus oophorus
3. Liquide folliculaire et matrice d'acide hyaluronique
4. Cellules du cumulus en amas isolés

II. LA CAPACITATION

Il a été démontré que les spermatozoïdes éjaculés étaient incapables de féconder un ovocyte sans capacitation préalable (11). Cette capacitation est l'ensemble des modifications biochimiques et structurales, se déroulant dans le tractus féminin et permettant aux spermatozoïdes d'acquérir leur pouvoir fécondant. Schématiquement, elle est permise, d'une part, par l'élimination de facteurs inhibiteurs contenus dans le plasma séminal et, d'autre part, par l'action de facteurs capacitants sécrétés par les voies génitales féminines. Cette capacitation est réversible (via des facteurs décapacitants) et ne s'opère pas sur toute la population de spermatozoïdes au même moment (12).

A. Elimination des inhibiteurs

Lors du rapport sexuel, après éjaculation, le sperme est déposé dans le vagin. Les spermatozoïdes sont maintenus dans un coagulum formé par le liquide séminal. Ce plasma

séminal est constitué des sécrétions des différentes glandes de l'appareil génital masculin (les principales étant les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper).

Après liquéfaction de l'éjaculat dans le vagin, les spermatozoïdes pénètrent dans le mucus du col utérin et sont alors débarrassés de nombreux facteurs décapacitants contenus dans le plasma séminal ou fixés sur les spermatozoïdes (13). En période ovulatoire, les mailles de la glaire cervicale sont relâchées, ce qui permet aux spermatozoïdes de traverser le col utérin.

B. Traversée des voies génitales féminines

Après passage du col utérin, les spermatozoïdes vont entrer en contact avec les sécrétions utérines. Au contact de ces sécrétions, plusieurs phénomènes vont se succéder pour permettre des modifications de la membrane spermatique et l'activation de voies de signalisation aboutissant à une modification des caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes appelée « hyperactivation ». Le point de départ de cette hyperactivation est une déstabilisation de la membrane associée à une diminution du ratio cholestérol/phospholipides (11).

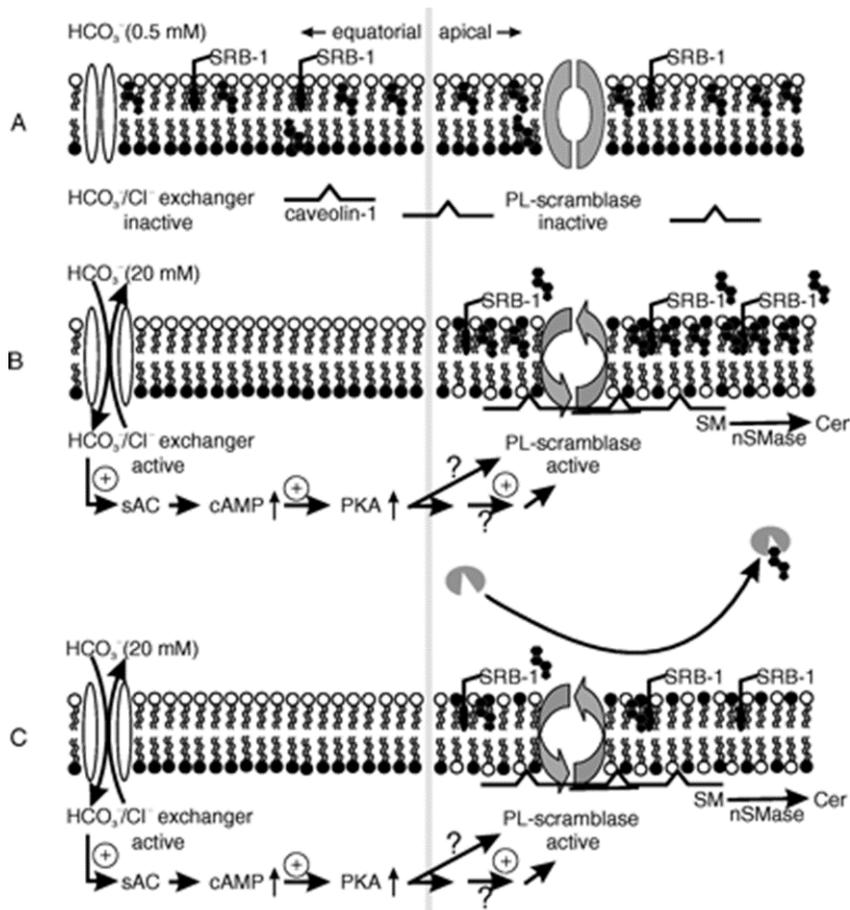
1. Déstabilisation de la membrane et efflux de cholestérol

La membrane du spermatozoïde non capacité est asymétrique (*Figure 4A*), les phosphatidylcholines sont retrouvées majoritairement dans le feuillet externe de la membrane plasmique et les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines sont retrouvées majoritairement dans le feuillet interne (14).

Lors de la capacitation, une entrée de bicarbonate va stimuler l'adénylate cyclase puis la protéine kinase A via l'AMPc (15). Cette cascade stimule une kinase qui phosphoryle des protéines intracellulaires telles que la scramblase. Cette enzyme est située au niveau apical de la tête du spermatozoïde et induit une symétrisation de la membrane (*Figure 4B*) : la répartition membranaire des lipides est alors rééquilibrée entre les feuillets interne et externe (14).

Dans le même temps, le cholestérol avec l'aide du SRB1 (Scavenger Recepteur B1) va être relocalisé au niveau apical (*Figure 4B*). La scramblase va ensuite l'externaliser pour qu'il soit efflué grâce aux sécrétions utérines contenant des protéines « accepteurs de cholestérol » (l'albumine étant une des plus importantes) (11) (*Figure 4C*).

Figure 4 : Déstabilisation de la membrane et efflux de cholestérol



(A) Le canal HCO_3^- et la scramblase sont inactifs, la membrane est riche en cholestérol et asymétrique dans sa répartition en glycérophospholipides (PL) ; **(B)** Le canal est ouvert, il y a activation de l'adénylate cyclase (sAC), formation d'AMPc, activation de la Protéine Kinase A (PKA) et donc de la scramblase. Celle-ci va rendre symétrique la répartition en PL entre feuillets interne et externe. **(C)** Dans le même temps, les SRB-1 (Scavenger Recepteur B1) et les protéines « accepteurs de cholestérol » vont entraîner l'efflux de celui-ci (Flesch et al 2001).

L'efflux de cholestérol et la déstabilisation de la membrane se déroulent en parallèle et concourent à l'augmentation de la fluidité membranaire (16), en particulier au niveau apical de

la tête du spermatozoïde (siège de la scramblase). Les molécules membranaires peuvent alors être mobilisées entraînant ainsi :

- l'apparition de zones membranaires fusiogènes, les points de fusion entre la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome, préalable nécessaire à la réaction acrosomique (14) ;

- la modification des récepteurs membranaires, permettant la fusion entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte (16).

- la modification de l'activité des canaux et échangeurs calciques ayant pour conséquences une modification des concentrations ioniques intracellulaires, une augmentation du pH interne (HCO_3^-) et une hyperpolarisation de la membrane plasmique (influx de Cl^- et efflux de K^+) (17).

2. Hyperactivation

a) *Voie de la Protéine Kinase A*

L'augmentation de la perméabilité membranaire aux ions va entraîner une augmentation d' HCO_3^- et de Ca^{2+} intracellulaires. Ces ions vont activer l'adénylate cyclase pour produire de l'AMPc (15). Ceci permet l'activation de la Protéine Kinase A qui elle-même va déclencher une cascade de phosphorylations. Dans le même temps l'activité des phosphatases diminue. Ceci aboutit à la phosphorylation de protéines sur des résidus sérine et thréonine ainsi que des tyrosine kinases qui à leur tour phosphorylent des résidus tyrosine (15). Ces diverses phosphorylations s'effectuent sur de multiples cibles protéiques afin de les activer : canaux ioniques, stockage du calcium, fibres denses du flagelle, microtubules, enzymes du métabolisme énergétique, etc.

b) *Voie des MAP Kinases*

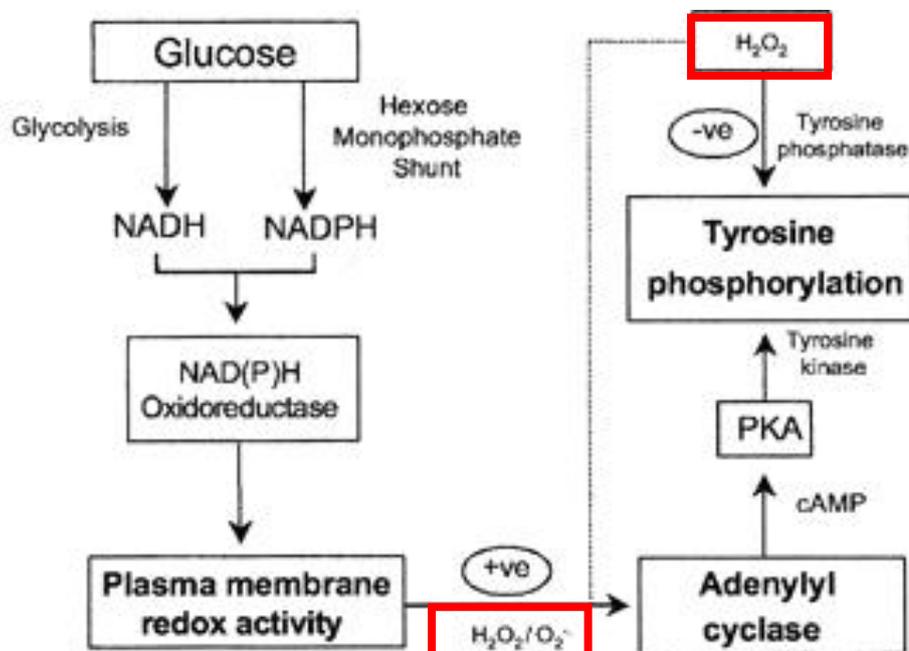
Cette voie de signalisation est une cascade de phosphorylations (comprenant une MAPKKK, une MAPKK et une MAPK) aboutissant à la phosphorylation de résidus sérine et thréonine de différentes protéines-cibles (18). Parmi les différentes voies des MAPKs, la plus

étudiée est celle de ERK1/2 qui répond à divers facteurs extra-cellulaires (facteurs de croissance et hormones) pouvant agir via des récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs tyrosine kinases ou des canaux ioniques. Le signal est relayé par un complexe liant la Guanidine (Ras) qui, par sa phosphorylation, passera de Ras-GDP à Ras-GTP (activation) puis transmet le signal à la MAPKKK (Raf). La cascade de phosphorylation aboutira à l'activation d'ERK ½ (MAPK) (19).

c) Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

Les autres acteurs dans ces voies de signalisation sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; En effet, il a été démontré que celles-ci modulent l'activité des différentes enzymes impliquées. Baker et Aitken ont proposé un modèle décrivant la participation des ROS dans la phosphorylation des résidus tyrosine par stimulation de l'adénylate cyclase et l'inhibition des phosphatases (20) (Figure 5).

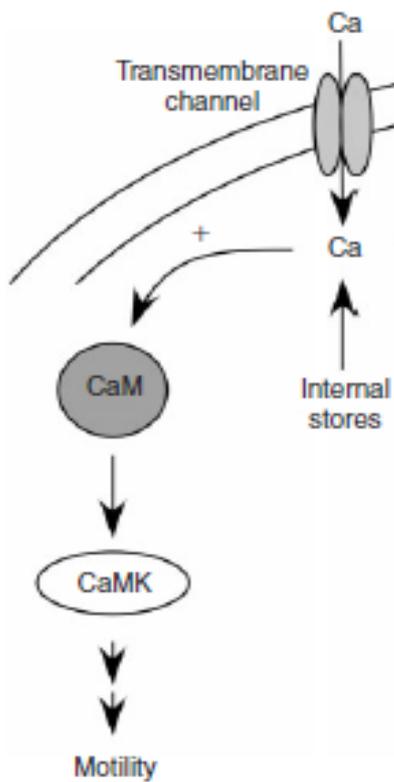
Figure 5 : implication des ROS dans la phosphorylation des résidus Tyrosine (Aitken et Baker 2004).



d) Voie de la Calmoduline

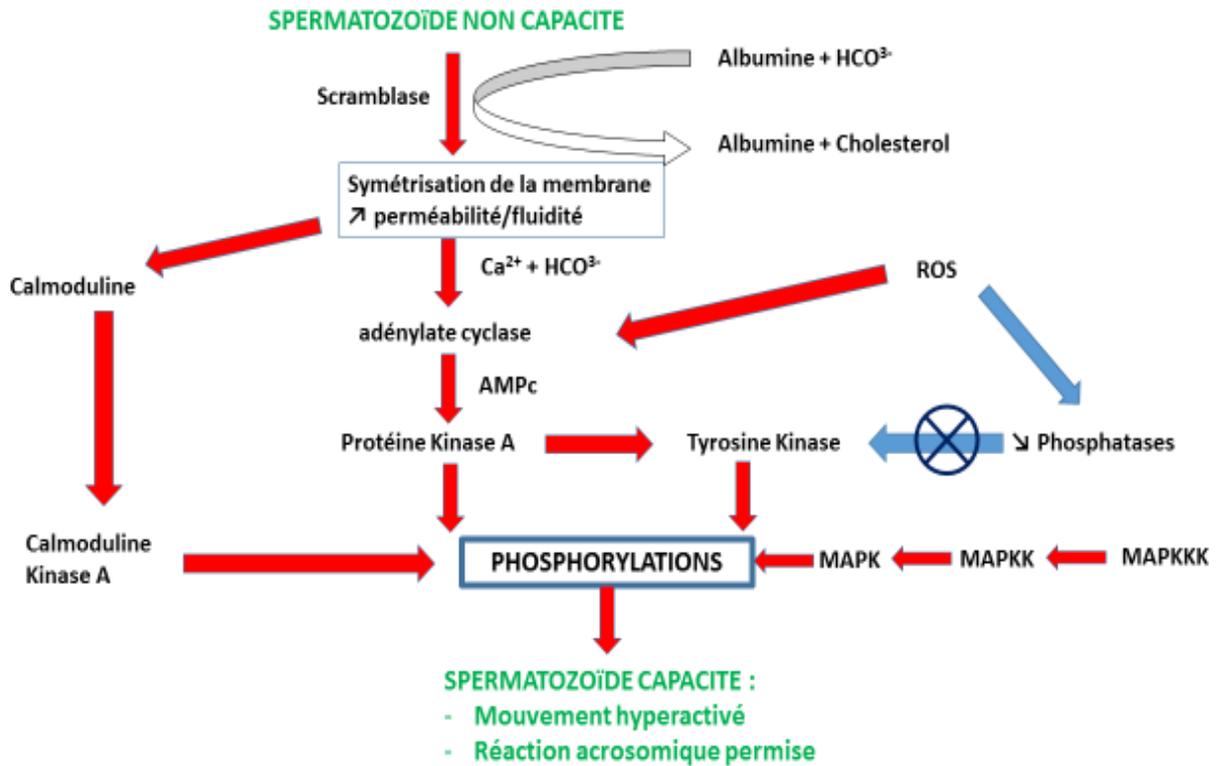
La dernière voie importante est celle de la calmoduline (21). Cette protéine située au niveau de l'axonème est capable de lier le calcium, induisant un changement dans sa conformation. Un complexe calcium-calmoduline-bras de dynéine va alors se former, activant la Calmodulin kinase A qui va à son tour phosphoryler les bras de dynéine (*Figure 6*).

Figure 6 : Voie de la calmoduline (Turner 2006)



Les principales voies dans la capacitation et l'acquisition du mouvement hyperactif sont schématisées dans la *Figure 7*.

Figure 7 : Signalisation de la capacitation

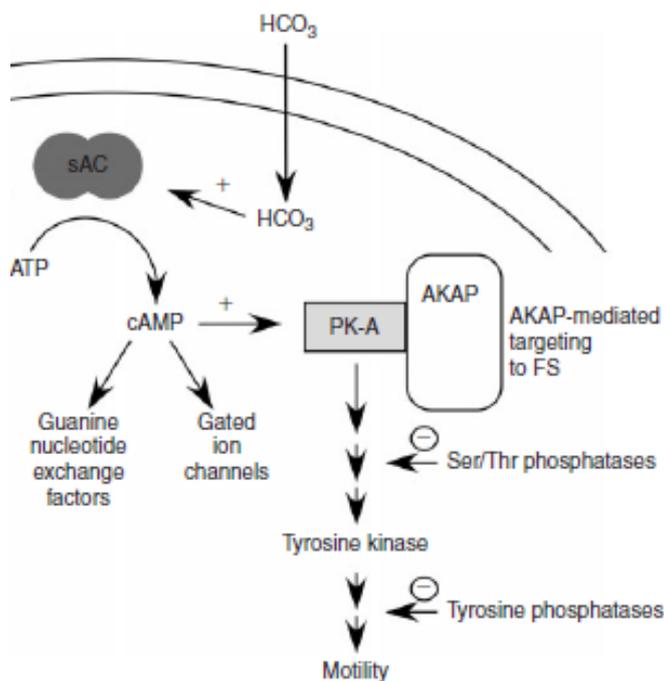


Participation de la voie de l'adénylate cyclase, des ROS, des MAPK et de la calmoduline pour induire de multiples phosphorylations

Activation → Inhibition → Levée d'inhibition ⊗

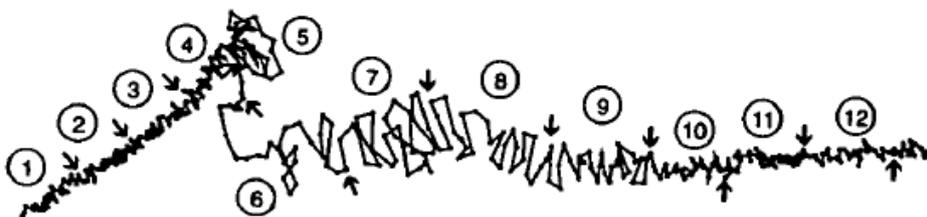
La phosphorylation de protéines du flagelle entraîne une hyperactivation du spermatozoïde : une modification de son mouvement par augmentation de la fréquence et de l'amplitude de battement du flagelle du spermatozoïde (22). Pour réguler la phosphorylation des protéines impliquées dans le mouvement des spermatozoïdes, le rôle de la famille AKAP (A kinase anchor proteins) est crucial. En effet ces protéines, ancrées dans la gaine fibreuse, vont assurer le recrutement/libération de la protéine kinase A qui vient d'être activée lors de la capacitation (23) (Figure 8).

Figure 8 : Régulation de la Protéine Kinase A par les protéines AKAP (Turner 2006)



Si le spermatozoïde présentait un mouvement rectiligne dans l'éjaculat et la glaire cervicale, la capacitation va entrainer l'acquisition d'un mouvement méandrique ou curvilinéaire (Figure 9). Ce mouvement hyperactivé, permet au spermatozoïde de passer entre les cellules du cumulus oophorus et ainsi d'atteindre l'ovocyte.

Figure 9 : Modification du mouvement lors de la capacitation



La trajectoire est divisée en différents segments de 1 à 12, les flèches représentent la séparation entre ces différents segments. Le mouvement hyperactivé est représenté entre les segments 5 à 9 (Mortimer 1995).

a) *Le canal CATSPER*

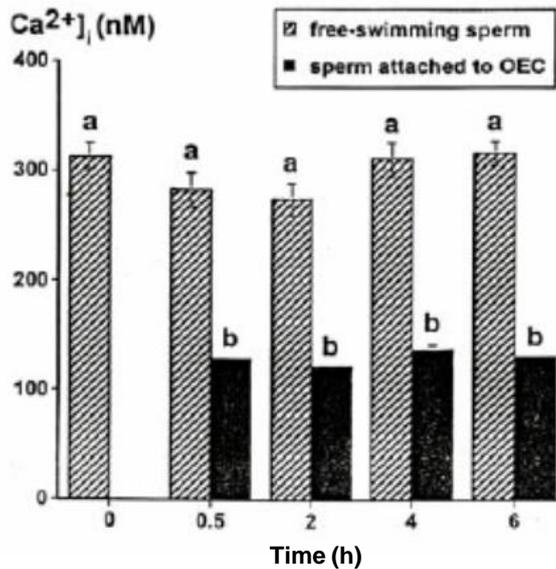
Chez l'Homme, le canal calcique CATSPER a été décrit comme le principal canal calcique impliqué dans l'hyperactivation du spermatozoïde. Il s'agit d'un canal multimérique, voltage et pH dépendant : les variations des concentrations ioniques lors de la capacitation (notamment l' HCO_3^-) font donc faire varier son activité. Il s'agit également d'un canal dont l'activité est modulée par la progestérone (récepteur non nucléaire). En effet, la liaison de la progestérone à ce canal amplifie l'entrée du Ca^{2+} facilitant ainsi l'hyperactivation (24). Ceci explique l'implication de la progestérone dans le chimiotactisme exercé par le cumulus oophorus (produisant la progestérone) sur le spermatozoïde.

C. *Le réservoir spermatique*

Tous les spermatozoïdes ayant traversé le col utérin n'arrivent pas en une vague uniforme au niveau de l'ovocyte. En effet, des interactions entre des sucres de l'épithélium utérin et des récepteurs membranaires spermatiques permettent de retenir une partie de ces spermatozoïdes et d'inhiber temporairement leur capacitation. Ce réservoir spermatique est schématiquement localisé à deux niveaux : le col utérin et l'isthme tubaire.

Les interactions avec l'épithélium utérin permettent de maintenir le calcium intracellulaire bas (25) (*Figure 10*) et donc un faible niveau de phosphorylation des protéines (26). Ce phénomène augmente la durée de vie des spermatozoïdes (la durée de vie du spermatozoïde capacité étant plus courte) et d'augmenter la fenêtre de fécondabilité (vagues de spermatozoïdes capacités relâchés dans le 1/3 externe de la trompe).

Figure 10 : Effet des cellules épithéliales de l'oviducte (OEC) sur la concentration en Ca^{2+}



La concentration en Ca^{2+} est nettement plus importante dans les spermatozoïdes déposés dans le milieu capacitant que dans les spermatozoïdes co-cultivés avec des OEC. Cette diminution de la concentration en Ca^{2+} permet d'inhiber la capacitation (Dobrinski et al. 1996).

Divers signaux lèvent cette inhibition de la capacitation :

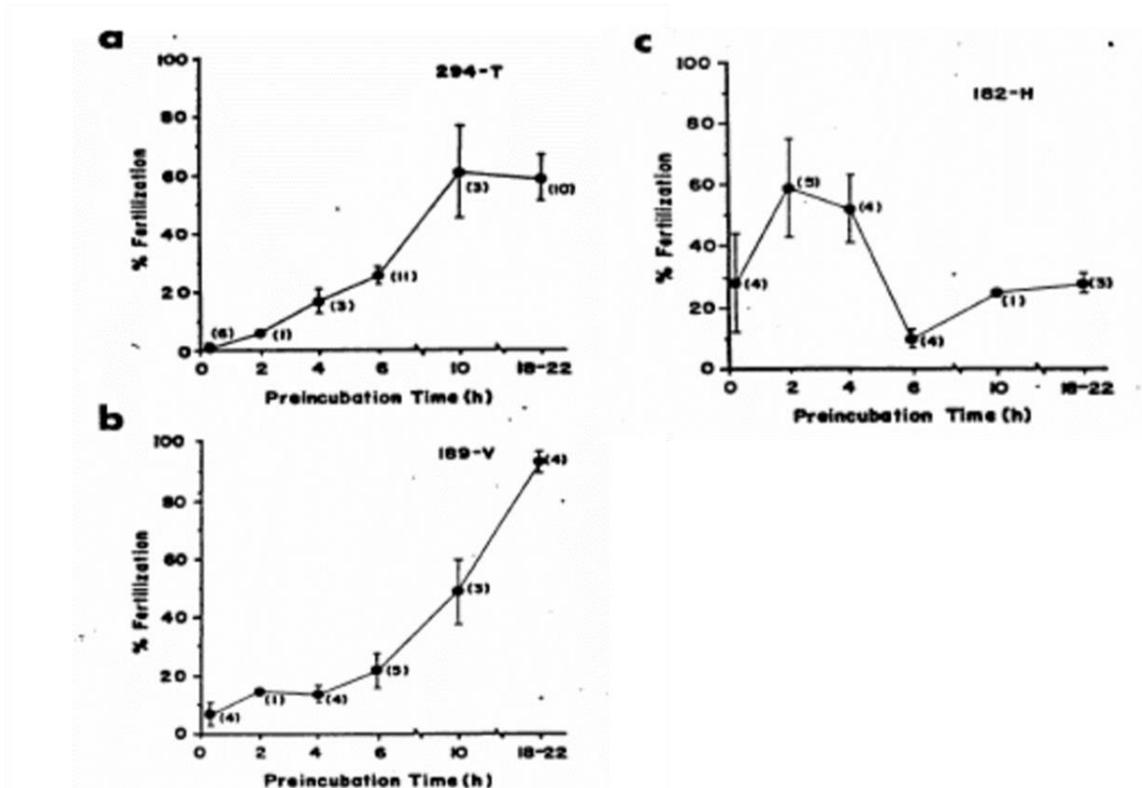
- le chimiotactisme : la progestérone hyperactive le spermatozoïde par sa liaison au canal calcique CATSPER (24);

- le thermotactisme : il a été montré que les spermatozoïdes humains ou de cochon sont capables de répondre à des changements de températures de l'ordre de $0,5^{\circ}C$ par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Un gradient de température entre l'isthme de la trompe et l'ampoule a d'ailleurs été décrit chez le lapin ($+2^{\circ}C$) ou le cochon ($+0,7^{\circ}C$) (27). Ce mécanisme est médiée par le canal calcique TRPM8 (28);

- les glycoconjugués sulfatés (héparine) facilitent la libération des spermatozoïdes (29).

A cette notion de réservoir spermatique s'ajoute également le fait qu'il existe plusieurs sous-populations de spermatozoïdes dans un même éjaculat, répondant à la capacitation à des temps différents (12) (Figure 11).

Figure 11 : L'acquisition du pouvoir fécondant varie entre différentes sous-populations de spermatozoïdes

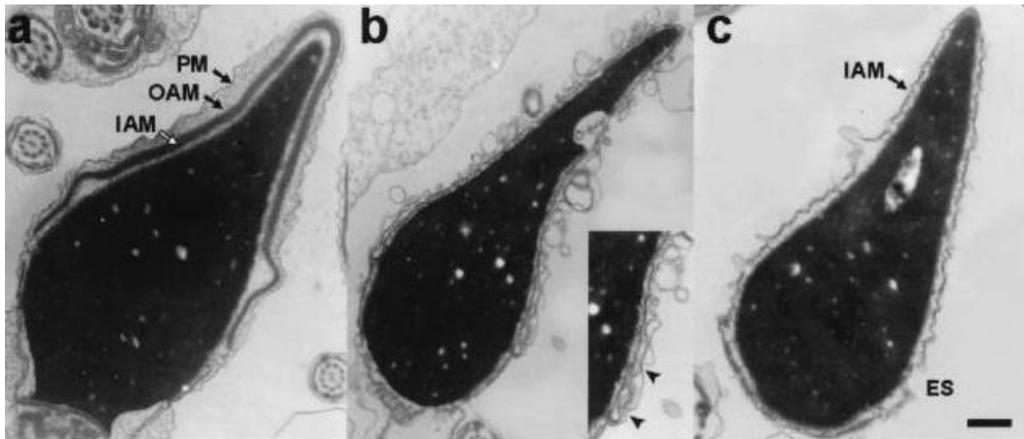


Les 3 figures (chaque figure représentant l'éjaculat d'un individu) montrent le pourcentage de fécondation d'une population d'ovocyte en fonction du temps d'incubation des spermatozoïdes : on observe des variations inter-individuelles et surtout intra-individuelles (sous-populations de spermatozoïdes acquérant leur pouvoir fécondant à différents temps d'incubation) (Perreault et Rogers 1982).

III. LA REACTION ACROSOMIQUE

La réaction acrosomique (RA) est l'exocytose de l'acrosome, cette grande vacuole située au sommet de la tête du spermatozoïde. La membrane plasmique du spermatozoïde fusionne avec la membrane acrosomique externe pour former transitoirement des vésicules hybrides (30) qui se détachent du spermatozoïde, entraînant ainsi la libération du contenu de l'acrosome (Figure 12). Celui-ci contient de nombreuses protéases (31) dont la libération permettra au spermatozoïde d'atteindre l'ovocyte (traversée du cumulus oophorus et de la zone pellucide).

Figure 12 : Réaction acrosomique visualisée en microscopie électronique



a) spermatozoïde humain intact (PM : membrane plasmique ; OAM : membrane acrosomique externe ; IAM : membrane acrosomique interne). b) Réaction acrosomique en cours, formation de vésicules hybrides à partir des membranes plasmique et acrosomique externe. c) Réaction acrosomique réalisée, externalisation de la membrane acrosomique interne (Michaut et al 2000)

Contrairement à la capacitation, il s'agit d'un phénomène irréversible, sa régulation est donc primordiale afin d'éviter une RA trop précoce qui empêcherait les spermatozoïdes d'atteindre l'ovocyte. La signalisation biphasique (double entrée de calcium), ainsi que l'hyperpolarisation de la membrane secondaire à la capacitation, évitent une RA prématurée.

A l'inverse, lorsque le spermatozoïde se trouve dans l'espace péri-vitellin, il doit avoir effectué sa réaction acrosomique car les récepteurs liant l'ovocyte se trouvent au niveau de la membrane acrosomique interne. La réaction acrosomique va donc dévoiler ces protéines de liaison à l'ovocyte et permettre ainsi la fusion gamétique.

A. Induction de la réaction acrosomique

Le schéma classique de la RA est décrit lorsque le spermatozoïde lie la zone pellucide de l'ovocyte. En effet, le spermatozoïde, au voisinage de la zone pellucide, lie ZP3-ZP4 (32) par une interaction dépendante de résidus sucrés (33). Ces résidus sucrés sont à l'origine de la reconnaissance ovocyte-spermatozoïde spécifique d'espèce. Cette liaison constitue la liaison primaire du spermatozoïde à l'ovocyte et déclenche la RA du spermatozoïde

(spermatozoïdes « réagis »). Les spermatozoïdes réagis pourront alors lier la ZP2, ce qui constitue la liaison secondaire.

Les enzymes libérées lors de la RA hydrolysent la ZP1. Cela permet de libérer les chaînes ZP2-ZP3 et donc de diminuer la résistance de la zone pellucide à sa traversée par le spermatozoïde puis de pénétrer dans l'espace péri-vitellin.

Si le ligand ovocytaire semble bien identifié, le récepteur spermatique reste quant à lui à définir. Sont cités ci-dessous, différents candidats étudiés (33) :

- **La β -galactosyltransférase** : protéine retrouvée à la surface du spermatozoïde de souris. Elle est capable de lier des résidus N-acétylglucosamine de ZP3 et d'induire la RA chez la souris. Si le modèle knock-out (KO) de la souris a montré une diminution de la RA ZP3-dépendante, il n'a cependant pas abouti à une infertilité.

- **L' α -D-mannosidase** : retrouvée dans la membrane des spermatozoïdes humains ou de rats, elle lie les résidus mannose de la ZP. La **Sperm Autoantigenic Proteine 17** (SPA17) serait également capable de lier ces résidus mannose lui conférant un rôle dans la liaison à la ZP. SPA17 pourrait aussi être impliquée dans la capacitation par son interaction avec les AKAP.

- **La famille des métalloprotéases ADAMs** : avec un rôle majeur d'ADAM3 dans la liaison à la ZP. Les KO de ADAM1a et -2 restent fertiles mais montrent une nette diminution de liaison à la ZP (partenaires potentiels d'ADAM3).

- **Enzyme de conversion de l'angiotensine** (isoforme testis-spécifique). Le KO est infertile par modification de la distribution d'ADAM3 à la surface du spermatozoïde.

- **Fucosyltransférase 5** : localisée au niveau de la région acrosomique, son masquage par anticorps inhibe la liaison à la ZP.

- **La zonoadhésine**: elle participerait à la spécificité d'espèce de la liaison spermatozoïde-ZP (les spermatozoïdes KO pour le gène de la zonoadhésine étant capables de lier la ZP d'ovocytes d'espèces non-homologues)

D'autres candidats ont également été étudiés avec des KO ou des anticorps (33,34) :

SP56, Zona Receptor Kinase, Arylsulfatase A, Calsperrin, Fertilization antigen 1, Milk

fat globule-EGF factor 8, les **Sulfogalactosylglycerolipides**,... Les modèles ainsi créés ne sont, cependant, pas tous infertiles et tous ces récepteurs ne sont pas décrits dans toutes les espèces.

Au final, Il semble clair que le/les récepteur(s) spermatique(s) impliqué(s) varie(nt) d'une espèce à l'autre et il est probable que divers systèmes coexistent au sein d'une même espèce.

B. Les protéines de fusion des membranes

La réaction acrosomique constitue une fusion entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique. Les protéines SNARE assurent la reconnaissance et le rapprochement de ces deux membranes (35). Ces protéines ont été initialement décrites dans les vésicules synaptiques dont l'exocytose entraîne la libération des neuromédiateurs au niveau de la synapse (36).

Au niveau des membranes acrosomique et plasmique du spermatozoïde, quatre protéines majeures sont décrites (*Figure 13*) :

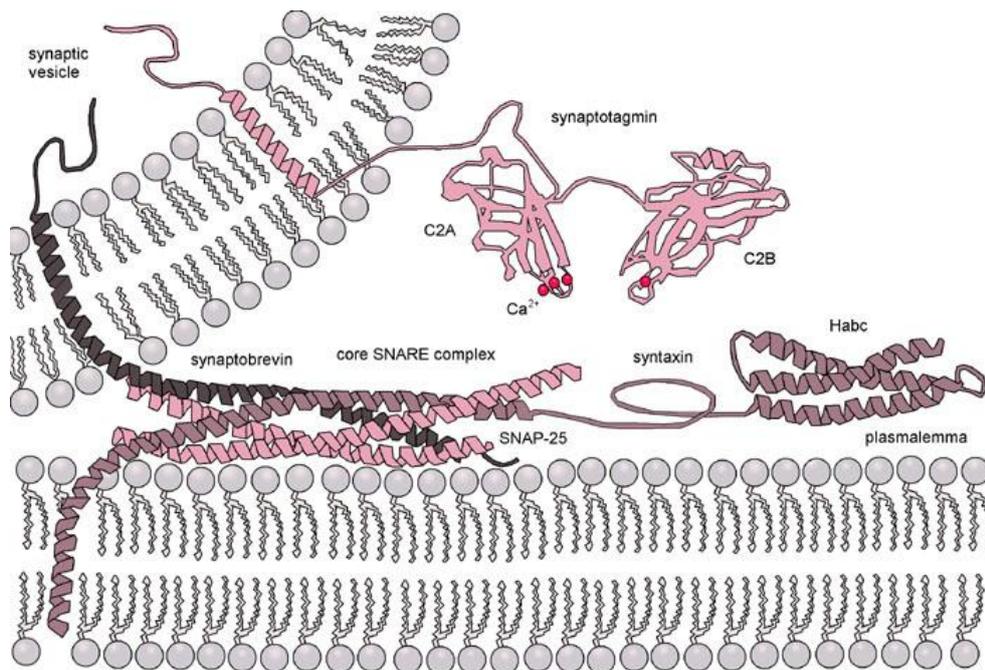
- **La syntaxine I** : localisée au niveau de la membrane plasmique, avec une extrémité C-terminale extracellulaire, un segment transmembranaire et une extrémité N-terminale intracytoplasmique dont le motif en triple hélice Habc assure la régulation de la liaison aux partenaires (37). Dans une région plus centrale, un autre motif en triple hélice lie les autres SNAREs. Des protéines régulatrices et/ou des acides gras permettent de passer d'une conformation fermée (domaine Habc replié) à une conformation ouverte (38) pour lier les autres protéines du complexe SNARE (SNAP-25 notamment) (37).

- **La synaptobrevine** : localisée au niveau de la membrane de l'acrosome, avec un domaine C-terminal intra vésiculaire, un domaine transmembranaire et une extrémité N-terminale variable entre les différentes isoformes. La synaptobrevine se lie autres SNAREs par sa région centrale très conservée (39).

- **La SNAP-25** : Sans région transmembranaire, elle est constituée de deux motifs liant la syntaxine et la synaptobrevine (39). Ces deux sites de liaison sont séparés entre eux par une région riche en cystéines dont la palmitoylation permet d'augmenter l'hydrophobicité de la SNAP-25 et donc son arrimage à la membrane plasmique (35).

- **La synaptotagmine VI** : Ancrée dans la membrane de l'acrosome par un domaine transmembranaire, son extrémité C-terminale possède deux domaines C2 pouvant lier les lipides, le calcium, le complexe SNARE, les canaux calciques et la calmoduline (40). Elle permet donc de rassembler et de réguler les interactions entre les différents partenaires de la fusion membranaire.

Figure 13 : Le complexe SNARE



La syntaxine (ancrée à la membrane plasmique) est associée à la synaptobrevine (ancrée à la membrane de l'acrosome) via la SNAP-25. La synaptotagmine permet le rapprochement des SNAREs et des régulateurs.

Associés à ces protéines SNARE, on trouve également des facteurs régulant le changement de conformation de la syntaxine, la liaison entre les protéines SNARE et le recyclage de ces complexes:

- **La NSF** (N-ethylmaleimide sensitive factor) : il s'agit d'une ATPase assurant le recyclage des protéines SNARE après la fusion membranaire. Elle possède un domaine N-terminal assurant les interactions avec l' α -SNAP et les SNAREs, un domaine D1 ATPasique et un domaine D2 (C-terminal) possédant une activité ATPasique moindre mais permettant l'hexamérisation de NSF (forme active) (41).

- **L' α -SNAP** : assure la liaison de la NSF aux SNAREs (42)

- **Les protéines Rab3** (GTPases) : elles permettent le recrutement de facteurs d'arrimage et le rapprochement des SNAREs (35).

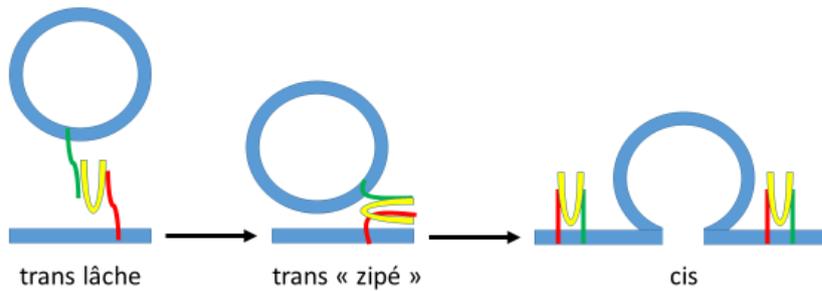
- **Munc 18-1** : protéine liant la syntaxine pour stabiliser le complexe SNARE (43) en conformation *trans*, bloquant ainsi le passage en *cis* et donc la fusion membranaire (cf III.C)

C. Mécanistique moléculaire de fusion membranaire

Les complexes SNARE sont situés à l'interface entre l'acrosome et la membrane plasmique. La disposition en cercle des SNAREs entraîne, par le rapprochement puis la fusion des membranes, la formation de pores de fusion puis de vésicules hybrides. A l'issue de cette fusion, le contenu acrosomique est libéré (30,35,44).

L'assemblage de la syntaxine avec la synaptobrevine, via la SNAP-25, débute initialement par l'extrémité N-terminale et progresse vers les régions C-terminales en fermeture éclair (« Zippering »). On aboutit alors à un fuseau de 4 hélices : 3 hélices de la syntaxine et 1 de la synaptobrevine (40). Le complexe alors formé est dit en conformation *trans* lâche. La déphosphorylation de la synaptotagmine et la libération de Munc 18-1 (43) vont entraîner le passage en conformation *trans* zippée forçant la fusion entre les deux membranes (*Figure 14*). Lorsque cette fusion est réalisée, les SNARE's se retrouvent sur la même bicouche lipidique : conformation *cis*.

Figure 14 : Transition trans/cis du complexe SNARE



rouge = syntaxine ; jaune = SNAP-25 ; vert = synaptobrévine.

Les protéines NSF et α -SNAP permettent de dissocier les SNAREs et ainsi d'initier un nouveau cycle (40).

D. Signalisation calcique biphasique

L'initiation de la réaction acrosomique dépend d'un signal inducteur (comme la liaison à ZP3) qui va induire des entrées de calcium dans le spermatozoïde par l'activation séquentielle de différents canaux calciques (Figure 16) :

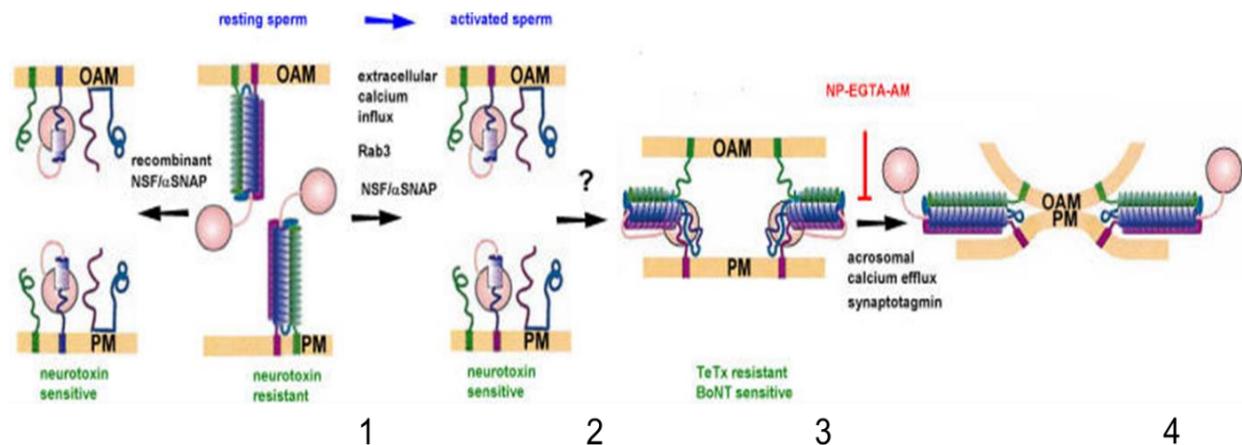
- 1) La liaison à la ZP va permettre l'ouverture d'un canal cationique peu spécifique qui va entraîner une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation active des canaux calciques voltage-dépendants de bas seuil : les canaux calciques de type T (45) (Figure 16.1). Cet influx transitoire induit :

- l'activation de la protéine Rab3 qui assure le rapprochement des SNAREs (et donc des membranes) par des facteurs d'arrimage (46) (Figure 15.1);

- la déphosphorylation de la synaptotagmine et l'activation d' α -SNAP et de NSF.

L'énergie alors fournie par l'hydrolyse de l'ATP permet la dissociation des complexes *cis* (Figure 15.2). Les SNAREs vont alors pouvoir se réassocier de part et d'autre des membranes et acquérir la forme *trans* du complexe (44,47) (Figure 15.3).

Figure 15 : Régulation du complexe SNARE par l'entrée de calcium



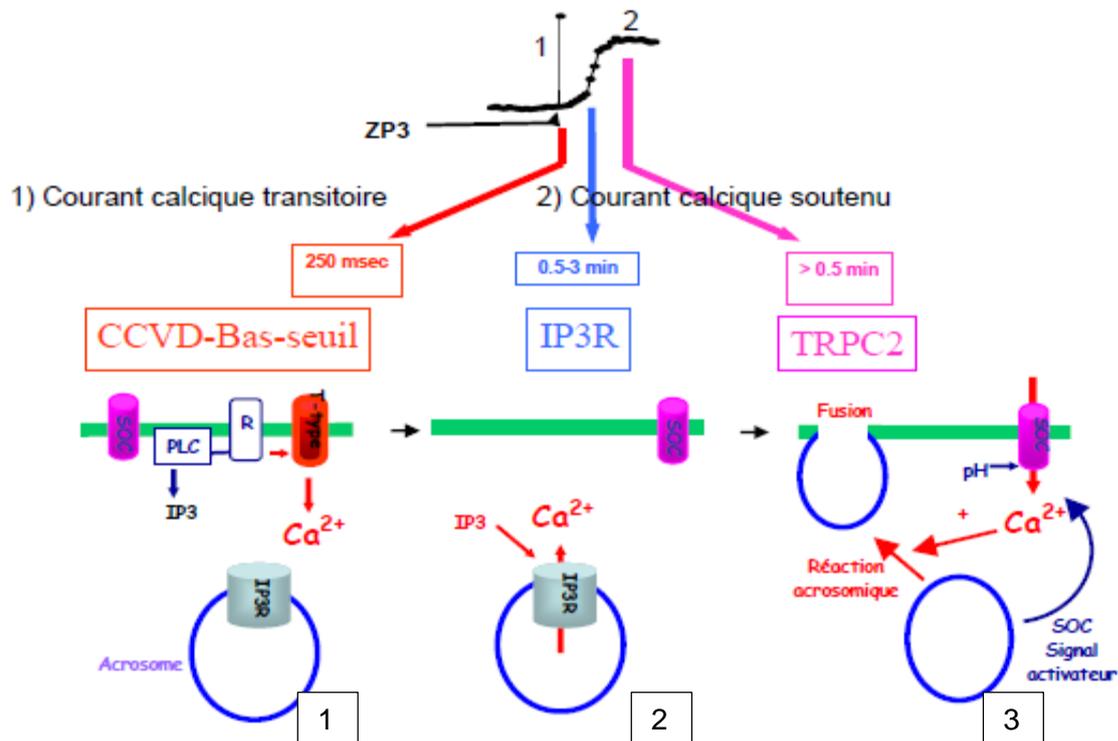
1) complexes en conformation cis sur les deux membranes. 2) La première entrée de calcium permet l'activation de Rab3 (recrutement de facteurs d'arrimage et rapprochement des membranes) et de NSF fournissant l'énergie nécessaire à la dissociation des SNAREs. 3) les protéines SNARE ainsi libérées peuvent former de nouveaux complexes SNARE en conformation trans. 4) Le deuxième influx de calcium permet l'activation de la synaptotagmine, l'acquisition d'une conformation trans « zippée » et donc la fusion des membranes (De Blas 2005)

2) La phospholipase C (PLC) s'active et hydrolyse le phosphatidyl-inositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) qui stimule la protéine kinase C, et en inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP₃) qui se fixe sur son récepteur, un canal calcique situé au niveau de l'acrosome (Figure 16.2). Ceci entraîne la libération du calcium intracellulaire stocké dans l'acrosome (48).

3) Cet épuisement des réserves de calcium active des canaux type SOC (Store Operated Channel) qui contribue, avec le canal dépendant de l'IP₃, à un second flux calcique. Ce second flux est cette fois-ci soutenu(48) (Figure 16.3).

Le deuxième influx de calcium active la synaptotagmine, induit la conformation *trans* « zippée » (Figure 15.4) et permet donc d'achever la fusion membranaire (44).

Figure 16 : Modèle de la signalisation calcique biphasique (O'Toole et al. 2000)



E. Rôle des acides gras et lysophospholipides

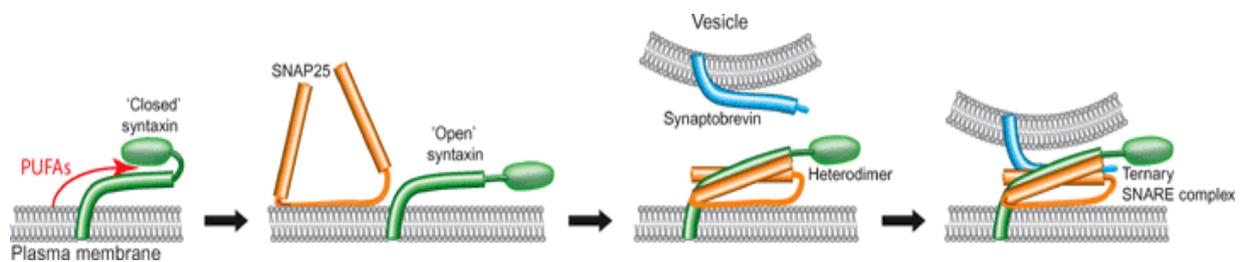
L'implication des lysophospholipides dans l'exocytose de l'acrosome a été montrée lors d'expériences sur spermatozoïdes de cobaye qui présentaient une capacitation accélérée et une induction rapide de la réaction acrosomique par l'A23187 (calcium ionophore) lorsqu'ils étaient incubés avec des lysophospholipides (réponse dose-dépendante sur la réaction acrosomique). A l'inverse, le blocage des phospholipases A2 (blocage de la libération de lysophospholipides et acides gras) inhibe la réaction acrosomique. Cette inhibition est levée après supplémentation du milieu en lysophospholipides. Cette induction de la réaction acrosomique est variable en fonction du lysophospholipide considéré. En effet, si la lysophosphatidyl-choline et le lysophosphatidyl-inositol la favorisent, la lysophosphatidyl-sérine, n'a elle que peu ou pas d'effet (7).

Des expériences similaires ont été menées avec les acides gras et donnent des conclusions similaires : plusieurs acides gras insaturés, comme l'acide arachidonique, sont capables d'induire la réaction acrosomique. Cependant il est également possible que cette

action passe, partiellement ou majoritairement, par l'action des dérivés de ces acides gras. En effet, les niveaux de métabolisation de ces acides gras sont, à ce jour, encore peu connus au niveau du spermatozoïde. De plus, plusieurs enzymes de ce métabolisme et/ou les métabolites produits, ont été décrits comme ayant un rôle dans la réaction acrosomique (7).

Le mécanisme d'action de ces lipides dits fusiogènes passe par leur aptitude à s'associer à la synaptotagmine pour permettre à la syntaxine de passer en configuration « ouverte » (*Figure 17*). Ce changement de conformation va favoriser la formation de complexes SNARE et donc la fusion des membranes acrosomique externe et plasmique (49).

Figure 17 : Mode d'action des acides gras dans la fusion membranaire



Les acides gras induisent un changement de conformation de la syntaxine, passant d'une conformation « fermée » (triple hélice Habc repliée) à une conformation « ouverte », lui permettant de s'associer à la SNAP-25 et la synaptobrevine et ainsi former le complexe SNARE (Darios 2007).

F. La réaction acrosomique précoce

L'induction de la réaction acrosomique par ZP3 est le modèle décrit depuis de nombreuses années. Cependant, une proportion non négligeable de spermatozoïdes réalise une réaction acrosomique précoce (50). Dans le sperme éjaculé, 10-15% des spermatozoïdes ont déjà réalisé leur réaction acrosomique. Après capacitation, le taux de réaction acrosomique augmente pour atteindre 20-25%. De ces constatations découlent deux hypothèses : soit cette réaction acrosomique précoce n'est qu'un échappement du système de régulation basé sur la signalisation calcique, soit d'autres systèmes de régulation sont impliqués et, dans ce cas, le but de cette réaction acrosomique précoce reste à déterminer.

De plus, des études récentes ont pu montrer que non seulement des spermatozoïdes ayant déjà traversé la ZP sont capables de la retraverser (51) mais il semble également que

la majorité des spermatozoïdes fécondant les ovocytes réalisent leur réaction acrosomique avant le contact avec la zone pellucide (52). Le schéma de la réaction acrosomique au contact de la ZP serait donc à reconsidérer.

A ce jour, divers ligands ont été décrits comme étant capables d'induire la réaction acrosomique : la progestérone, le GABA, la glycine, l'EGF, l'ATP, l'acétylcholine, l'atrial natriuretic peptide (ANP), la prolactine, le c-kit, l'interleukine 6 ou la sphingosine-1-phosphate. Le rôle dans la réaction acrosomique n'est pas clairement défini pour tous ces ligands (7,46).

En ce qui concerne la progestérone, plusieurs études décrivent ses actions sur le spermatozoïde. Il s'agit d'une hormone stéroïde féminine synthétisée par le corps jaune en phase lutéale mais également par le cumulus oophorus ovulé dans la trompe utérine. Elle agit sur le spermatozoïde pour faciliter sa capacitation et induire son hyperactivation via le canal CATSPER (24), mais aussi la réaction acrosomique par une action sur des récepteurs membranaires (53). Si la réaction acrosomique induite par la ZP est inhibée par la toxine pertussique, la réaction acrosomique induite par la progestérone est, quant à elle, insensible (46). De telles constatations semblent donc confirmer l'existence de plusieurs voies de signalisation de la RA et non un échappement ou un shunt de la voie classique.

IV. INTERACTION GAMÉTIQUE

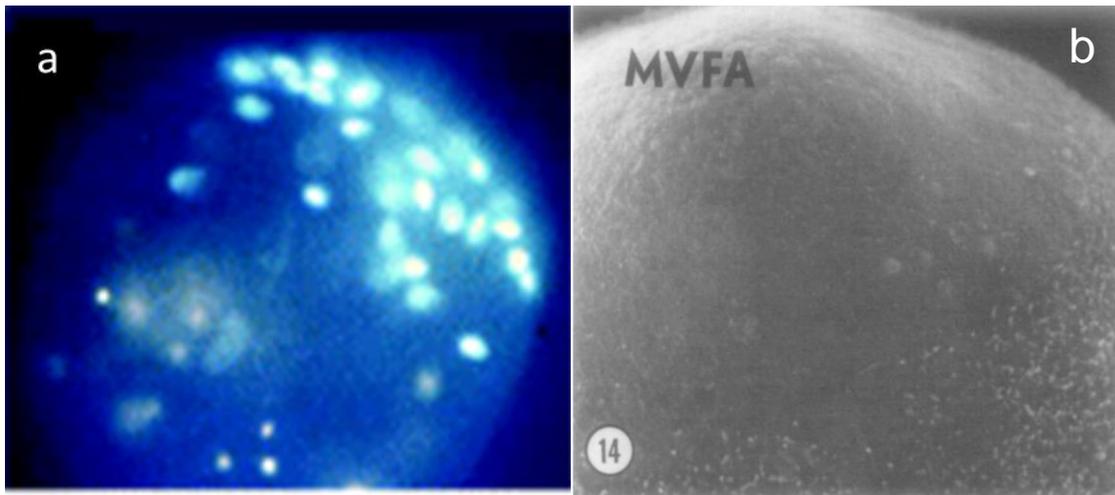
A. Fusion gamétique

Le spermatozoïde ayant traversé la zone pellucide a réalisé sa réaction acrosomique. Il va alors pouvoir entrer en contact avec les microvillosités de l'ovocyte au niveau du segment équatorial de sa tête. Ce contact va ensuite s'étendre vers la partie postérieure de la tête pour progressivement intégrer le spermatozoïde (54).

Chez la souris, il a été décrit une zone amincie de la membrane de l'ovocyte, dépourvue de microvillosités (*Figure 18b*). Celle-ci se trouve en regard du fuseau méiotique (ovocyte toujours bloqué en métaphase II) (55). Le rôle fonctionnel de cette zone est d'éviter une pénétration du spermatozoïde en regard du fuseau, ce qui désorganiserait la structure et

exposerait à l'expulsion du noyau spermatique après l'activation ovocytaire, lors de l'expulsion du deuxième GP. Si cette zone amincie n'a pas été retrouvée dans l'ovocyte humain, il a en revanche été montré que les spermatozoïdes ont une localisation préférentielle, éloignée du fuseau, lors de leur fusion avec l'ovocyte (*Figure 18a*) (56).

Figure 18 : Polarisation de la fusion gamétique



a) Insémination d'ovocytes humains dépellucidés. Après une heure d'insémination et marquage au DAPI (marquant l'ADN). Les spermatozoïdes pénètrent dans l'ovocyte par le même pôle (Ziyyat 2005).
b) Ovocyte de souris avec la zone amincie dépourvue de microvillosités (MVFA) (Longo & Chen 1985).

Plusieurs ligands sont impliqués dans la fusion gamétique. Au niveau du spermatozoïde, on a pu mettre en évidence :

- **La famille des métalloprotéases ADAMs** : protéines transmembranaires dont l'association hétérodimérique forme la fertiline (sous-unité α = ADAM1 et β = ADAM2). Les modèles KO, chez la souris, ont montré une diminution de moitié de la fusion gamétique (57).

- **Izumo** : les modèles murins KO produisent des spermatozoïdes capables de passer toutes les étapes jusqu'à l'entrée dans l'espace péri-vitellin mais une incapacité à fusionner avec l'ovocyte (58). La protéine kinase TssK permet la relocalisation d'Izumo dans la région post-acrosomique. Le KO de cette protéine bloque cette relocalisation et entraîne également une infertilité (59).

Pour lier ces protéines spermatiques, les principaux ligands ovocytaires sont :

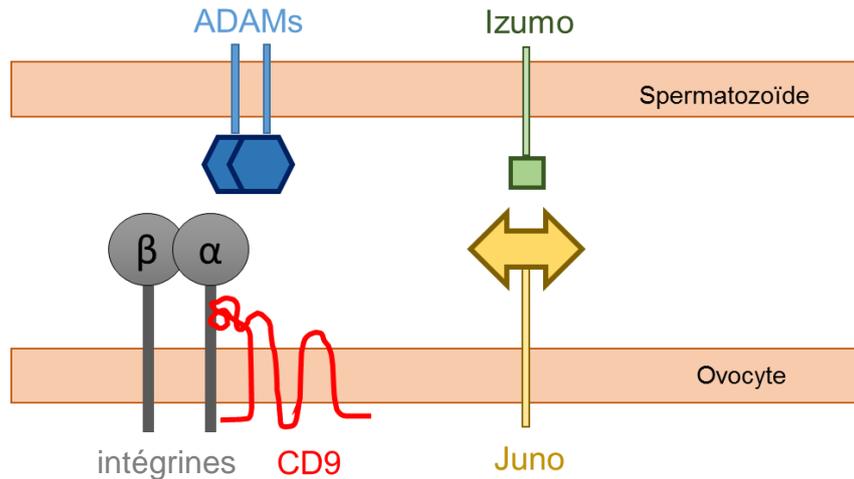
- **La tétraspanine CD9** : Protéine membranaire ovocytaire dont le KO entraîne une incapacité à fusionner avec le spermatozoïde (60). D'autres tétraspanines ont été décrites comme CD-81 dont la surexpression chez CD9^{-/-} restaure partiellement la baisse de fécondation (61), cependant son rôle est encore mal connu.

- **L'intégrine $\alpha 6 \beta 1$** : elle a longtemps été considérée comme LE récepteur membranaire ovocytaire suite à des expériences utilisant des anticorps anti- $\alpha 6$ (62). Cependant les modèles KO pour les différentes intégrines ovocytaires ne sont pas infertiles, relayant ces intégrines à un rôle plus secondaire dans la fécondation. Elle est aujourd'hui plus considérée comme un des partenaires de CD9 et son rôle reste encore à déterminer (63).

- **Juno** : Dernier partenaire ovocytaire découvert. Il s'agit d'un folate receptor liant Izumo (64). L'équipe qui l'a découvert suggère également un rôle dans le blocage de la polyspermie par son internalisation rapide après fusion. Cependant, chez l'humain, ce blocage est peu efficient au niveau de la membrane de l'ovocyte (cf IV.C et *Figure 18a*).

Les principaux ligands et récepteurs impliqués dans la fusion gamétique sont schématisés dans la *Figure 19*.

Figure 19 : principaux ligands et récepteurs impliqués dans la fusion gamétique

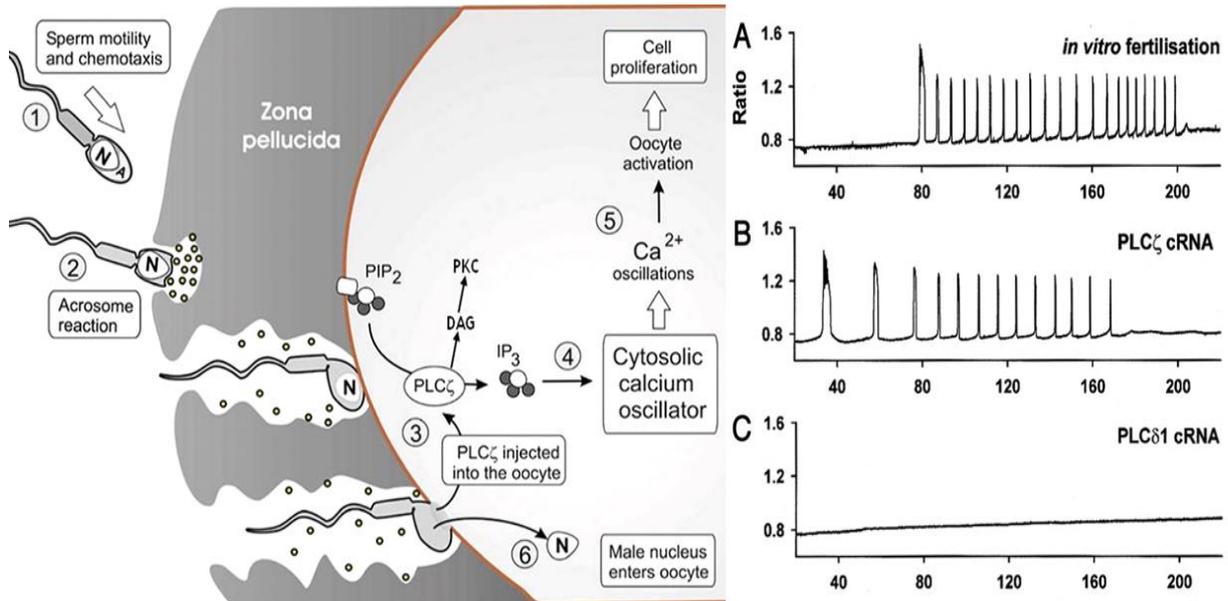


B. Activation de l'ovocyte.

Après pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, la phospholipase C zeta (PLC ζ) contenue dans l'acrosome est libérée dans l'ovocyte. Celle-ci va hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂), libérant ainsi un diacyl-glycérol (DAG) et un inositol tri-phosphate (IP₃). La liaison de l'IP₃ à son canal-récepteur entraîne la libération des stocks de calcium (65). Ces vagues calciques permettront l'activation de l'ovocyte (Figure 20) avec :

- la reprise de la méiose : fin de la 2^e division de méiose et libération du 2^e GP.
- la libération des granules corticaux assurant le blocage de la polyspermie (cf IV.C).
- l'apposition des 2 pronuclei suivi des premières divisions mitotiques de l'embryon.

Figure 20 : Le spermatozoïde apporte la PLC zeta nécessaire à l'ovocyte pour son activation



La PLC zeta permet la libération de calcium lors de la fécondation (A). Ces vagues calciques peuvent être mimées par l'injection d'ARNc de PLC zeta (B). L'ajout d'une autre PLC ne peut reproduire ces vagues calciques (C) (Saunders 2002).

C. Blocage de la polyspermie

Un seul spermatozoïde doit féconder l'ovocyte pour donner un embryon viable. La fécondation de l'ovocyte par plusieurs spermatozoïdes est nommée polyspermie. Chez l'Homme, elle est principalement bloquée par la zone pellucide (66). En effet, chez l'Homme, contrairement à d'autres espèces, la membrane ovocytaire est peu impliquée dans ce blocage de la polyspermie, comme le démontrent certaines expériences sur ovocytes dépellucidés (Figure 18a) (56).

L'activation de l'ovocyte entraîne l'exocytose des granules corticaux situés sous la membrane plasmique de l'ovocyte. Cette exocytose permet la libération d'enzymes qui vont modifier la zone pellucide. La ZP2 va être dégradée et la ZP3 déglycosylée. Ces modifications vont induire une compaction de la zone pellucide et une incapacité du spermatozoïde à la lier (due à l'absence de résidus glycosylés).

CHAPITRE 2. LES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES

I. CLASSIFICATION DES PHOSPHOLIPASES

Les glycérophospholipides sont des molécules membranaires constituées d'un glycérol estérifié avec deux acides gras et d'un acide phosphorique couplé à un alcool (*Figure 21*) (3). Leur hydrolyse par les phospholipases (PL) au niveau des liaisons ester, en réponse à certains stimuli, produit des messagers secondaires impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (7).

Ces phospholipases sont séparées en plusieurs classes en fonction du site de clivage des phospholipides (*Figure 21*) :

- 1) **les PLA1** hydrolysent la liaison sn-1 et les **PLA2** la liaison sn-2 des glycérophospholipides, libérant toutes les deux un acide gras et un lysophospholipide ;

Les phospholipases A2 sont classées en fonction de leur localisation cellulaire, leur poids moléculaire et leur sensibilité au Ca^{2+} :

- Les PLA2 cytosoliques (cPLA2), de haut poids moléculaire et comprenant 3 sous-groupes : cPLA2 α , β et γ ou cPLA2-IVA, -IVB et -IVC. Elles ne nécessitent pas (-IVC) ou peu de Ca^{2+} (-IVA, -IVB).

- Les PLA2 Ca^{2+} indépendantes (iPLA2) ne nécessitent pas de Ca^{2+} , elles sont de haut poids moléculaire et comprennent 2 sous-groupes : les iPLA2 β (ou VIA) et la iPLA2 γ (ou VIB).

- les PLA2 sécrétées (sPLA2) : de faible poids moléculaire, elles agissent sur un mode autocrine et/ou paracrine. Elles ont besoin de Ca^{2+} pour leur activité catalytique.

On décrit 12 différentes enzymes ou isoformes : IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB et otoconin-90 (67). Ces différentes isoformes présentent des profils d'expression tissulaire différents et des affinités variables pour les différents substrats.

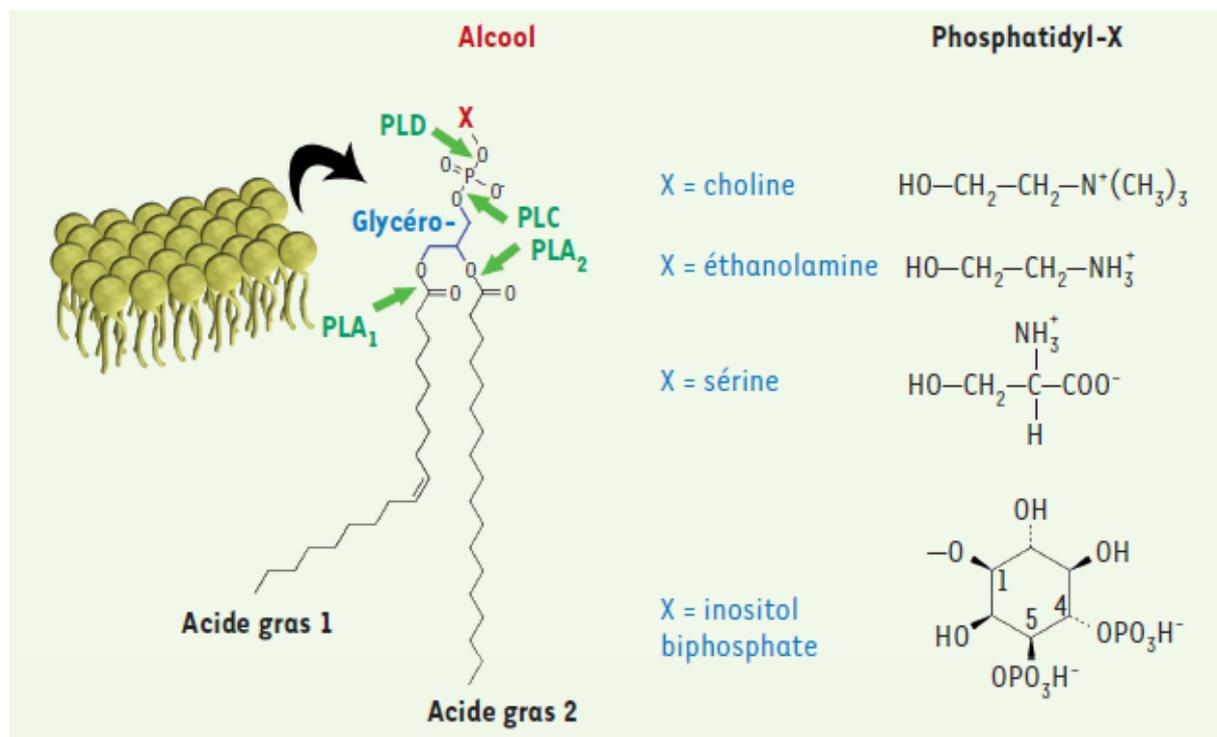
- On distingue une dernière catégorie : les PAF-acetylhydrolases (groupes VIIA, VIIB, VIIIA, VIIB). Celles-ci hydrolysent et inactivent le PAF (platelet-activating factor). Elles sont de poids moléculaire intermédiaire et ne nécessitent pas de Ca^{2+} (7).

- 2) **les PLB** hydrolysent les deux liaisons sn et libèrent deux acides gras. Leur activité cumule donc celle des PLA1 et PLA2 ;

- 3) **les PLC** hydrolysent la liaison sn-3 du phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP2), libérant un inositol-1-4-5-triphosphate (IP3) et un diacylglycérol (DAG). Ces molécules sont toutes deux de potentiels messagers secondaires. Comme décrit précédemment, la cible de l'IP3 est un canal calcique permettant la libération des stocks cellulaires (l'acrosome dans le cas du spermatozoïde). Au sein de cette famille, on retrouve notamment la phospholipase C ζ qui est impliquée dans l'activation ovocytaire (cf Ch I, IV, B).

- 4) **Les PLD** hydrolysent la liaison phospho-alcoolique et libèrent un acide phosphatidique et un alcool.

Figure 21 : Structure des glycérophospholipides et site d'action des phospholipases



Les phospholipides sont constitués d'un glycérol estérifié avec deux acides gras et d'un acide phosphorique couplé à un alcool. Le site de clivage par les phospholipases varie en fonction de leur classe (Arnoult 2012).

II. LES sPLA2 SONT IMPLIQUEES DANS DE NOMBREUSES FONCTIONS

Les sPLA2, par leur action sur les glycérophospholipides, entrent dans de nombreuses fonctions, mises en évidence par l'étude de souris knock-out pour chaque groupe d'enzymes (68). Le principal mode d'action est leur activité catalytique par une sécrétion autocrine/paracrine, mais elles agiraient dans certains cas, sur un mode ligand/récepteur (68).

A. Immunité et réaction inflammatoire

Il a été démontré un rôle pro-inflammatoire de la sPLA2 du groupe X. En effet dans les modèles murins de l'asthme, le KO pour cette sPLA2, permet de réduire considérablement les

symptômes voire les supprimer. Le mécanisme proposé est une stimulation des polynucléaires éosinophiles par les cellules épithéliales pulmonaires via la sécrétion paracrine de sPLA2-X.

Le KO de la sPLA2-V, dans ces mêmes modèles, réduit également les symptômes. Le mécanisme d'action de cette sPLA2 est double dans le poumon : l'hydrolyse du surfactant et la stimulation des cellules présentatrices d'antigènes et donc une stimulation de l'activité Th2 (prédominante dans des pathologies telles que l'asthme).

Enfin, la sPLA2-IIA a également été décrite comme anti-bactérienne par l'hydrolyse des membranes bactériennes lors d'études sur des modèles transgéniques avec hyper-expression de cette enzyme.

B. Maladies cardiovasculaires

La sPLA2 du groupe V présente une forte expression dans les cellules myocardiques. Les modèles KO pour cette enzyme ainsi que pour la sPLA2-X, présentent une nette diminution de l'atteinte myocardique en cas d'infarctus du myocarde. Elles constituent donc des cibles thérapeutiques dans cette pathologie et constituent des biomarqueurs dans la maladie cardiovasculaire. Les niveaux sériques de sPLA2 -IIA, en cas d'infarctus du myocarde, ont également fait l'objet d'études chez l'Homme.

De plus, les modèles transgéniques/KO pour ces différentes enzymes, ainsi que pour sPLA2-III, semblent montrer un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Le rôle de sPLA2-X est lui moins clair avec un potentiel rôle protecteur dans l'athérosclérose, mais elle favoriserait la formation d'anévrismes aortiques par son action pro-inflammatoire.

C. Régulation du métabolisme

Les sPLA2-IB et sPLA2-X font partie de la sécrétion exocrine du pancréas dans le duodénum et jouent un rôle important dans la digestion des phospholipides alimentaires et biliaries. Les modèles KO seraient protégés des désordres métaboliques liés à l'alimentation (obésité, insulino-résistance et hyperlipidémie).

La sPLA2-X induit le relargage d'acides gras polyinsaturés (PUFAs) qui inhibent la synthèse du récepteur nucléaire des oxystérols (LXR pour Liver X receptor). Le modèle KO entraîne donc une augmentation de LXR facilitant la cortico-stéroïdogénèse.

Enfin, la délétion de sPLA2-XIIB, une sPLA2 dite atypique en raison de la perte de son site catalytique, induit une stéatose hépatique par défaut de sécrétion des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) qui s'accumulent alors dans le foie. Le mécanisme d'action à l'origine de cette stéatose hépatique reste non clarifié.

D. Physiopathologie neuronale

Les sPLA2-IIA et -V joueraient un rôle variable (protecteur/aggravant) dans diverses pathologies neuronales. Diverses études ont également montré le rôle de la sPLA2-X dans la nociception périphérique (augmentée en cas de surexpression de cette enzyme et diminuée dans les modèles KO).

E. Homéostasie cutanée

L'épiderme forme une barrière entre l'environnement externe et l'organisme, empêchant l'entrée de toxines, d'antigènes ou de bactéries. Il a été suggéré un rôle des PUFAs, libérés par les sPLA2, dans l'établissement de cette barrière, mais les preuves définitives n'ont pas encore été apportées.

Cependant, les modèles transgéniques pour les sPLA2-X et sPLA2-IIA présentent une alopécie et une hyperplasie de l'épiderme dues à l'hydrolyse massive de la phosphatidyl-éthanolamine et la libération de PUFAs. De plus, le modèle KO pour la sPLA2-X présente des défauts ultra-structuraux au niveau de la couche externe de l'épiderme.

F. Oreille interne

L'Otoconin-90 est une sPLA2 atypique, dépourvue d'activité catalytique. Son expression est majoritairement située au niveau de l'oreille interne. Le modèle KO entraîne des troubles de l'équilibre.

G. Données chez l'Homme

Une très grande majorité de ces données ont donc été obtenues chez l'animal, en particulier la souris. Cependant quelques études chez l'Homme ont également été publiées. Plusieurs de ces isoformes sont retrouvées dans divers tissus chez l'Homme (liquide gastrique, liquide synovial, liquide broncho-alvéolaire, ...). De plus, on a décrit des liens entre certaines isoformes et des pathologies (67) :

- la sPLA2 du groupe IIA et son rôle protecteur dans la polypose adénomateuse familiale ou celle du groupe III en biomarqueur pour le cancer du côlon ;
- les polymorphismes des sPLA2 des groupes IIA, V et X associés aux maladies cardiovasculaires ;
- des mutations homozygotes pour la sPLA2 du groupe V, associées à des tâches rétinienne bénignes ;
- des désordres métaboliques liés à un polymorphisme des sPLA2 des groupes V (niveaux de LDL plasmatiques), IB (predisposition à l'obésité), IID (perte de poids dans les pathologies pulmonaires obstructives).

Ces données semblent donc montrer que chez l'Homme, comme chez la souris, ces sPLA2 sont impliquées dans de nombreuses et diverses fonctions. Cependant, les mécanismes cellulaires et biochimiques sont peu décrits chez l'Homme, d'où l'utilité du modèle murin pour approfondir ces connaissances.

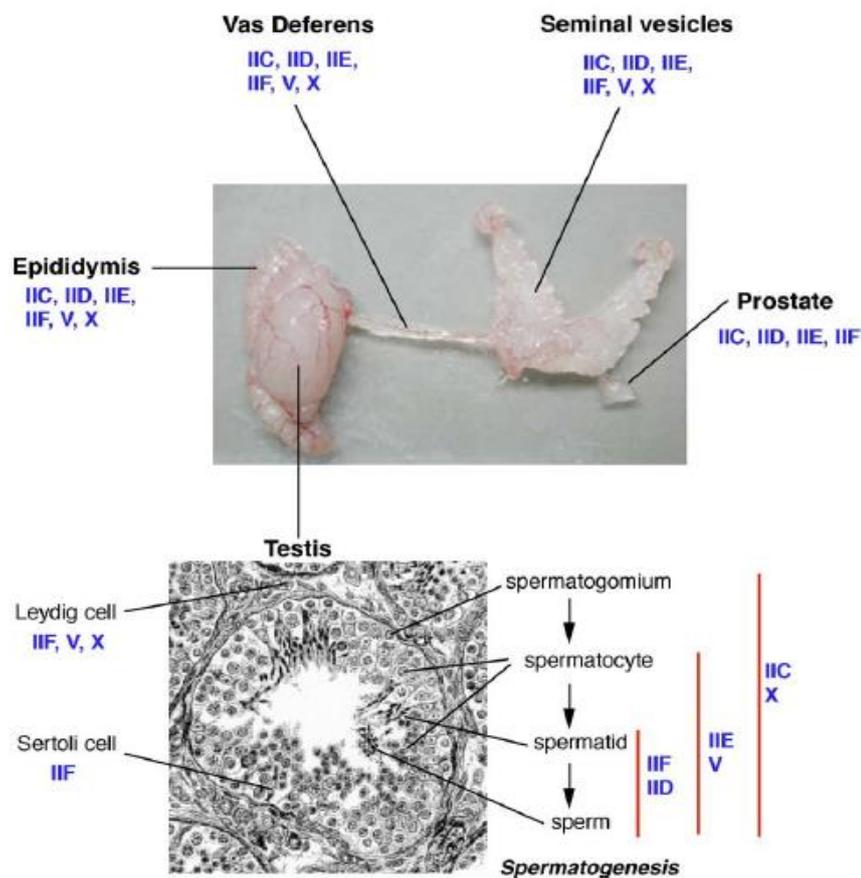
III. sPLA2 ET FERTILITE

Depuis quelques années, le rôle des sPLA2 dans la fertilité masculine a également été étudié, notamment par l'équipe d'Arnoult. Ces différentes études montrent un rôle important de ces enzymes dans la maturation, la capacitation, la mobilité, la réaction acrosomique, la fécondation et le développement embryonnaire précoce (4–6).

A. Des enzymes présentes dans le tractus génital mâle

La présence de plusieurs classes de sPLA2 a été observée dans le tractus génital masculin chez la souris. L'analyse par immunoblot et/ou immunohistochimie a permis de cartographier en détail les tissus et cellules qui les produisent (69). On a ainsi mis en évidence les sPLA2 des groupes IIC, IID, IIE, IIF, V et X au sein du testicule, des voies excrétrices, des glandes annexes, des cellules germinales et/ou spermatozoïdes matures (*Figure 22*).

Figure 22 : Représentation de la localisation des sPLA2 dans le tractus murin mâle (Masuda 2004).



Cette étude a été réalisée sur des souris C57BL/6, lignée possédant une délétion naturelle pour la sPLA2–IIA. Il est donc difficile de conclure sur la présence ou non de cette enzyme en utilisant ce modèle.

Chez l'Homme, les mêmes analyses ont mis en évidence des données similaires à celle de la souris pour le testicule et l'épididyme, à l'exception de la sPLA2–IIC dont le gène chez l'Homme est non fonctionnel (pseudogène). L'analyse immunohistochimique au niveau des glandes annexes révèle une production importante de sPLA2 libérées dans le liquide séminal avec notamment les sPLA2-IIID et -V qui présentent les marquages les plus importants. La sPLA2-IIA est également présente au niveau des glandes annexes de l'Homme, contrairement à la souris (69).

Une étude plus récente a également démontré la présence de la sPLA2 de groupe III dans l'épididyme proximal et son rôle dans la maturation du spermatozoïde. Son inactivation entraîne un défaut de mobilité du spermatozoïde et une altération de son pouvoir fécondant. Ces anomalies seraient dues à une modification dans la composition et le remodelage/métabolisme lipidiques membranaires du spermatozoïde (70).

B. **Activité PLA2 et réaction acrosomique**

Diverses études ont montré une activité PLA2 dans le sperme éjaculé. Ainsi, dans le modèle bovin, par exemple, il a été montré que cette activité permettait l'hydrolyse de la phosphatidyl-choline majoritairement, mais également de la phosphatidyl-éthanolamine et du phosphatidyl-inositol. Cette réaction entraîne la libération d'acide linoléique et d'acide arachidonique, deux lipides fusiogènes (7).

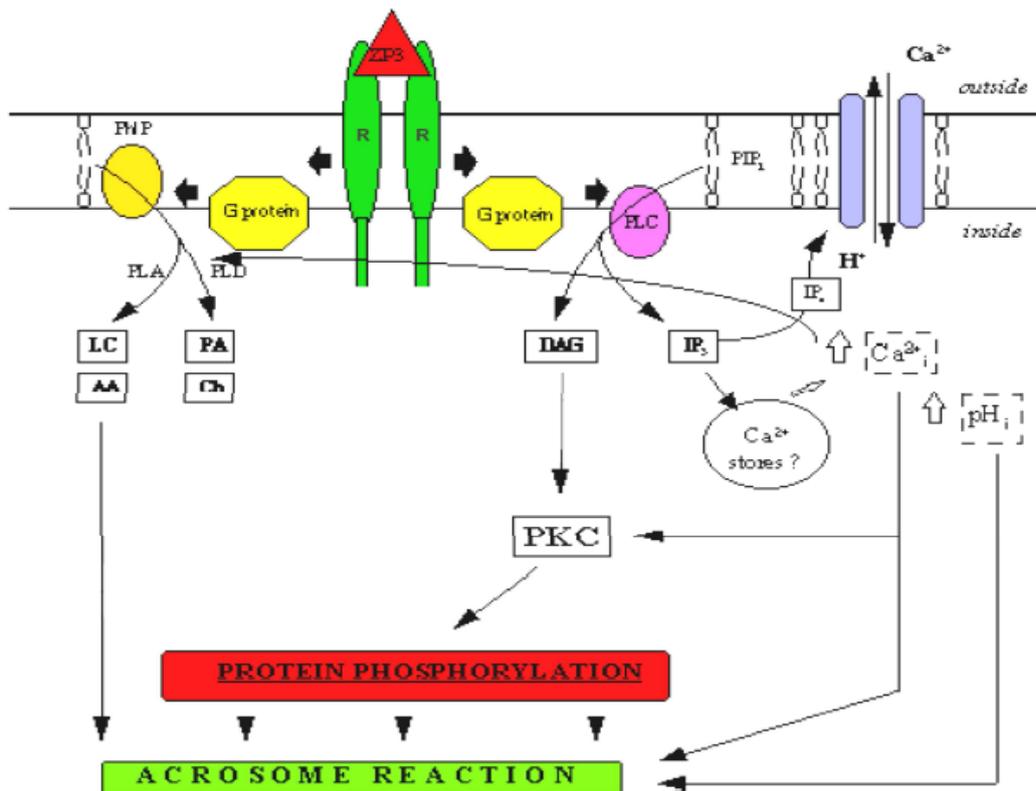
De plus, l'étude d'inhibiteurs de PLA2 sur divers modèles animaux et humain montre une diminution des taux de réaction acrosomique spontanée et induite par A23187 (71–74). Ces taux sont restaurés par addition de lysophosphatidyl-choline et acide arachidonique (produits de la réaction enzymatique) (74). L'utilisation d'anticorps anti-sPLA2-IB chez le hamster aboutit également à une inhibition de la réaction acrosomique spontanée (75)

Enfin des études plus récentes ont montré une augmentation de l'activité PLA2 en réponse à des agonistes naturels tels que la progestérone ou la zone pellucide (augmentation d'acide arachidonique et de lysophosphatidyl-choline parallèlement à la diminution de phosphatidyl-choline) (7). Tous ces résultats aboutissent donc à la conclusion que les PLA2 jouent un rôle dans la régulation de la réaction acrosomique.

On a ensuite cherché à caractériser les PLA2 présentes dans le spermatozoïde. Les expériences d'immunoblot ont ainsi permis de décrire la présence de plusieurs sPLA2 : -IID, -IIC, -V, -X et -IIF (69). L'iPLA2-beta a également été rapportée dans le spermatozoïde (76) par Western Blot. Une étude du KO pour cette iPLA2 chez la souris a abouti à des individus dont la mobilité spermatique diminuait drastiquement, aboutissant à des taux de fécondation effondrés en FIV.

A partir des différentes données concernant l'implication des phospholipases dans la physiologie du spermatozoïde et le rôle des acides gras fusiogènes produits par les PLA2, un modèle de voie de régulation lipidique de la réaction acrosomique a ainsi pu être proposé chez la souris (*Figure 23*) (77).

Figure 23 : Représentation schématique de la signalisation de la réaction acrosomique chez la souris (Baldi 2000).



L'interaction de ZP3 avec son récepteur (encore inconnu) va entraîner l'activation, via des protéines G, des phospholipases C. Celles-ci vont générer un inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et un diacyl-glycérol (DAG) par hydrolyse du phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP2). Le DAG va activer la protéine kinase C quant à l'IP3, il va permettre la libération des stocks de calcium. Ceci entrainera :

- une cascade de phosphorylations à partir de la protéine kinase C ;
- une activation des PLA2 et donc la libération d'acide arachidonique et de lysophospholipides (lipides fusiogènes) ;
- le recrutement et/ou l'activation des différents acteurs des complexes SNARE via l'augmentation du calcium intracellulaire ;

Tous ces mécanismes concourent à la réalisation de la réaction acrosomique.

C. Principales sPLA2 impliquées dans la physiologie spermatique

Il reste à ce jour à démontrer la part respective des différentes PLA2 dans la physiologie du spermatozoïde (la présence de cPLA2 n'étant pas, à ce jour, démontrée) ainsi que la part respective des différents groupes de sPLA2.

Récemment, l'équipe de Roldan a proposé l'implication de la sPLA2-IIID dans la signalisation de la réaction acrosomique progestérone-dépendante (78). Cette sPLA2 serait présente dans le spermatozoïde humain (mis en évidence par Western Blot), dans la région post-acrosomique de la tête et la pièce intermédiaire du spermatozoïde (mis en évidence par immunofluorescence).

L'équipe du Dr Arnoult a, quant à elle, montré l'importance de la sPLA2 du groupe X chez la souris mâle dans la fonction de reproduction. Il a tout d'abord été démontré que la mGX était retrouvée dans l'acrosome et libérée lors de la réaction acrosomique « spontanée » (4) et diminuait la mobilité (5) d'une sous-population de spermatozoïdes de façon autocrine et paracrine. De plus, la mGX induit la réaction acrosomique, par le même mode de sécrétion, lors de la capacitation (6). Enfin, la fécondation *in vitro* avec spermatozoïdes traités par la mGX présente de meilleurs taux de fécondation et un meilleur développement précoce de l'embryon (taux d'embryons à 2 cellules plus élevé et taux plus faible de lyse embryonnaire) (4,6).

Pour expliquer le mécanisme d'action de la mGX sur la réaction acrosomique, le principal mécanisme d'action proposé est la libération d'acides gras fusiogènes facilitant l'activation des complexes SNARE.

En ce qui concerne la mobilité/capacitation, plusieurs hypothèses et données de la littérature sont avancées pour expliquer le rôle des PLA2 :

- l'inhibition de la mobilité spermatique par les acides gras et lysophospholipides (5);
- la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les spermatozoïdes dans un milieu riche en acides gras polyinsaturés et les altérations potentielles induites par ces ROS (5) ;

- l'influence des phospholipides/acides gras sur le fonctionnement des protéines, notamment les canaux ioniques membranaires ou de type SOC (5,76) ;

- l'impact de la composition et du remodelage lipidique dans la fonction du spermatozoïde (70).

Associé à toutes ces données, il convient d'ajouter le mode d'action ligand-récepteur des PLA2 (68) qui pourrait, s'il est démontré dans le spermatozoïde et/ou l'ovocyte, fournir de nouveaux éléments expliquant l'amélioration des résultats en fécondation *in vitro*.

A ce jour, la phospholipase A2 sécrétée acrosomique n'est pas caractérisée chez l'Homme, contrairement à la souris. Quelques tests préliminaires ont déjà été réalisés chez l'Homme qui montraient l'effet inducteur des phospholipases A2 sécrétées sur la réaction acrosomique des spermatozoïdes humains. Diverses sPLA2 ont été testées avec un effet variable en fonction de la sPLA2 utilisée : les phospholipases A2 sécrétées des groupes V (hGV), X (hGX) et IB (hGIB) semblaient les plus efficaces ainsi que hGIIA qui, elle, présentait une importante variabilité interindividuelle.

CHAPITRE 3. OBESITE, DYSLIPIDEMIE ET INFERTILITE MASCULINE

De nombreuses études ont permis de montrer l'impact négatif sur la fertilité masculine de facteurs tels que l'IMC (indice de masse corporelle), l'alimentation déséquilibrée, le syndrome métabolique, etc.

I. IMPACT DU SURPOIDS SUR LA FERTILITE MASCULINE

A. Effet sur les chances de grossesse

Les premières grandes études recherchant un lien avec la fertilité étaient essentiellement épidémiologiques et ne donnaient que peu d'éléments sur les mécanismes physiopathologiques de l'infertilité liée au surpoids. Toutefois les conclusions de ces études étaient assez unanimes avec une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et la fertilité masculine. Nguyen a réalisé une étude sur les grossesses norvégiennes sur 5 ans qui montrait une plus forte prévalence de l'infertilité (délai nécessaire pour concevoir supérieur à 1 an et/ou nécessité de concevoir par procréation médicalement assistée) parmi les hommes présentant un surpoids (79). Ramlau-Hansen au Danemark (80) et Sallmen chez les agriculteurs américains ont obtenu des résultats similaires (81).

D'autres études plus récentes ont analysé le lien entre le surpoids chez l'homme et les chances de réussite en AMP. Il a été montré une corrélation négative entre l'IMC masculin et les chances de grossesse en fécondation *in vitro* conventionnelle (82–85), le taux de naissances vivantes en ICSI (86), ainsi que le taux de grossesse après ICSI-TESE (ICSI après extraction de spermatozoïdes testiculaires) en cas d'azoospermies non obstructives (87). La conclusion d'Anifandis est que les IMC élevés de la femme et de l'homme influent négativement sur les résultats de FIV de façon indépendante et combinée (83).

B. Effet sur les paramètres spermatiques

Parallèlement à ces études, on a cherché un lien entre l'obésité et la spermatogénèse tant au niveau qualitatif que quantitatif. Les conclusions peuvent diverger en fonction des paramètres analysés. Cependant plusieurs auteurs soutiennent que le surpoids altère les paramètres spermatiques « classiques » comme la concentration spermatique, leur mobilité ou leur morphologie des spermatozoïdes (88–91) mais également le taux de fragmentation de l'ADN spermatique, la condensation de la chromatine ou la fonction mitochondriale (89).

Il est cependant important de noter que pour chacun de ces paramètres, d'autres auteurs ne retrouvent pas le lien entre surpoids et paramètres spermatiques. Une méta-analyse de Sermondade montre néanmoins un risque plus élevé d'oligo- et d'azoospermie chez les patients présentant un surpoids ou une obésité, mais également chez les patients avec un IMC faible (92).

C. Obésité et réaction acrosomique

Peu d'études sont disponibles dans la littérature à ce sujet. Seule une étude préliminaire a étudié ce lien. Les données obtenues suggèrent que l'obésité est associée à une réaction acrosomique altérée avec une réaction acrosomique spontanée excessive et une réponse à l'induction par la progestérone moindre par rapport au groupe contrôle (93). Les auteurs de cette étude rapportent également un contenu élevé en cholestérol dans les spermatozoïdes de patients obèses (dont l'efflux membranaire constitue une des premières étapes de la capacitation) et une concentration plasmatique en estradiol plus élevée, ce stéroïde ayant été décrit comme inhibiteur de la réaction acrosomique (94).

II. ANOMALIES LIPIDIQUES ET FERTILITE

A. Anomalies lipidiques et paramètres spermatiques

L'étude de l'influence des anomalies lipidiques sur la fertilité repose essentiellement sur des modèles animaux. Certaines données sont tout de même disponibles chez l'Homme

notamment grâce à l'étude LIFE (Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment). Les résultats montrent que les niveaux sériques en cholestérol, phospholipides et/ou triglycérides ont un impact négatif sur la fertilité masculine et féminine (95). Ces niveaux sériques semblent, en effet, impacter les paramètres spermatiques mais seul l'effet sur les anomalies morphologiques est significatif, l'impact sur la numération ou la mobilité spermatique est, quant à lui, minime et non significatif (96). Enfin, Attaman a rapporté une corrélation négative entre les apports en acides gras et la numération spermatique (97).

Chez le lapin, il a été montré qu'un régime enrichi en graisse influait négativement sur le volume, la numération, la mobilité et la morphologie spermatique (98). Bataineh et Nusier ont obtenu des résultats similaires chez le rat avec une diminution de la numération et de la mobilité spermatique après un régime enrichi en cholestérol (99).

Blesbois a mené une expérience similaire chez le dindon et, s'il ne retrouvait pas de retentissement sur les paramètres spermatiques, il a revanche noté une diminution des taux de fécondation (100) montrant ainsi l'effet d'un régime enrichi en graisses sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

B. Anomalies lipidiques et réaction acrosomique

Compte tenu du rôle des phospholipides/phospholipases dans la capacitation et la réaction acrosomique, il est licite d'envisager que les désordres lipidiques et l'obésité entraînent chez l'Homme une infertilité liée à un défaut dans la signalisation cellulaire de ces fonctions spermatiques.

Saez et Lancellotti ont étudié l'influence des anomalies lipidiques sur la capacitation et la réaction acrosomique. Les résultats montrent chez les lapins ayant reçu un régime enrichi en graisse, une phosphorylation altérée au niveau des résidus tyrosine des protéines spermatiques (98). De plus, les lapins ayant subi le régime enrichi ont une réaction acrosomique progestérone-induite moins importante.

III. LES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES

Pour expliquer l'origine des effets néfastes de la dyslipidémie et/ou de l'obésité sur la fonction de reproduction, les auteurs s'appuient sur 4 axes principaux :

A. Perturbations hormonales

Chez les patients obèses, une dérégulation hormonale entraîne un excès de production d'œstrogènes. Cette dérégulation est liée à l'augmentation de la leptine (qui inhibe la conversion de 17OH-progestérone en testostérone dans les cellules de Leydig) et l'augmentation d'activité aromatasase des tissus adipeux diminuant ainsi les taux de FSH (par rétro-contrôle négatif) et les taux de testostérone (101).

De plus, le tissu adipeux sécrète de nombreuses adipokines et cytokines. Leur production est donc élevée chez les patients obèses, ce qui crée un environnement pro-inflammatoire néfaste pour la spermatogénèse et la stéroïdogénèse (101).

B. Stress oxydatif

Les cytokines pro-inflammatoires entraînent une augmentation du stress oxydatif dont les effets néfastes sur la fertilité (102) sont favorisés par les faibles mécanismes de défense du spermatozoïde, en dehors de la compaction de son noyau. Le stress oxydatif provoque, entre autres, des altérations au niveau de l'ADN et de la membrane du spermatozoïde (101) impactant directement son pouvoir fécondant.

C. Contenu lipidique des spermatozoïdes et du liquide séminal

Il a été démontré que la composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes jouait un rôle important dans leur mobilité, leur viabilité, la capacitation et leur capacité de fusion nécessaire à la fusion des gamètes, mais également dans la libération de l'acrosome lors de la réaction acrosomique. Il a par exemple été souligné l'influence du ratio cholestérol/desmostérol sur ces différents paramètres (103,104), la composition en acides

gras (97) ou encore la qualité du remodelage lipidique lors de la traversée de l'épididyme afin d'accroître la fluidité membranaire et acquérir le pouvoir fécondant (70).

De plus, il a été mis en évidence l'influence d'un apport alimentaire riche en lipides sur la composition lipidique du plasma séminal et/ou des spermatozoïdes ainsi que sur les paramètres spermatiques (100). Chez l'Homme, ce lien entre dyslipidémie et composition lipidique du liquide séminal ou des spermatozoïdes (97,105) n'a pas encore été démontré. En revanche, le lien entre la composition lipidique des spermatozoïdes ou du liquide séminal et les paramètres spermatiques est tout de même décrit (97).

D. Modifications épigénétiques

Le bon déroulement de la spermatogénèse, de la méiose ou du développement embryonnaire dépend de modifications épigénétiques. Plusieurs études ont rapporté chez les patients infertiles des modifications dans les marques épigénétiques (106). Il a également été rapporté chez les patients obèses des perturbations épigénétiques (106,107).

Ainsi, l'épigénétique pourrait expliquer l'impact transgénérationnel de l'obésité sur la fertilité (107).

OBJECTIFS

Les données de la littérature montrent l'intérêt de mettre les lipides et leur métabolisme au centre de la problématique de fertilité :

- leur rôle crucial dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (la capacitation) et la réaction acrosomique est clairement attesté ;

- le rôle des phospholipases A2 sécrétées dans le métabolisme lipidique membranaire. Chez l'animal, elles agissent sur le spermatozoïde afin de réguler la réaction acrosomique spontanée mais également la mobilité et le développement embryonnaire précoce ;

- les désordres métaboliques lipidiques et l'obésité sont responsables d'infertilités masculines avec un retentissement sur les paramètres spermatiques et la fécondité des spermatozoïdes.

Du point de vue diagnostique, l'étude des lipides et de leur métabolisme pourrait donc expliquer l'infertilité de certains patients. Sur le plan thérapeutique, une connaissance approfondie du métabolisme spermatique lipidique permettrait de mieux maîtriser *in vitro* la sélection et la préparation des spermatozoïdes lors des techniques d'AMP. L'étude des phospholipases A2 sécrétées répond à toute cette problématique. Les données des modèles animaux et les connaissances actuelles sur les phospholipases nous ont donc incités à initier ce projet chez l'Homme.

L'objectif principal de notre étude était de tester l'effet des phospholipases A2 sur la réaction acrosomique dans le modèle humain. Compte tenu des données préliminaires, nous avons décidé de tester hGV et hGX, hGIB (3 sPLA2 humaines) et mGX (sPLA2 murine contenue dans l'acrosome).

Les objectifs secondaires étaient en premier lieu de caractériser la population de patients la plus sensible à l'action de ces enzymes. Pour cela, nous avons étudié la corrélation entre l'induction de la réaction acrosomique par les sPLA2 et les données cliniques des patients (âge, type d'infertilité) ou encore les paramètres spermatiques : la concentration et la mobilité spermatique, les anomalies du spermocytogramme et plus particulièrement celles de l'acrosome ainsi que la qualité de l'ADN spermatique par l'analyse de sa fragmentation. Dans

un deuxième temps, nous avons cherché une corrélation entre l'induction de la RA par les sPLA2 et l'IMC ou les anomalies du bilan lipidique.

Enfin, pour mieux cerner le mode d'action de ces phospholipases A2 sécrétées, nous avons voulu déterminer la part d'induction de la RA par les sPLA2 liée à leur activité catalytique. Nous avons pour cela comparé l'induction de la RA par la mGX par rapport à la mGX H48Q. Cette enzyme est dépourvue d'activité enzymatique par la substitution d'une Histidine en Glutamine en position 48, dans le site catalytique.

MATERIEL ET METHODE.

I. RECRUTEMENT DES PATIENTS

Étaient inclus les patients majeurs se présentant pour un examen de spermiologie dans le cadre d'un bilan d'infertilité au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS du CHU de Grenoble. Après une information orale et écrite, les patients qui acceptaient d'être inclus signaient un consentement. N'étaient retenus que les patients présentant les paramètres spermatiques suivants : numération spermatique $> 5.10^6$ spermatozoïdes/ml ; Volume $> 2,5$ ml. Ces paramètres minimums ont été fixés grâce à un travail préliminaire de faisabilité. Nous avons recueilli le type d'infertilité (primaire ou secondaire) et sa durée, les éventuelles causes d'infertilité (masculines ou féminines) retrouvées à l'interrogatoire ou au bilan, l'IMC et les antécédents du patient. Une ordonnance pour un bilan hormonal (FSH, LH et testostérone totale) et lipidique (Cholestérol total, HDL-Cholestérol, LDL-Cholestérol et Triglycérides) leur était prescrit dans le cadre de ce bilan d'infertilité.

La gestion de ces échantillons issus des reliquats des examens de spermiologie a été effectuée dans le cadre du CRB-Germethèque.

II. PRODUCTION DES sPLA2

Les sPLA2 sont produites par l'équipe du Pr Gérard Lambeau de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Nice-Sophia Antipolis selon une technique classique de production de protéines recombinantes dans *E.coli*. L'enzyme inactive (car toxique pour l'hôte si active) est produite sous forme de corps d'inclusion. Elle est ensuite extraite, renaturée puis purifiée par HPLC. Les sPLA2 sont enfin caractérisées par spectrométrie de masse et par mesure de leurs activités enzymatiques spécifiques afin de s'assurer de la pureté des sPLA2 et de l'absence de mutation ou protéine de fusion pouvant altérer leur fonction (6).

La mGX H48Q est produite de façon similaire à celle de la mGX après mutation de son site catalytique. Cette protéine mutée possède une activité catalytique correspondant à 0,1% de celle de mGX (4).

III. EVALUATION DES PARAMETRES SPERMATIQUES

Après 30 minutes de liquéfaction à 37°C, le sperme était analysé avec mesure du volume de l'éjaculat et du pH. La mobilité était évaluée par un examen de 10µl de sperme entre lame et lamelle, la numération évaluée en cellule de Thoma avec une dilution (1:10 v/v) d'une fraction de l'échantillon dans une solution sérum physiologique-formaldéhyde (1:100 v/v) et la vitalité évaluée par une coloration d'éosine-nigrosine (50µl d'éosine, 50µl de nigrosine et 50µl de sperme) avec réalisation d'un frottis et lecture de 100 spermatozoïdes (étaient considérés vivants les spermatozoïdes non colorés et morts les spermatozoïdes colorés en rouge-rose). Un spermocytogramme était également réalisé sur 100 spermatozoïdes selon la classification de David, après fixation à l'éthanol-éther (50%-50%) et coloration de Shorr. Etaient relevés pour cette étude le pourcentage total d'anomalies morphologiques et la part d'anomalies de l'acrosome (acrosomes malformés ou absents).

IV. CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES

1,5-2ml de sperme étaient déposés sur un gradient de densité discontinu (PureSperm 100® Nidacon/Sperm Preparation Medium® Orogio, v/v) : 1 ml 1/0 (100%), 1ml 0,9/0,1 (90%), 1ml 0,8/0,2 (80%), 1ml 0,7/0,3 (70%), 1ml 0,6/0,4 (60%), 1,5ml 0,4/0,6 (40%) puis centrifugés à 200g/20 min. Les fractions 90% et 100% étaient récupérées et lavées avec 5ml de Sperm Preparation Medium® (SPM) à 200g/10 min. Le surnageant était retiré pour laisser 200-300µl de culot. Le volume, la mobilité et la numération étaient évalués en fin de technique.

Les spermatozoïdes étaient ensuite capacitées pendant 5h à 37°C dans 2ml de milieu capacitant. Trois milieux pour la capacitation ont été utilisés lors de cette étude afin de vérifier que la réponse aux sPLA2 n'était pas dépendante du milieu capacitant considéré :

- **Ham's F10®** MP Biomedicals avec 3,5% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma), milieu de référence cité dans le manuel de l'OMS 2010 dans l'évaluation de la réaction acrosomique (108) et utilisé lors des travaux préliminaires. Il était supplémenté par 1,5 mM de CaCl₂, 1,5mM de Na lactate et 10mM de NaHCO₃. Les spermatozoïdes étaient placés dans une étuve à 5% de CO₂.

- **Sperm Preparation Medium®** Origio (SPM), milieu capacitant commercialisé (marquage CE), utilisé dans notre laboratoire pour les préparations de sperme avant techniques d'AMP. Les spermatozoïdes étaient placés dans une étuve sans CO₂.

- **le « milieu 3 »** (milieu reconstitué) contenant pour 100ml : 1,8mM de CaCl₂, 5,4mM de KCl, 0,8mM de MgSO₄.7H₂O, 116,3mM NaCl, 1,0mM de NaH₂PO₄, 5,55mM de D-glucose, 2,73mM de Na pyruvate, 25mM de Na lactate et 26mM de NaHCO₃. Le milieu était supplémenté par 2% de BSA. Les spermatozoïdes étaient placés dans une étuve à 5% de CO₂ (109).

Le capacitat était séparé en plusieurs fractions :

- plusieurs fractions étaient traitées avec les sPLA2 (hGV, hGX, hGIb, mGX ou mGX H48Q) à 200nM lors les 10 dernières minutes pour chaque fraction ;

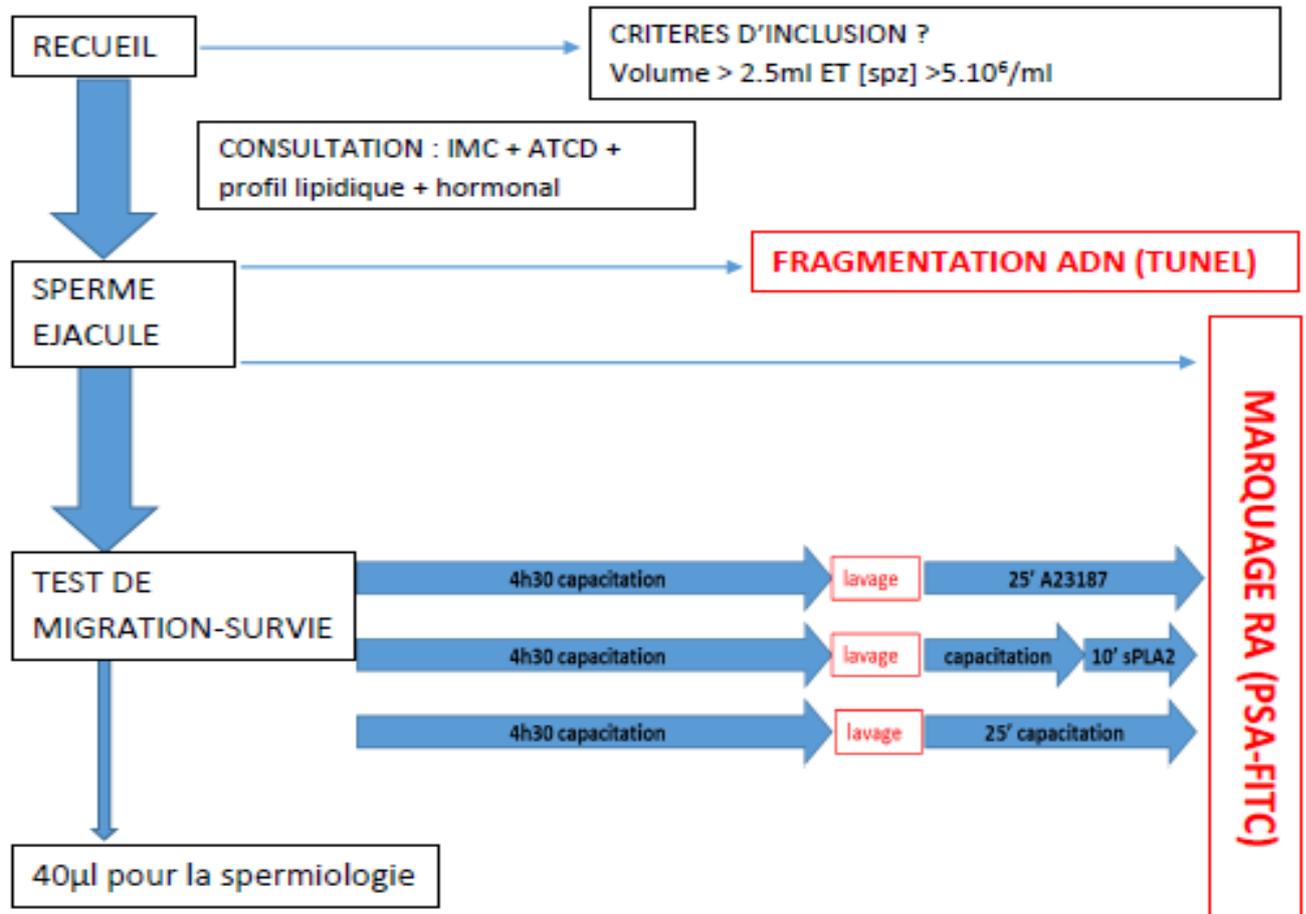
- une fraction était traitée avec de l'A23187 à 10µM lors des 25 dernières minutes. Cette molécule reconnue comme inductrice de la réaction acrosomique constituait notre contrôle positif ;

- une dernière fraction n'était pas traitée (capacitation seule) ;

Pour cette dernière étape, les spermatozoïdes étaient préalablement lavés dans un milieu plus pauvre en BSA (0,2%).

Le protocole de traitement des échantillons est résumé dans la *Figure 24*.

Figure 24 : protocole de traitement des échantillons



A23187 : Calcium ionophore ; spz : spermatozoïdes ; sPLA2 : hGV, hGX, hGIB, mGX ou mGX H48Q
 Le même protocole a été utilisé pour les trois différents milieux capacitants.

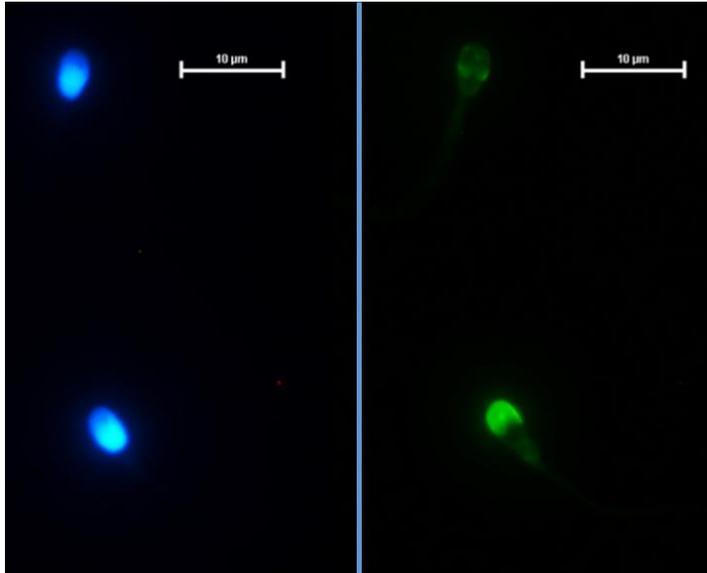
V. EVALUATION DE LA REACTION ACROSOMIQUE

Les spermatozoïdes éjaculés étaient lavés deux fois en PBS. Ensuite, une fixation était réalisée en méthanol à +4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, la préparation était déposée sur une lame.

Après 10 minutes de rinçage en PBS, les lames étaient incubées 15 minutes avec de la Pisum Sativum Agglutinin-FITC (PSA-FITC) à 10µg/ml et lavées 10 minutes en PBS. Cette lectine fluorescente permet le marquage de la membrane externe de l'acrosome. Une contre-coloration nucléaire était effectuée avec du Hoechst à 20 ng/ml (3 minutes d'incubation et 3 minutes de lavage), suivie d'un montage des lames en DABCO.

La lecture des lames était réalisée en épifluorescence au grossissement x1000 à l'immersion : les noyaux (marqués au Hoechst) étaient repérés à la longueur d'onde de 397nm et le statut acrosomique était évalué à 515nm avec un compte de 200 spermatozoïdes (*Figure 25*).

Figure 25 : Marquage à la PSA-FITC (x1000)



A gauche : la coloration nucléaire au Hoechst de 2 spermatozoïdes ; à droite : au filtre FITC. En haut : le spermatozoïde a perdu sa membrane acrosomique externe (absence de marquage) ; en bas, marquage positif de la membrane externe de l'acrosome. Les barres d'échelle représentent 10µm.

VI. EVALUATION DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE (TUNEL)

Les spermatozoïdes éjaculés étaient lavés 3 fois en PBS. Puis une fixation était réalisée en méthanol-acide acétique (3/1 : v/v) à +4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, une goutte de la préparation était déposée sur lame et séchée.

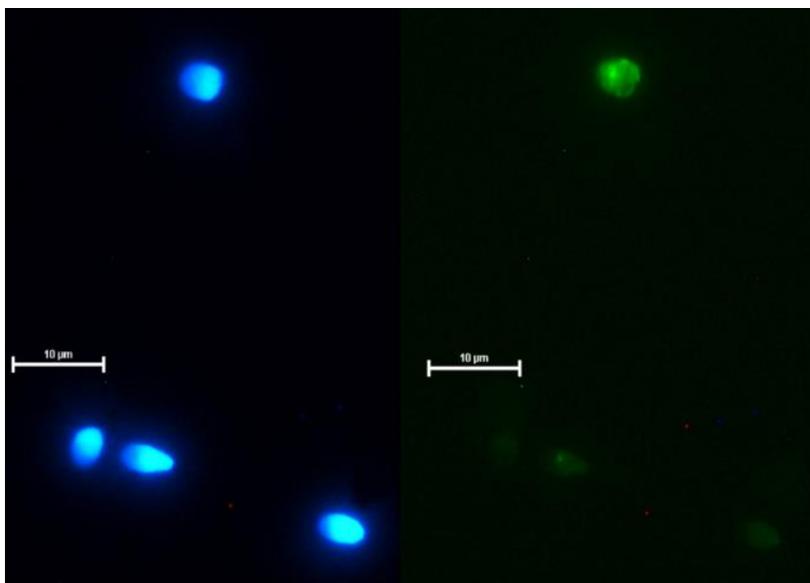
Les lames étaient incubées dans une solution de perméabilisation (Triton X-100 à 0,1% dans une solution de citrate de sodium à 0,1%) à +4°C pendant 2 minutes. Puis les lames étaient incubées avec la solution de marquage TUNEL (Kit Roche© : anticorps primaire fixant les terminaisons 3'UTP libres et anticorps secondaire couplé à un fluorochrome) pendant 1

heure en chambre humide à 37°C puis rincées trois fois dans du PBS. Une contre-coloration des noyaux au Hoechst était également réalisée (même mode opératoire que précédemment).

La lecture des lames était réalisée en épifluorescence au grossissement x1000 à l'immersion : les noyaux (marqués au Hoechst) étaient repérés à la longueur d'onde de 397nm et la fragmentation de l'ADN spermatique évaluée à la longueur d'onde 515nm avec un compte de 200 spermatozoïdes (*Figure 26*).

Pour chaque série un contrôle négatif était effectué avec l'anticorps-secondaire.

Figure 26 : Marquage TUNEL (x1000)



A gauche, 4 spermatozoïdes avec marquage à l'Hoechst. A droite, un spermatozoïde avec ADN fragmenté (marquage positif) et les 3 autres spermatozoïdes en-dessous non marqués. Les barres d'échelle représentent 10 μ m.

VII. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

La mise en forme des données a été réalisée par le logiciel Excel 2013 et leur exploitation à l'aide du logiciel R (version 3.0.2). L'évaluation des variables quantitatives a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney pour un niveau de significativité fixé à 5% et l'analyse de corrélation a été effectuée par le coefficient de corrélation r^2 .

RESULTATS

I. PATIENTS

Entre janvier 2014 et mai 2015, 61 patients ont été inclus dans le laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS du CHU de Grenoble. Les caractéristiques de ces patients sont résumées dans le *Tableau 1*. L'âge moyen de ce panel était de 34,2 ans avec une durée d'infertilité moyenne de 2,3 ans. Ces patients présentaient un IMC moyen de 25,5 dépassant donc légèrement la limite du surpoids (IMC>25). Une cause féminine à l'infertilité des couples était retrouvée dans deux tiers des cas (67,2%). Plus de 50% des patients étaient exposés à des toxiques avec dans une majeure partie une exposition au tabac (39,3%) et des toxiques professionnels dans une moindre mesure (11,5%). Enfin, dans plus de 40% des cas, il s'agissait d'une infertilité secondaire.

Tableau 1: Caractéristiques de l'échantillon (n=61)

Age, années, m (ET)	34,2	(6,4)
durée infertilité, années, m (ET)	2,3	(1,6)
IMC, kg/m ² , m (ET)	25,5	(4,1)
Infertilité féminine, n (%)	41	(67,2)
Cause ovulatoire, n (%)	26	(42,6)
Cause tubaire, n (%)	22	(36,1)
Endométriose, n (%)	7	(11,5)
Pathologie utérine, n (%)	6	(9,8)
Cause sexologique, n (%)	1	(1,6)
Infertilité masculine, n (%)	6	(9,8)
Toxiques masculin, n (%)	31	(50,8)
Tabac, n (%)	24	(39,3)
Cannabis, n (%)	3	(4,9)
Toxique professionnel, n (%)	7	(11,5)
Chaleur, n (%)	4	(6,6)
ATCD à risque stérilisant, n (%)	3	(4,9)
Infertilité secondaire, n (%)	25	(41,0)
avec naissance, n (%)	16	(26,2)
après AMP, n (%)	2	(3,3)

m : moyenne ; ET : écart-type

Les paramètres spermatiques des patients inclus sont présentés dans le *Tableau 2*. Les médianes pour les paramètres de bases du spermogramme étaient de 179 millions de

spermatozoïdes/éjaculat pour la numération, 60% de spermatozoïdes mobiles et 55% de progressifs. La médiane pour la fragmentation de l'ADN spermatique était de 7%.

Le *Tableau 2* présente également les paramètres après le test de migration-survie. La médiane pour la concentration était de 45 millions spermatozoïdes/ml avec 90% de mobilité.

Tableau 2 : Paramètres spermatiques de l'échantillon (n=61)

	médiane	1er quartile	3e quartile	normes OMS 2010 (108)
Abstinence, jours	3,0	3	4	
Volume, ml	3,5	2,8	4,5	> 1,5
pH	8,2	7,9	8,2	> 7,2
Numération spermatique, 10 ⁶ /éjaculat	179	84	320	>38
Mobilité, %	60	50	60	> 40
Mobilité progressive, %	55	45	60	> 32
Tératospermie, %	84	80	88	<96
Anomalies acrosome, %	52	43	60	
Spermatozoïdes à ADN fragmenté, %	7	5	13	
Paramètres après TMS				
Volume, µl	250	183	300	
Mobilité, %	90	80	90	
Concentration, 10 ⁶ /ml	43	19	60	

Les dosages sanguins lipidiques et hormonaux sont résumés dans le *Tableau 3*. Parmi les 61 patients retenus, 38 ont réalisé leur bilan lipidique (62,3%) : 18 présentaient au moins une anomalie lipidique (46,2%), 4 concernaient l'HDL-cholestérol (10,6%), 7 le LDL-cholestérol (17,9%) et 8 les triglycérides (10,5%). Les médianes étaient de 3,8 mUI/ml pour la FSH, 4,1 mUI/ml pour la LH et 17,9 nmol/l pour la testostérone totale.

Tableau 3 : résultats des bilans lipidiques et hormonaux (n=39)

	médiane	1er quartile	3e quartile	Patients présentant une anomalie, n (%)	normes
Bilan lipidique					
Cholestérol total, g/l	2,0	1,8	2,2		
HDL-cholestérol, g/l	0,5	0,4	0,6	4 (10,3%)	>0,4
LDL-cholestérol, g/l	1,3	1,1	1,5	7 (17,9%)	<1,6
Triglycérides, g/l	0,8	0,6	1,2	8 (10,5%)	<1,5
Bilan hormonal					
FSH, mUI/ml	3,8	3,0	6,1		3-15
LH, mUI/ml	4,1	3,2	4,8		1,5-9,3
testostérone totale, mUI/ml	17,9	13,1	21,2		10-30

Valeurs normales du bilan lipidique : recommandations de l'Afssaps de Mars 2005.

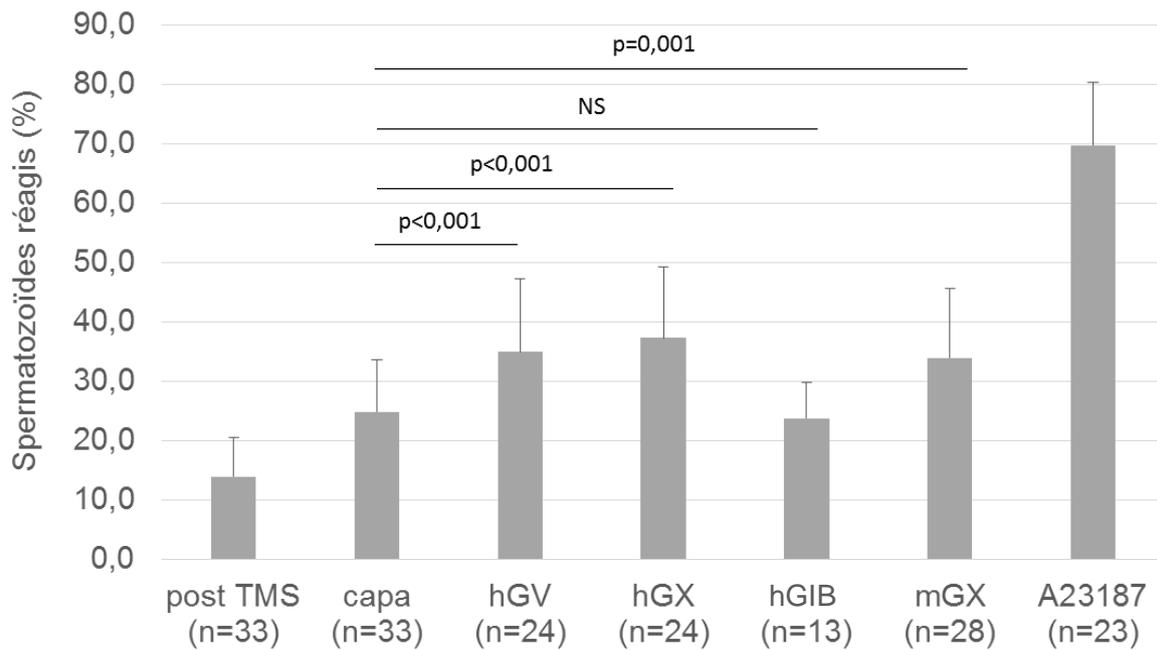
Valeurs normales du bilan hormonal : médianes des normes des laboratoires d'analyse.

II. Evaluation de la réaction acrosomique

A. Effet des phospholipases sur réaction acrosomique

Les résultats de l'effet des différentes sPLA2 sur la RA sont rapportés dans la *Figure 27*. Après test de migration-survie, environ 15% des spermatozoïdes ont réalisé leur RA. Ce chiffre atteint environ 25% après 5h de capacitation. L'utilisation de hGV, hGX et mGX lors des 10 dernières minutes augmente significativement les taux de RA par rapport à une capacitation seule pour atteindre respectivement 35% ($p<0,001$), 37% ($p<0,001$) et 34% ($p=0,001$) de spermatozoïdes réagis. En revanche l'hGIB ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur la réaction acrosomique avec un taux avoisinant également les 25%.

Figure 27 : Effets des sPLA2 sur la réaction acrosomique

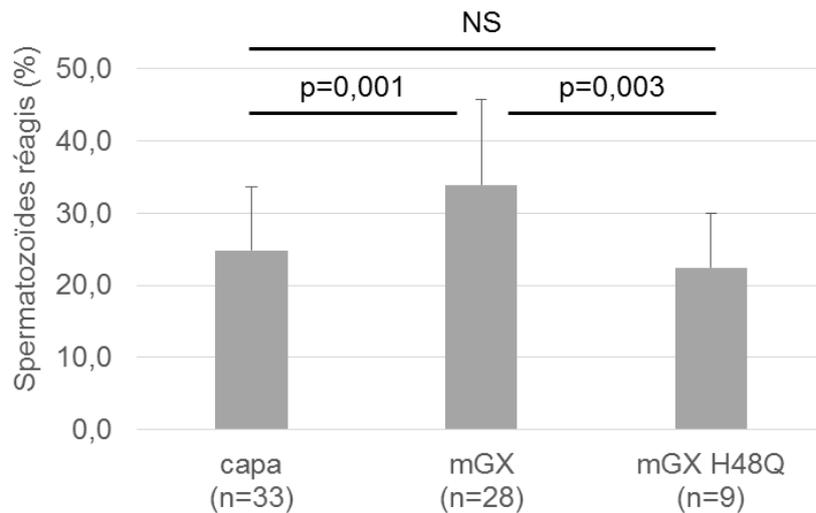


TMS : Test de Migration-Survie ; capa : spermatozoïdes capacités 5h sans traitement
 hGIB, mGX, hGV et hGX : 200nM lors des 10 dernières minutes ;
 A23187 : 10µM lors des 30 dernières minutes.
 NS : non significatif

B. Effet de la mGX H48Q

Nous avons comparé l'induction de la RA par la mGX et la mGX mutée, dépourvue d'activité catalytique : la mGX H48Q. Les résultats sont rapportés dans la *Figure 28*. Si avec la mGX active, le taux de RA atteint 34%, elle reste à 22% avec la mGX H48Q (p=0,003). Cette dernière n'est pas significativement différente du taux de réaction acrosomique après capacitation.

Figure 28 : étude de l'induction de la RA par la mGX et son homologue inactive (mGX H48Q)



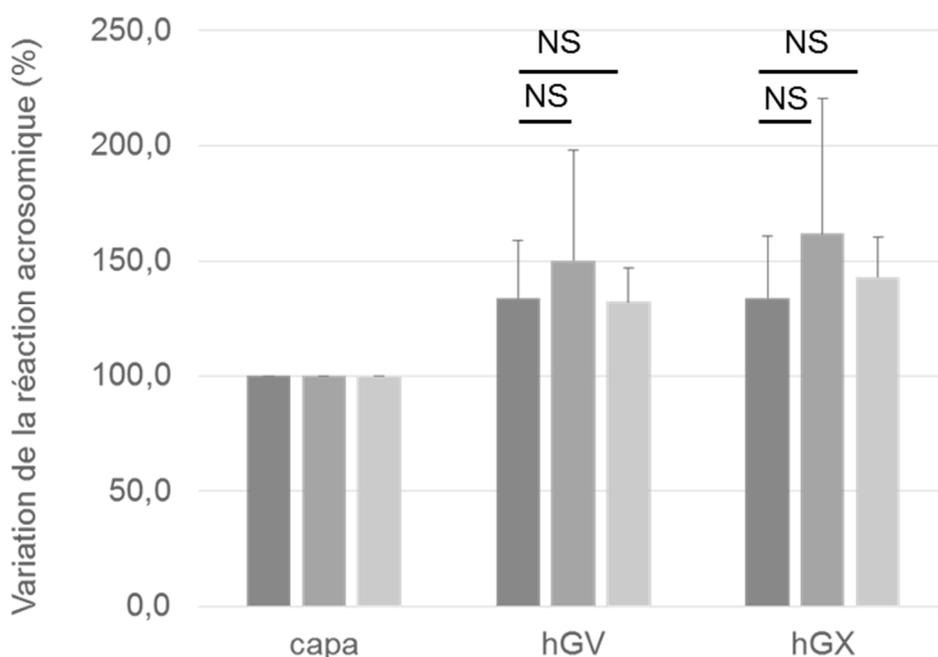
capa = 5h de capacitation sans traitement ; hGV et hGX 200nM lors des 10 dernières minutes
NS : non significatif

C. Comparaison de 3 milieux de capacitation

Trois milieux de capacitation (le Ham's F10 et le Sperm Preparation Medium® et le « milieu 3 ») ont été utilisés pour évaluer la réaction acrosomique. La comparaison des résultats obtenus est décrite dans la *Figure 29*. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'augmentation de la RA par les sPLA2 par rapport aux spermatozoïdes capités. Les résultats obtenus pour les 3 milieux nous donnent des résultats de réaction acrosomique comparables.

Cette constatation nous a permis de grouper les résultats de tous les patients pour les analyses statistiques suivantes.

Figure 29: comparaison de 3 milieux capacitants

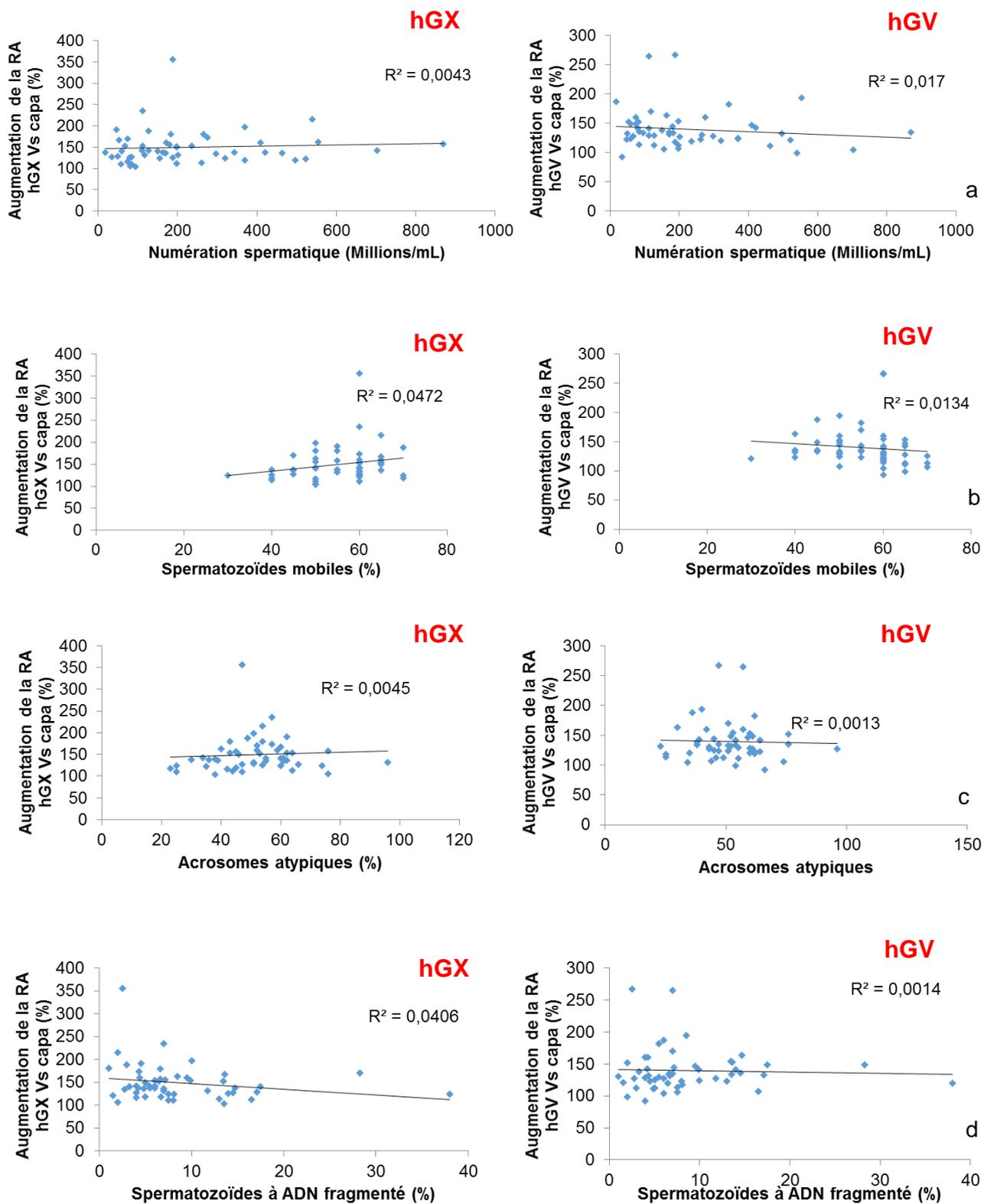


noir : Ham's F10 (n=8) ; gris : Sperm Preparation Medium(n=20) ; gris clair : « milieu 3 » (n=24)
capa = 5h de capacitation sans traitement ; hGV et hGX 200nM lors des 10 dernières minutes.
NS : non significatif ;
Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes capacités.

D. Paramètres spermatiques, type d'infertilité et induction de la RA par les sPLA2.

Nous avons cherché à caractériser l'induction de la RA par les sPLA2 en fonction des paramètres spermatiques, ces résultats sont présentés dans la *Figure 30*. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'augmentation de la RA par les sPLA2 par rapport aux spermatozoïdes capacités. Pour la numération spermatique, la mobilité, les anomalies de l'acrosome au spermocytogramme, et la qualité de l'ADN spermatique (fragmentation de l'ADN) aucune corrélation n'a été constatée, avec des r^2 tous très faibles.

Figure 30 : Caractérisation de l'induction de la RA par les sPLA2 en fonction des caractéristiques spermatisques.



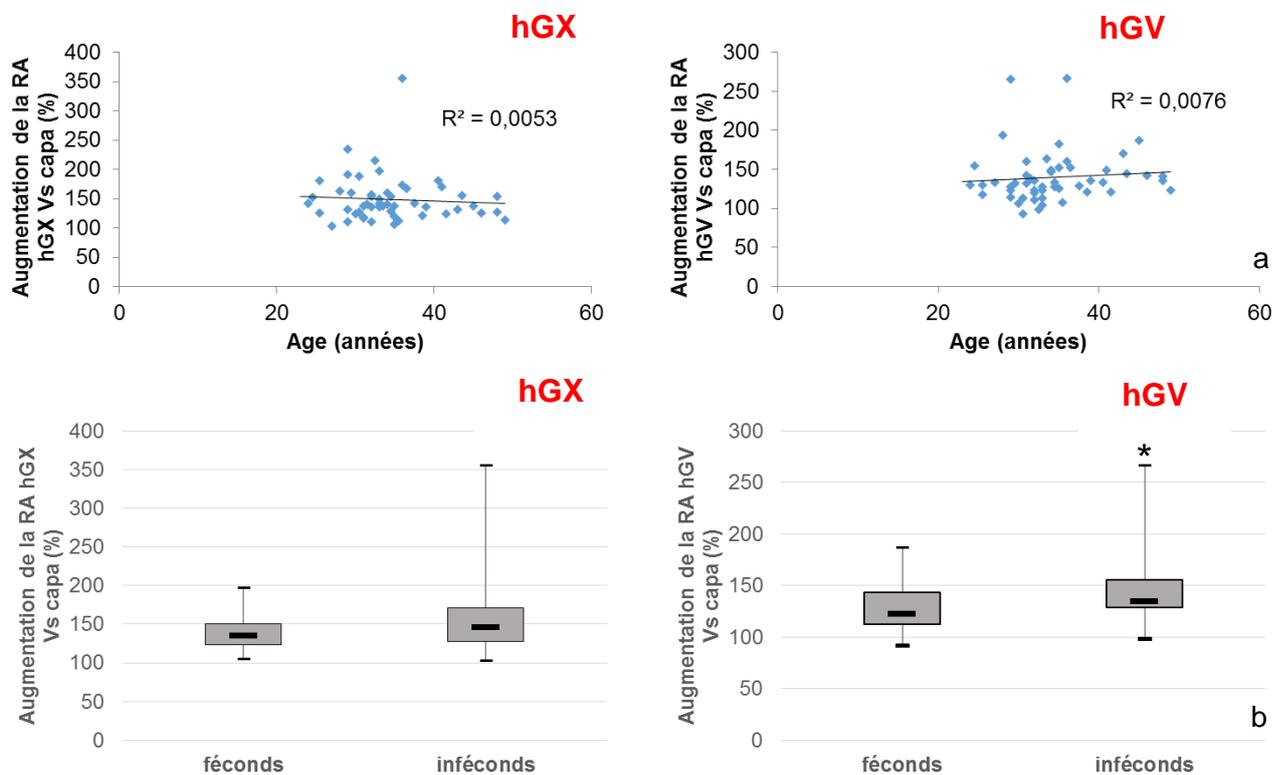
Induction de la RA en fonction : a) de la numération spermatique, b) de la mobilité, c) des anomalies de l'acrosome d) la fragmentation de l'ADN spermatisque.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes capités.

Dans un second temps, nous avons étudié l'induction des sPLA2 au regard de l'âge des patients (*Figure 31*). Tout comme les paramètres spermatiques, on ne retrouve pas de corrélation entre l'induction de la RA par ces deux sPLA2 et l'âge des patients.

Si on étudie les résultats en fonction de la fécondité des patients, l'induction de la RA par l'hGV semble plus élevée chez les patients n'ayant jamais eu de grossesse avec une conjointe ($p=0,013$). Dans le cas d'hGX, on retrouve également les valeurs les plus élevées chez les patients inféconds, mais la différence n'est pas significative.

Figure 31 : Caractérisation de l'induction de la RA par les sPLA2 en fonction des données cliniques des patients



Induction de la RA en fonction : a) de l'âge des patients et b) en fonction de leur fécondité
 Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes capacités.
 * : $p=0,013$

E. Obésité, dyslipidémie et induction de la RA par les sPLA2

Nous avons ensuite cherché à caractériser l'induction de la RA par les sPLA2 en fonction de l'IMC (*Tableau 4*). Cependant, les résultats obtenus ne sont pas significatifs et ne dégagent pas de réelle tendance.

Tableau 4 : Induction de la RA en fonction de de l'IMC

	induction de la RA par hGV		induction de la RA par hGX		p-value hGV (VS IMC<25)	p-value hGX (VS IMC<25)
	moyenne, %	ET, %	moyenne, %	ET, %		
IMC<25 (n=26)	142,4	31,4	153,8	48,3		
IMC 25-30 (n=18)	131,2	26,6	136,8	24,3	NS	NS
IMC>30 (n=7)	153,0	52,3	165,4	38,3	NS	NS

Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes capacités
ET : écart-type NS : non significatif

La même analyse, au regard des anomalies du bilan lipidique, a abouti aux mêmes constatations (*Tableau 5*).

Tableau 5 : Induction de la RA en fonction des anomalies lipidiques

	induction de la RA par hGV		induction de la RA par hGX		p-value hGV (VS groupe sans anomalie)	p-value hGX (VS groupe sans anomalie)
	m, %	ET, %	m, %	ET, %		
aucune anomalie lipidique (n=20)	137,6	22,0	145,2	27,9		
≥ 1 anomalie lipidique (n=18)	138,8	38,7	143,4	32,8	NS	NS
anomalie HDLc (n=4)	131,4	31,6	135,9	32,2	NS	NS
anomalie LDLc (n=7)	143,1	56,8	160,8	42,5	NS	NS
anomalie triglycérides (n=8)	135,4	21,7	132,7	12,6	NS	NS

Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes capacités
ET : écart-type NS : non significatif

DISCUSSION

Les données de la littérature et notamment chez l'animal montrent l'importance des sPLA2 dans les fonctions du spermatozoïde : sa mobilité , la capacitation, la réaction acrosomique et la fécondation ainsi que le développement embryonnaire précoce (3–7). Nos données aboutissent à des conclusions similaires au niveau de la réaction acrosomique, ce qui suggère l'intérêt de poursuivre les investigations sur cette famille d'enzymes dans le domaine de la fertilité humaine.

I. ECHANTILLON PATIENTS

L'échantillon de patients inclus dans cette étude était de 61, or nous souhaitions initialement recruter 90 patients dont un tiers d'individus fertiles. Si ce nombre de patients constitue une limite pour les conclusions dans le travail de corrélation et de caractérisation des populations les plus sensibles, il a en revanche été suffisant pour montrer un effet significatif des sPLA2 sur la réaction acrosomique.

Les patients inclus présentaient dans une très grande majorité des paramètres spermatiques normaux, selon les valeurs normales de l'OMS 2010 (108). Cela s'explique par les critères d'inclusion que nous avons dû imposer après l'étude préliminaire de faisabilité. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pu évaluer les taux de réaction acrosomique dans le cas d'une infertilité d'origine masculine avérée. Le nombre modeste de patients inclus dans cette étude constitue une limite non négligeable, limite qui s'est majorée dans l'analyse des bilans lipidiques étant donné que seuls 38 patients ont réalisé le bilan, soit 62,3% des patients inclus.

Les chiffres que nous observons pour la fragmentation de l'ADN spermatique sont semblables à ceux décrits dans la littérature (89). Les données collectées nous ont également permis d'analyser les résultats de la fragmentation. Nous n'avons cependant pas retrouvé le lien précédemment décrit entre l'obésité masculine et la fragmentation de l'ADN (89), seule

une tendance non significative à l'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique est retrouvée (*Figure spp1*).

II. REACTION ACROSOMIQUE

Nos résultats confirment l'effet inducteur des sPLA2 sur la réaction acrosomique, tout comme chez l'animal (4,6). La hGV, la hGX et la mGX étaient les enzymes les plus inductrices de la réaction acrosomique permettant d'atteindre respectivement 35% ($p < 0.001$), 37% ($p < 0.001$) et 34% ($p = 0.001$) de spermatozoïdes réagis, contre 25% après capacitation sans inducteur. En revanche l'hGIB ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur la réaction acrosomique avec un taux avoisinant également les 25%. Les chiffres obtenus dans l'éjaculat (environ 15%), après capacitation (25%) ou avec utilisation de l'A23187 (70%) sont par ailleurs semblables à ce que l'on peut trouver dans la littérature (50).

Nous avons à notre disposition une mGX dont le site catalytique était muté, privant ainsi l'enzyme de 99,9% de son activité catalytique : la mGX H48Q (4). Comparer l'action de la mGX à celle de son homologue inactive devait nous permettre de distinguer la part d'induction de la RA liée à l'activité enzymatique. Il a en effet été démontré que ces enzymes étaient capables de remplir certaines fonctions via d'autres mécanismes d'action du type ligand-récepteur (68). Le taux de réaction acrosomique est significativement plus élevé après induction par la mGX (34%) par rapport à ceux après capacitation ou apport de mGX H48Q qui ne dépassent pas les 25% (p -values respectivement de 0,001 et 0,003). Ces résultats confirment ceux observés chez la souris (4). De plus, il est intéressant de noter que les sPLA2 les plus inductrices sont celles qui libèrent le plus d'acide arachidonique : les sPLA2 des groupes X (mGX et hGX) et V (hGV) (110). Ces données seraient donc en faveur d'un mode d'action des sPLA2 sur la réaction acrosomique passant par leur activité catalytique et la libération d'acide fusiogènes. Ces lipides, parmi lesquels on retrouve l'acide arachidonique ou les lysophospholipides, sont en effet connus pour leur action inductrice de la RA (7,38).

Avec les études récentes sur la RA, l'ancien modèle qui proposait le rôle crucial de la liaison à la ZP comme stimulus déclencheur semble à revoir (52). Jin *et al.* ont en effet montré que la grande majorité des spermatozoïdes fécondants réalisaient leur RA avant le contact avec la ZP. Ceci montre l'intérêt de poursuivre les études sur la mécanique de la RA. Les résultats de cette étude et les données obtenues chez l'animal (4–7) sont autant d'éléments qui incitent à poursuivre les investigations sur cette mécanique en développant le rôle des sPLA2.

L'application clinique de tels travaux est aisément envisageable. Tout d'abord une application diagnostique par l'établissement d'un test fonctionnel. L'évaluation de la réaction acrosomique fait déjà partie des analyses pouvant être proposées lors d'un parcours d'AMP mais elle reste à ce jour uniquement basée sur une réponse à un inducteur non physiologique : l'A23187 (108). Evaluer la réponse à des inducteurs physiologiques, agissant *in vivo*, pourrait donc s'avérer plus intéressant. Les taux de RA obtenus chez nos patients devront donc par la suite être confrontés aux issues des techniques d'AMP qu'ils pourront être amenés à réaliser. Nous pourrions alors étudier s'il existe une corrélation entre les taux de fécondation en FIV et le niveau de RA de ces patients en réponse aux sPLA2. Un tel test pourrait alors s'avérer utile dans l'arbre décisionnel en vue d'AMP, notamment pour le choix de la technique la plus appropriée : FIV conventionnelle ou ICSI. Une telle analyse ne pouvait être présentée dans ce travail car trop peu de patients avaient déjà initié de telles techniques.

L'autre application envisagée de ces travaux est l'utilisation de ces enzymes dans la préparation des spermatozoïdes en techniques d'AMP. En effet, au-delà de leur action sur la RA, il a été montré le bénéfice de ces enzymes sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes en fécondation *in vitro* conventionnelle (4). De plus, les travaux de Jin *et al.* montrent que la majorité des spermatozoïdes fécondants initient leur RA avant la ZP et que les spermatozoïdes à acrosome intact entrant en contact avec la ZP seraient nettement moins disposés à féconder l'ovocyte. Nous pouvons donc envisager un intérêt à développer des milieux favorisant la RA en technique de fécondation *in vitro* pour améliorer les résultats de ces techniques. Enfin, en fécondation *in vitro* avec micro-injection (ICSI), les résultats de

Gianaroli *et al.* semblent montrer le bénéfice sur les taux d'implantation des embryons obtenus après injection de spermatozoïdes ayant réalisé leur RA versus spermatozoïdes à acrosome intact (111). Les données chez l'animal obtenues quelques années auparavant aboutissaient aux mêmes conclusions (112,113). L'utilisation des sPLA2 pour la préparation des spermatozoïdes avant ICSI pourrait donc également s'avérer bénéfique.

III. CARACTERISATION DES PATIENTS AYANT DES SPERMATOZOÏDES SENSIBLES AUX sPLA2

Pour cette caractérisation, nous avons décidé de présenter les résultats d'induction de réaction acrosomique en pourcentage de variation car la réaction acrosomique dans le sperme éjaculé varie énormément d'une personne à l'autre (de 5 à 43% dans notre panel) tout comme dans le sperme après test de migration-survie (de 1,7% à 19%). Ce mode de présentation des résultats assurait ainsi une standardisation. De plus, compte tenu du fait que toutes les conditions d'analyse ne pouvaient pas être réalisées pour chaque patient, exprimer les résultats en pourcentage de variation par rapport aux spermatozoïdes après test de migration-survie (condition réalisée pour tous les patients) permettait de maintenir la comparabilité des différentes conditions. Nous avons également décidé de favoriser l'analyse de hGX et hGV, car ces deux enzymes se sont rapidement révélées être les plus efficaces dans l'induction de la réaction acrosomique.

Durant cette étude, trois milieux capacitants ont été utilisés : le Sperm Preparation Medium® Origio (milieu commercialisé utilisé dans notre laboratoire pour les préparations de sperme avant techniques d'AMP), le Ham's F10® MP Biomedicals (milieu de référence cité dans le manuel de l'OMS 2010 (108) et utilisé lors des travaux préliminaires) et un « milieu 3 » reconstitué (109). Les niveaux d'induction de la RA s'avérant plus modérés que ceux obtenus chez l'animal (4,6) ou lors des essais préliminaires, nous avons voulu nous assurer que ceci n'était pas lié au milieu dans lequel les spermatozoïdes étaient capités. L'analyse de l'induction de la réaction acrosomique avec ces 3 milieux ne donne pas de différence

significative. Cette constatation nous a donc permis de grouper tous les patients inclus dans cette étude pour caractériser la/les sous-populations de patients dont les spermatozoïdes sont les plus sensibles à l'activité des sPLA2.

Pour réaliser cette caractérisation, nous avons d'abord recherché une corrélation entre les paramètres spermatiques et l'induction de la RA par les sPLA2. Cette analyse ne montre pas de corrélation entre ces paramètres (numération spermatique, mobilité, anomalies morphologiques de l'acrosome et fragmentation de l'ADN spermatique) et l'induction de la RA par hGX ou hGV. Il en était de même pour ce qui concerne l'analyse des taux de RA avec l'âge de ces patients. Si nous regardons le type d'infertilité, nous observons une induction plus importante de la RA par les sPLA2 en cas d'infertilité primaire (patients inféconds) par rapport aux infertilités secondaires (patients ayant déjà procréé). Cette différence ne s'observe cependant que pour hGV ($p=0,013$). De plus, pour hGV comme pour hGX, les médianes et les quartiles observés pour les patients inféconds sont très proches de ceux observés pour les patients féconds.

Compte tenu du rôle des lipides dans la signalisation de la capacitation et de la réaction acrosomique et de l'impact du surpoids et de la dyslipidémie sur la composition lipidique du spermatozoïde, nous avons testé l'hypothèse d'un lien entre ces dérèglements métaboliques et l'induction de la RA par les sPLA2. Nous avons en premier lieu testé cette hypothèse pour l'indice de masse corporelle. Une étude préliminaire montre d'ailleurs chez les patients obèses une capacité moindre des spermatozoïdes à déclencher leur RA (93). Cependant, dans notre étude, l'analyse ne retrouve pas de lien entre l'IMC et l'induction de la RA par les sPLA2. En effet, les tendances observées pour les patients en surpoids (IMC entre 25 et 30) et les patients obèses (IMC supérieur à 30) sont divergentes et non significatives.

Enfin, nous avons analysé les taux de réaction acrosomique au regard des anomalies du bilan lipidique, ce qui s'est avéré aussi peu concluant qu'avec l'indice de masse corporelle. En effet, que ce soit pour hGV ou hGX, aucune anomalie lipidique ne semble liée significativement à une diminution ou une augmentation de l'induction de la RA. Il faut toutefois noter que peu de patients ont montré un bilan lipidique perturbé lors de cette étude et les

anomalies lipidiques relevées étaient souvent très proches des valeurs normales : seuls deux patients présentaient un LDLc supérieurs à 2g/l, un seul présentait un taux d'HDLc inférieur à 0,35g/l et les triglycérides n'étaient jamais supérieurs à 2,5g/l. De plus, ces valeurs sont fixées par rapport au risque cardio-vasculaire, ce qui n'implique pas nécessairement que ces valeurs soient les mêmes dans le domaine de la fertilité.

Il est possible que cet objectif de caractérisation de l'activité des sPLA2 en fonction de ces différents paramètres ait été un objectif trop ambitieux surtout compte tenu du nombre modeste de patients inclus et du pourcentage de réalisation du bilan lipidique (62,3% des patients). A cela s'ajoute le délai de réalisation du bilan lipidique (parfois plus d'un mois après la réalisation de l'analyse spermatique). Compte tenu des fluctuations possibles de ce bilan lipidique, ce délai peut également représenter un biais.

Au final, notre étude montre donc que chez l'Homme, comme dans les modèles animaux, les spermatozoïdes répondent à une activité sPLA2 par l'induction de la réaction acrosomique. Cette induction de la réaction acrosomique dépend de la sPLA2 utilisée avec une plus forte action des sPLA2 des groupes V et X par rapport à celle du groupe IB. Cette induction semble indépendante des facteurs spermatiques, de la qualité de l'ADN spermatique, de l'âge de l'individu, des niveaux lipidiques plasmatiques ou de l'obésité.

Les données obtenues dans cette étude confirment le bienfondé de l'étude des sPLA2 dans le domaine de la reproduction et ouvrent la voie à un travail sur les mécanismes moléculaires impliqués dans cette induction de la réaction acrosomique. Ces travaux seront le préalable à l'évaluation de l'utilisation des sPLA2 dans le diagnostic étiologique de l'infertilité avec l'établissement d'un test fonctionnel ainsi que dans la préparation des gamètes mâles en techniques d'AMP.

THESE SOUTENUE PAR : Julien BESSONNAT

TITRE : LE RÔLE DES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES DANS LA FERTILITE: ACTION SUR LA REACTION ACROSOMIQUE DES SPERMATOZOÏDES HUMAINS.

CONCLUSION :

Les données de la littérature montrent l'intérêt de mettre les lipides et leur métabolisme au centre de la problématique de fertilité. Chez l'animal, le rôle des phospholipases A2 sécrétées, par le clivage des glycerophospholipides, a été démontré dans la réaction acrosomique précoce mais également dans la mobilité, la fécondation et le développement embryonnaire. L'étude de ces phospholipases en fertilité humaine pourrait permettre d'expliquer l'origine de l'infertilité de certains patients. De plus, l'utilisation de ces enzymes dans la préparation et la sélection des spermatozoïdes en fécondation *in vitro*, conventionnelle ou avec micro-injection (ICSI), permettrait de prendre en considération les modifications lipidiques se déroulant *in vivo* et ainsi d'accroître les performances de ces techniques.

Nous avons inclus 61 patients au laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS du CHU de Grenoble lors de ce projet. Dans la première partie de ce travail, nous avons pu montrer que chez l'Homme, comme dans les modèles animaux, les spermatozoïdes répondent à une activité sPLA2 par une augmentation du taux de réaction acrosomique. Cette induction est nettement significative après utilisation de sPLA2 des groupes V et X et presque inexistante avec celle du groupe Ib. L'utilisation d'une sPLA2 de groupe X sans activité catalytique (mGX H48Q dont le site catalytique est muté) n'a également aucun effet sur la réaction acrosomique. De plus, les données de la littérature montrent que les sPLA2 des groupes V et X sont les plus productrices en lipides fusiogènes. Ces deux éléments nous amènent à penser que ces enzymes agissent sur la réaction acrosomique par le biais de leur activité catalytique.

Nous avons par la suite cherché à déterminer si cette induction de la réaction acrosomique était corrélée avec les paramètres spermatiques, la qualité de l'ADN spermatique ou le type d'infertilité dans le but de caractériser une population de patients plus sensibles à l'action de ces enzymes. Nos données semblent montrer que l'action des sPLA2 est indépendante de ces paramètres. Seulement 38 des 61 patients inclus durant cette étude (62,3%) ont réalisé le bilan lipidique. Ceci limite la portée des conclusions que nous pouvons tirer des analyses de corrélation. Par la suite, les données obtenues durant ce travail devront être confrontées aux résultats des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) des patients inclus pour préciser si l'utilisation des sPLA2 sur spermatozoïdes peut devenir un test fonctionnel utile dans l'arbre décisionnel en vue d'AMP.

Les données récentes de Jin *et al.* remettent en question le schéma classique de la réaction acrosomique en démontrant que la majorité des spermatozoïdes féconds réalisent leur réaction acrosomique avant le contact avec la zone pellucide de l'ovocyte. De plus, l'injection de spermatozoïdes dépourvus d'acrosome permettrait selon Gianaroli *et al.* d'augmenter significativement les taux de grossesse en ICSI par rapport à une injection de spermatozoïdes à acrosome intact. Ces études associées aux données de notre travail sur la réaction acrosomique et les données chez l'animal montrant le bénéfice des sPLA2 dans la fécondation *in vitro* sont autant d'arguments démontrant le bienfondé de l'étude des sPLA2 dans le domaine de la fertilité. Ceci pourrait nous permettre par la suite de proposer leur utilisation dans la préparation des spermatozoïdes en techniques d'AMP.

(*) VU ET PERMIS D'IMPRIMER

(*) Grenoble, le

LE DOYEN

PROFESSEUR J.P. ROMANET



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR PATRICE MORAND

BIBLIOGRAPHIE

1. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992 Sep 12;305(6854):609–13.
2. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332(5):281–5.
3. Arnoult C, Escoffier J, Munch L, Pierre V, Hennebicq S, Lambeau G, et al. [Do phospholipases, key enzymes in sperm physiology, represent therapeutic challenges?]. *Médecine Sci MS*. 2012 May;28(5):512–8.
4. Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, et al. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1415–28.
5. Escoffier J, Pierre VJ, Jemel I, Munch L, Boudhraa Z, Ray PF, et al. Group X secreted phospholipase A₂ specifically decreases sperm motility in mice. *J Cell Physiol*. 2011 Oct;226(10):2601–9.
6. Abi Nahed R, Escoffier J, Revel C, Jeammet L, Payré C, Ray PF, et al. The effect of group X secreted phospholipase A2 on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A2 or progesterone. *Biochimie*. 2014 Apr;99:88–95.
7. Roldan ERS, Shi QX. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2007;12:89–104.
8. Serres C, Escalier D, David G. Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ*. 1983;49(2):153–61.
9. Eddy EM. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;65:45–62.
10. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 2003 May 1;61(1):103–15.
11. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*. 1999 Jan 29;274(5):3235–42.
12. Perreault SD, Rogers BJ. Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1982 Aug;38(2):258–60.
13. Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M. Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*. 2008 Nov;70(8):1364–7.
14. Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Golde LMG van, Colenbrander B, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*. 2001 Oct 1;114(19):3543–55.

15. Harayama H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. *J Reprod Dev.* 2013 Oct;59(5):421–30.
16. Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod.* 2013 Dec 1;19(12):785–93.
17. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6757–62.
18. Almog T, Naor Z. The role of Mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jan 27;314(2):239–43.
19. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1995 Jun;9(9):726–35.
20. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(5):581–8.
21. Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(1-2):25–38.
22. Mortimer ST, Swan MA. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995 Dec;10(12):3178–82.
23. Edwards AS, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):217–21.
24. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature.* 2011 Mar 17;471(7338):382–6.
25. Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod.* 1996 Apr;54(4):783–8.
26. Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction.* 2001 Sep 1;122(3):469–80.
27. Bahat A, Eisenbach M. Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Jun 27;252(1–2):115–9.
28. De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernández-González EO, et al. TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One.* 2009;4(6):e6095.
29. Talevi R, Gualtieri R. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod.* 2001 Feb;64(2):491–8.
30. Michaut M, Tomes CN, De Blas G, Yunes R, Mayorga LS. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-

- ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):9996–10001.
31. Stein KK, Go JC, Lane WS, Primakoff P, Myles DG. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*. 2006 Jun;6(12):3533–43.
 32. Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol*. 2014 Oct 5;
 33. Redgrove A, Aitken RJ, Nixon B. More Than a Simple Lock and Key Mechanism: Unraveling the Intricacies of Sperm-Zona Pellucida Binding. In: Abdelmohsen K, editor. *Binding Protein* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2015 Mar 1]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/binding-protein/more-than-a-simple-lock-and-key-mechanism-unraveling-the-intricacies-of-sperm-zona-pellucida-binding>
 34. Leyton L, Saling P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1123–30.
 35. Tomes CN, Michaut M, De Blas G, Visconti P, Matti U, Mayorga LS. SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol*. 2002 Mar 15;243(2):326–38.
 36. Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(12):4538–42.
 37. Rehman A, Archbold JK, Hu S-H, Norwood SJ, Collins BM, Martin JL. Reconciling the regulatory role of Munc18 proteins in SNARE-complex assembly. *IUCrJ*. 2014 Oct 21;1(Pt 6):505–13.
 38. Darios F, Connell E, Davletov B. Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol*. 2007 Dec 15;585(3):699–704.
 39. Fang Q, Lindau M. How Could SNARE Proteins Open a Fusion Pore? *Physiology*. 2014 Jul 1;29(4):278–85.
 40. Jahn R, Scheller RH. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):631–43.
 41. Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett*. 2007 May 22;581(11):2140–9.
 42. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):318–24.
 43. Rodríguez F, Zanetti MN, Mayorga LS, Tomes CN. Munc18-1 Controls SNARE Protein Complex Assembly during Human Sperm Acrosomal Exocytosis. *J Biol Chem*. 2012 Dec 21;287(52):43825–39.
 44. Blas GAD, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. Dynamics of SNARE Assembly and Disassembly during Sperm Acrosomal Exocytosis. *PLoS Biol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2015 Mar 1];3(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1197286/>
 45. Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13004–9.

46. Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev.* 2011 Oct 1;91(4):1305–55.
47. Tomes CN. Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:275–91.
48. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 2000 May;11(5):1571–84.
49. Darios F, Connell E, Davletov B. Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol.* 2007 Dec 15;585(Pt 3):699–704.
50. Byrd W, Wolf DP. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol Reprod.* 1986 Jun;34(5):859–69.
51. Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 13;108(50):20008–11.
52. Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, et al. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22;108(12):4892–6.
53. Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Sep 24;308(1–2):39–46.
54. Yanagimachi R. Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol.* 1978;12:83–105.
55. Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol.* 1985 Feb;107(2):382–94.
56. Ziyat A, Naud-Barriant N, Barraud-Lange V, Chevalier F, Kulski O, Lemkecher T, et al. Cyclic FEE peptide increases human gamete fusion and potentiates its RGD-induced inhibition. *Hum Reprod.* 2005 Dec 1;20(12):3452–8.
57. McLaughlin EA, Frayne J, Bloomerg G, Hall L. Do fertilin beta and cyritestin play a major role in mammalian sperm--oolemma interactions? A critical re-evaluation of the use of peptide mimics in identifying specific oocyte recognition proteins. *Mol Hum Reprod.* 2001 Apr;7(4):313–7.
58. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 2005 Mar 10;434(7030):234–8.
59. Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon S-Y, Fissore RA, Johnson GR, et al. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci.* 2009 Aug 1;122(Pt 15):2741–9.
60. Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 12;96(21):11830–5.
61. Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol.* 2002 Jul 15;247(2):327–34.

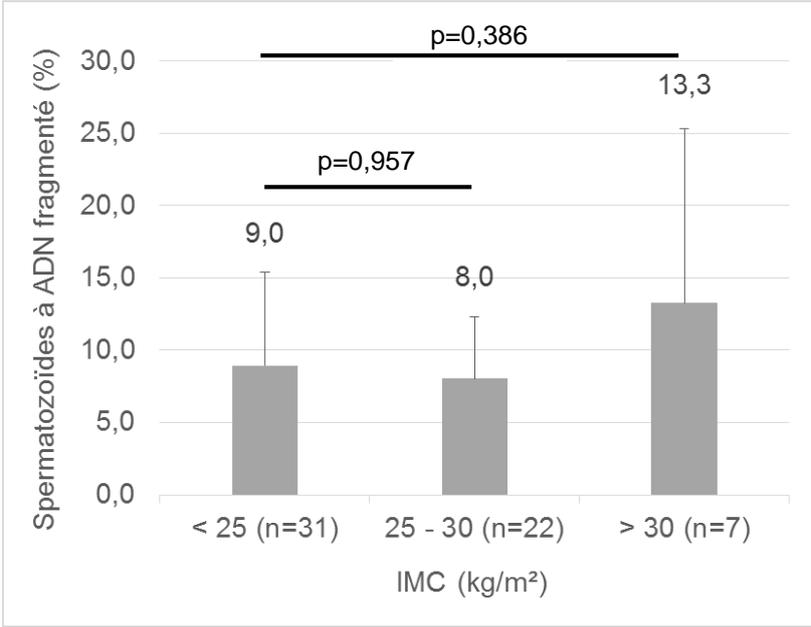
62. Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, et al. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*. 1995 Jun 30;81(7):1095–104.
63. He Z-Y, Brakebusch C, Fässler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol*. 2003 Feb 15;254(2):226–37.
64. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature*. 2014 Apr 24;508(7497):483–7.
65. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo. *Development*. 2002 Aug 1;129(15):3533–44.
66. Gadella BM. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod Fertil Dev*. 2012;25(1):26–37.
67. Murakami M, Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: An update. *Biochimie*. 2013 Jan;95(1):43–50.
68. Murakami M, Taketomi Y, Girard C, Yamamoto K, Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie*. 2010 Jun;92(6):561–82.
69. Masuda S, Murakami M, Matsumoto S, Eguchi N, Urade Y, Lambeau G, et al. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2004 Nov 8;1686(1–2):61–76.
70. Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, et al. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1400–14.
71. Roldan ER, Fragio C. Phospholipase A2 activity and exocytosis of the ram sperm acrosome: regulation by bivalent cations. *Biochim Biophys Acta*. 1993 May 20;1168(1):108–14.
72. Fry MR, Ghosh SS, East JM, Franson RC. Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod*. 1992 Nov;47(5):751–9.
73. Llanos MN, Morales P, Riffo MS. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool*. 1993 Oct 1;267(2):209–16.
74. Garde J, Roldan ER. rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites. *FEBS Lett*. 1996 Aug 12;391(3):263–8.
75. Riffo MS, Parraga M. Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. *J Exp Zool*. 1996 Aug 15;275(6):459–68.
76. Bao S, Miller DJ, Ma Z, Wohltmann M, Eng G, Ramanadham S, et al. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38194–200.

77. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2000 Nov 1;5:E110–23.
78. Li K, Jin J-Y, Chen W-Y, Shi Q-X, Ni Y, Roldan ERS. Secretory Phospholipase A2 Group IID Is Involved in Progesterone-Induced Acrosomal Exocytosis of Human Spermatozoa. *J Androl.* 2012 Sep 10;33(5):975–83.
79. Nguyen RHN, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007 Sep;22(9):2488–93.
80. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sørensen TIA, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007 Jun;22(6):1634–7.
81. Sallmén M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiol Camb Mass.* 2006 Sep;17(5):520–3.
82. Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2011 Apr;95(5):1700–4.
83. Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Polyzos N, Messinis IE. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. *Andrology.* 2013 Jan;1(1):85–9.
84. Moragianni VA, Jones S-ML, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2012 Jul;98(1):102–8.
85. Keltz J, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Sep;27(9-10):539–44.
86. Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Wright DL, Toth TL, Tanrikut C, et al. Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98(5):1193–9.e1.
87. Ramasamy R, Bryson C, Reifsnnyder JE, Neri Q, Palermo GD, Schlegel PN. Overweight men with nonobstructive azoospermia have worse pregnancy outcomes after microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2013 Feb;99(2):372–6.
88. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril.* 2008 Dec;90(6):2222–5.
89. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. *J Androl.* 2012 Feb;33(1):53–8.
90. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S, Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med.* 2012 Mar 12;172(5):440–2.
91. Sekhavat L, Moein MR. The effect of male body mass index on sperm parameters. *Aging Male Off J Int Soc Study Aging Male.* 2010 Sep;13(3):155–8.

92. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013 Jun;19(3):221–31.
93. Samavat J, Natali I, Degl'Innocenti S, Filimberti E, Cantini G, Di Franco A, et al. Acrosome reaction is impaired in spermatozoa of obese men: a preliminary study. *Fertil Steril*. 2014 Nov;102(5):1274–81.e2.
94. Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G, Baldi E. Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun 10;178(1-2):39–45.
95. Schisterman EF, Mumford SL, Browne RW, Barr DB, Chen Z, Louis GMB. Lipid concentrations and couple fecundity: the LIFE study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Aug;99(8):2786–94.
96. Schisterman EF, Mumford SL, Chen Z, Browne RW, Barr DB, Kim S, et al. Lipid Concentrations and Semen Quality: The LIFE Study. *Andrology*. 2014 May;2(3):408–15.
97. Attaman JA, Toth TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, Chavarro JE. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 May;27(5):1466–74.
98. Saez Lancellotti TE, Boarelli PV, Romero AA, Funes AK, Cid-Barria M, Cabrillana ME, et al. Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit. *PLoS One*. 2013;8(1):e52386.
99. Bataineh HN, Nusier MK. Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats. *Saudi Med J*. 2005 Mar;26(3):398–404.
100. Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM, Hermier D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod*. 1997 May;56(5):1216–20.
101. Shukla KK, Chambial S, Dwivedi S, Misra S, Sharma P. Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology*. 2014 Nov 1;2(6):809–18.
102. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*. 2011 Apr;43(2):121–8.
103. Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa Are Associated With Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J Androl*. 2009 Sep 10;30(5):552–8.
104. Zalata A, Hassan A, Christophe A, Comhaire F, Mostafa T. Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int J Androl*. 2010 Jun 1;33(3):528–35.
105. Grizard G, Sion B, Jouanel P, Benoit P, Boucher D. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex glands in the semen of men with hypercholesterolaemia. *Int J Androl*. 1995 Jun;18(3):151–6.
106. Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Mar;29(3):213–23.

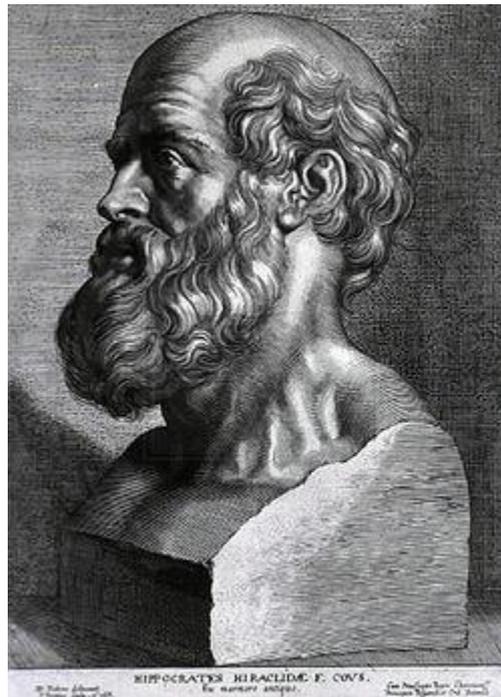
107. Fullston T, Teague EMCO, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J.* 2013 Oct 1;27(10):4226–43.
108. World Health Organization. WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. WHO. [cited 2014 Apr 30]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
109. Tardif S, Madamidola OA, Brown SG, Frame L, Lefièvre L, Wyatt PG, et al. Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. *Hum Reprod.* 2014 Oct 10;29(10):2123–35.
110. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68–69:3–58.
111. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, et al. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):807–13.
112. Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T. Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod.* 2002 Aug;67(2):534–9.
113. Lacham-Kaplan O, Trounson A. Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995 Oct;10(10):2642–9.

Figure spp1 : Fragmentation de l'ADN spermatique et IMC



Taux de fragmentation de l'ADN spermatique par la méthode TUNEL

SERMENT D'HIPPOCRATE



En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerais jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires. Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.